

平成24年4月25日提出

対象研究テーマ：ケモカインを分子標的とした治療法の開発

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：皮膚発がんにおけるケモカインの病態生理学的役割解析

研究代表者：和歌山県立医科大学 教授 近藤稔和

研究成果の概要：

二段階皮膚腫瘍形成モデルを用いて皮膚発がんにおける、CX3CL1-CX3CR1の病態生理学的役割を解析した。8週齢・雄 C57BL/6 マウス(WT)および CX3CR1 遺伝子欠損マウス(KO)の背部に DMBA (100 µg/200 µl acetone) 塗布後、TPA(30 µg/200 µl acetone)を週に2回、20週連続塗布して腫瘍形成を誘導する。肉眼的に乳頭腫および皮膚腫瘍の形成を観察したところ、KO マウスでは乳頭腫形成が有意に少なかった。したがって、皮膚発がんにおける CX3CL1-CX3CR1 シグナルの重要性が明らかとなった。

研究分野：皮膚科学, 実験病理学, 免疫学

キーワード：ケモカイン, 皮膚発癌

## 1. 研究開始当初の背景

炎症とは、生体が内外から有害な刺激（ストレス）を受けたときに生じる生体防御反応であり、これにより誘導される免疫反応と症候あるいは病理組織学的変化のことであり、一過性に生じた後消褪する「急性炎症」とその反応が長期にわたって継続する「慢性炎症」に大別される。近年、慢性炎症が、糖尿病、動脈硬化、神経変性疾患、癌の発症・浸潤・転移と大きく関わっていることが知られてきた。慢性炎症では、長期にわたるストレス応答のために生体防御反応としての炎症が遷延化し、適応の破綻により不可逆的な「組織リモデリング」が生じて臓器の機能不全に陥り、その結果として様々な病態を発症させるものと考えられている。特に、がんの炎症性微小環境では、慢性炎症により組織の恒常性が失われており、実質細胞に由来する腫瘍細胞と腫瘍組織の間質に浸潤したマクロファージの両者において、炎症シグナル経路の活性化されて、がんの発症・進展に関与することが証明されている。具体的には、炎症性サイトカイン・ケモカインなどの炎症性メディエーター並びにそれら遺伝子発現を調節する転写因子が大きく関わっていることは言うまでもない。申請者は、これまで皮膚の創傷治癒過程における炎症性サイトカインやケモカインの病態生理学的役割を解析してきた。

## 2. 研究の目的

皮膚組織は、体の最も外側にあるために、

外界から恒常的に物理的または化学的的刺激を受けている。それらの刺激が大きい場合は、組織の機能的・構造的破綻、いわゆる「創傷」が生じるが、創傷を受けた組織では、それらの解剖学的な不連続性や破壊された組織・細胞などに対し、修復反応、すなわち **Wound healing**(創傷治癒)が起こる。しかしながら、皮膚組織において刺激が継続することにより、正常な創傷治癒機構が破綻した場合、局所における慢性炎症が生じ、皮膚がんが発症する。癌の微小環境においても、創傷治癒と同様に白血球浸潤や線維芽細胞の増殖、血管新生が観察されることから、Coussens & Werb は、“Tumors are wounds that do not heal(癌は癒えることのない創傷)”と提唱している。すなわち、創傷治癒過程における微小環境と癌の微小環境には共通点が多い。申請者らは、これまで皮膚の創傷治癒過程における炎症性サイトカイン・ケモカインの病態生理学的役割を解析してきた。また、炎症性サイトカインやケモカインは、急性、慢性を問わず炎症反応の **key molecule** であることから、本研究では、ケモカイン・ケモカインレセプターの遺伝子欠損マウスを用い、慢性炎症による皮膚がんモデルにおいて、がんの発症・進展におけるケモカインシステムの病態生理学的役割を解析する。さらに、ケモカインが、皮膚がんの発症予防や進展抑制の分子標的となり得るか否かの可能性について明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### 1) 遺伝子欠損マウス

C57BL/6 マウスを遺伝子背景とする CX3C ケモカインレセプター-1 (CX3CR1) の各遺伝子欠損マウスを用いた。

### 2) 2段階皮膚発がんモデル

7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 100 $\mu$ g/200 $\mu$ l acetone)をマウス背部に塗布後、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA, 30 $\mu$ g/200 $\mu$ l)を 20 週連続塗布して腫瘍形成を誘導する。

### 3) 腫瘍形成

背部における腫瘍(乳頭腫)形成について、経時的に観察し、遺伝子欠損マウスと野生型マウスで腫瘍数を比較・検討する。

### 4) 病理組織学的検索

背部皮膚を採取し、パラフィン包埋切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、表皮の厚さを計測し遺伝子欠損マウスと野生型マウスで腫瘍数を比較・検討する。

### 5) 免疫組織化学的検索

背部皮膚を採取し、パラフィン包埋切片を作成後、マクロファージ、Tリンパ球、および新生血管を免疫染色し、遺伝子欠損マウスと野生型マウスで腫瘍数を比較・検討する。

## 4. 研究成果

1) WT マウスでは、肉眼的に乳頭腫形成が TPA 塗布 10 週目以降から観察され、20 週目では 80% のマウスに認められたが、KO マウスでは乳頭腫形成が有意に少なく、約半数のマウスでしか乳頭腫がみられなかった (Fig. 1)。

2) 病理組織学的検査では、WT マウスでは著明な表皮肥厚が観察されたが、KO マウスでは表皮層の肥厚が有意に減弱していた。さらに、免疫組織化学的検索において、WT マウスでは F4/80 陽性マクロファージおよび CD3 陽性リンパ球浸潤が顕著に観察された。しかしながら、WT マウスに比べて KO マウスでは、マクロファージ、リンパ球ともに有

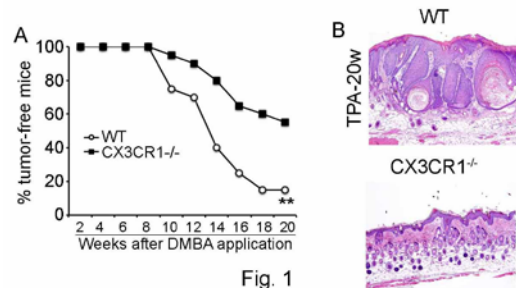


Fig. 1

意に減弱していた。さらに、血管新生についても、KO マウスでは腫瘍内血管数が有意に

少なかった。

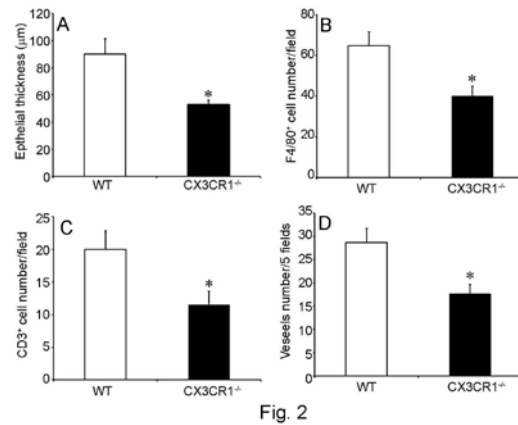


Fig. 2

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest.* 122:711-21, 2012.
2. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- $\gamma$  accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. *J Clin Invest.* 121:2911-20, 2011
3. Inui M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Protective roles of CX3CR1-mediated signals in toxin A-induced enteritis through the induction of heme oxygenase-1 expression. *J Immunol.* 186:423-31, 2011
4. Fujii H, Baba T, Ishida Y, Kondo T, Yamagishi M, Kawano M, Mukaida N. Ablation of the Ccr2 gene exacerbates polyarthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 63:96-106, 2011

〔学会発表〕（計4件）

1. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Absence of IFN- $\gamma$  accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression. Experimental Biology 2011, Washington D.C., 2011.4
2. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Nosaka M, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. Essential role of chemokine receptor CX3CR1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of bone marrow-derived fibrocyte infiltration. The 10th World Congress on Inflammation, Paris, 2011.6
3. Kondo T, Ishida Y, Inui M, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N. Essential roles of CCL3-CCR1 axis in the pathogenesis of antigen-induced arthritis. 9th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research, Florence, 2011.10

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和歌山県立医科大学・教授 近藤稔和

### (2) 研究分担者

和歌山県立医科大学・講師 石田裕子

### (3) 本研究所担当者

分子生体応答・教授 向田直史