

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700973

研究課題名(和文) がん発症過程における線維化へのケモカインによる調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the adjustment mechanism with chemokines to fibrosis in tumor development and progression.

研究代表者

佐々木 宗一郎 (Sasaki, Soichiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：50583473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：アゾキシメタン投与後の硫酸デキストラン溶液簡潔反復飲用による、大腸がん発症マウスモデルを用いて、炎症関連発がん過程の細胞・分子機構の解明を試みた。  
このモデルでは、大腸組織で産生される炎症性ケモカインCCL3が、炎症細胞浸潤過程とともに、線維芽細胞の集積と線維芽細胞からの増殖因子であるヘパリン結合性上皮増殖因子(HB-EGF)の産生も誘導していた。  
以上の結果は、CCL3が、炎症性細胞のみならず、がん微小環境構築に重要な役割を果たしていると考えられる線維芽細胞の集積と活性化を調整することで、炎症関連大腸がんの発症に関与している、がん治療法の標的分子となりうることも示唆している。

研究成果の概要(英文)：We investigated the cellular and molecular mechanism underlying chronic inflammation-associated carcinogenesis, by using mouse colon carcinogenesis caused by azoxymethane injection combined with repeated ingestion of dextran sodium sulphate solution.  
In this colon carcinogenesis process, colon tissues produced an inflammatory chemokine, CCL3, which induced fibroblasts to accumulate in and around tumor tissues and to produce a potent growth factor, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) in addition to the induction of inflammatory cell infiltration.  
These observations would indicate that CCL3 can contribute to chronic colitis-associated carcinogenesis by regulating not only inflammatory cell infiltration but also the accumulation and functions of fibroblasts, the cells that have crucial roles in tumor microenvironment. Thus, CCL3 can be a novel molecular target for inflammation-associated carcinogenesis.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：ケモカイン 大腸がん 線維化 HB-EGF

## 1. 研究開始当初の背景

発がん剤であるアゾキシメタン(AOM)を投与したマウスにデキストラン硫酸溶液(DSS)を反復飲用させ、重度の腸炎を発症させた後に、多発性の大腸腫瘍を発症させるモデル(AOM/DSSモデル)について、慢性腸炎に伴い生じる大腸発がんモデルとして、我々は解析を行ってきた(J Clin Invest., 2008; 118(2): 560-70, Cancer Res., 2009; 69(19): 7884-92)。この発がんモデルでは、大腸局所で産生される腫瘍壊死因子・ケモカインである CCL2 が、シクロオキシゲナーゼ(COX)-2 発現炎症性細胞の浸潤誘導を介して、がんの発症のみならず進展過程を促進していることを明らかにしてきた。

慢性炎症時と同様に、がんの発症過程から浸潤・転移などの進行過程においても、線維芽細胞の集積とそれに伴う線維化がしばしば認められる。がん病巣に集積する線維芽細胞は Cancer-associated fibroblast(CAF)と呼ばれ、正常線維芽細胞に比べ種々の増殖因子の産生能が高く、がんの病態形成に密接に関与していると考えられている。AOM/DSS によって生じる腸炎関連大腸がん発症過程においても、大腸組織への線維芽細胞の集積が認められたことから、このモデルにおいても CAF が重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、このモデルでの CAF の役割と CAF のがん病巣への集積機構については不明な点が多かった。

以上の点を踏まえて、腸炎関連大腸がん発がんモデルにおける、線維芽細胞に関して詳細な機能解析を行い、CAF のがん発症進展過程での実態の解明を目指した。さらには CAF を標的とした新たな抗がん治療法の開発に必要な基本的知見を得ることを目的として本計画を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、線維化への関与をこれまでに我々が報告してきたケモカイン CCL3 とそのレセプター CCR5 とに着目し、腸炎関連大腸がん発症モデルにおける発がん過程から進展過程における線維芽細胞に対する CCL3-CCR5 系の作用を解明することを目的とした。さらに、同種腫瘍接種モデルにおける線維芽細胞の集積過程への CCL3-CCR5 系の関与についても検討を加え、がんの新たな分子標的としての CCL3-CCR5 系の可能性の検証も目的とした。

## 3. 研究の方法

我々は、以上の研究目的を達成するために、以下の方法で解析を遂行した。

- (1) AOM/DSS 発がんモデルにおける腫瘍形成に対する CCL3-CCR5 系の関与の検討

野生型マウス・CCL3 欠損マウス・CCR5 欠損マウスにおける、AOM/DSS 処理後の腫瘍形成能を比較するとともに、大腸組織内の構成細胞を免疫組織学的方法とフローサイトメトリー解析により検討した。

野生型マウス・CCL3 欠損マウス・CCR5 欠損マウスの大腸組織を、AOM/DSS 処理した後に継時的に採取し、免疫組織学的方法とフローサイトメトリー解析により線維芽細胞の集積を中心に検討した。

AOM/DSS 処理後、経時的に採取した大腸より mRNA を抽出し、腫瘍成長因子や、線維芽細胞関連分子を中心に qRT-PCR 法によって解析を行った。

- (2) 腫瘍形成過程における線維芽細胞の機能解析

AOM/DSS 処理後の野生型マウスの大腸組織から CAF を回収して、qRT-PCR 法、ELISA 法などにより、その機能解析を行った。

- (3) AOM/DSS 処理による腸炎関連大腸がん発症過程へのケモカインならびにヘパリン結合 EGF 様増殖因子(HB-EGF)の役割の解析

CCR5 受容体の拮抗分子である truncated RANTES(tRANTES)発現ベクターを、AOM/DSS 処理して腫瘍が形成された後に投与し、腫瘍進展過程に対する影響を記載した点を中心に検討した。

HB-EGF 発現ベクターを AOM/DSS 処理した CCL3 欠損マウスに投与し、腫瘍形成過程に対する影響を記載した点を中心に検討した。

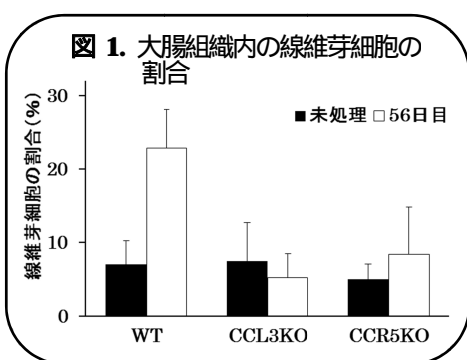
- (4) 同種腫瘍の接種に対する CCR5 欠損の影響に関する検討

マウス大腸がん細胞株 Colon26 を、野生型ならびに CCR5 欠損マウスの皮下または盲腸内に投与し、腫瘍増殖速度ならびに腫瘍内線維芽細胞集積等について検討した。

## 4. 研究成果

- (1) DSS 処理後に、野生型マウスの大腸内において CCL3 ならびに CCR5 の発現が上昇していた。免疫組織学的解析から、I 型コラーゲン陽性線維芽細胞が主に

CCR5 を発現していた。AOM/DSS 処理 56 日目における大腸腫瘍形成数が、野生型マウスと比較して、CCL3 または CCR5 欠損マウスでは、著明に減少していた。さらに、野生型マウスと比較して CCL3 または CCR5 欠損マウスでは大腸への好中球などの炎症細胞浸潤とともに、I 型コラーゲン陽性線維芽細胞の集積も抑制されていた(図 1)。AOM/DSS 処理後の大腸組織の遺伝子発現を検討したところ、野生型マウスでは AOM/DSS 投与 42 日目以降に認められた HB-EGF 発現が、CCL3 欠損マウスならびに CCR5 欠損マウスで軽減していた。また、二重蛍光免疫染色の結果、I 型コラーゲン陽性細胞が HB-EGF を選択的に発現していることが確認された。



- (2) 大腸腫瘍組織より得られた線維芽細胞が選択的に HB-EGF を発現していた。さらに、CCL3 の *in vitro* での刺激によって、線維芽細胞の増殖ならびに HB-EGF 産生が亢進した。CCL3-CCR5 系を介した線維芽細胞が動員されるという我々の以前の報告(J Immunol. 2008; 181:6384-93)を勘案すると、CCL3-CCR5 系は CAF の動員・活性化に密接に関与している可能性が示唆された。
- (3) tRANTES 発現ベクターを、AOM/DSS 処理 56 日目で腫瘍が形成された後に野生型マウスに投与すると、線維芽細胞の集積・HB-EGF 発現が軽減されるとともに、腫瘍形成数も減少した。一方で、AOM/DSS 投与 42 日目の CCL3 欠損マウスに HB-EGF 発現ベクターを投与すると、線維芽細胞の集積の増加を引き起こさずに、腫瘍形成数を増加させた。以上の結果から、AOM/DSS 投与によって大腸局所で産生される CCL3 が、CCR5 発現線維芽細胞の集積と HB-EGF 産生を誘導することで、大腸発がん過程を亢進させる可能性が示唆された。
- (4) 野生型ならびに CCR5 欠損マウスに Colon26 を皮下接種すると、野生型マウスに比べて、CCR5 欠損マウスでは腫瘍内への炎症性細胞の浸潤は減少しないが、

I 型コラーゲン陽性線維芽細胞の集積・HB-EGF 発現が減弱するとともに、腫瘍形成速度の低下を認めた。同様に Colon 26 を盲腸内に接種すると、腫瘍内 I 型コラーゲン陽性線維芽細胞の集積の減弱とともに、腫瘍形成が顕著に抑制された。したがって、炎症関連大腸腫瘍発症過程のみならず、大腸がん進展過程においても、CCL3-CCR5 系を介して集積する線維芽細胞が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

以上の結果は、International Journal of Cancer にすでに報告した(発表論文 1)。本論文は、腫瘍形成において炎症性細胞の浸潤のみならず線維芽細胞の集積が必須であることを提唱した論文として世界的に注目されている。さらに、本研究成果は、腫瘍細胞を直接的な標的とせず、がん微小環境の構成成分である線維芽細胞を標的とする、新しい抗がん治療概念の確立に寄与することが期待される。一方で、CCR5 阻害剤は HIV の治療薬としてすでに臨床応用されていることから、CCR5 阻害剤を大腸がん治療法へ応用することで、新規薬剤開発に生じる時間的なロスなしに、新たな大腸がん治療法が開発できる可能性も考えられる。

#### 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 5 件)

Sasaki S., Baba T., Shinagawa K., Matsushima K., Mukaida N.  
Crucial Involvement of the CCL3-CCR5 axis-mediated fibroblast accumulation in colitis-associated carcinogenesis in mice. Int J Cancer. 2014. 査読有 doi: 10.1002/ijc.28779. [ahead of print]

Hamano R., Baba T., Sasaki S., Tomaru U., Ishizu A., Kawano M., Yamagishi M., Mukaida N.  
Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. Eur J Immunol. 44(4): 1005-15. 2014. 査読有 doi: 10.1002/eji.201343434

Sasaki S., Yamada S., Iwamura M., Kobayashi Y.  
Specific detection of intramitochondrial superoxide produced by either cell activation or apoptosis by employing a newly developed cell-permeative lucigenin derivative, 10,10'-dimethyl-9,9'-biacridinium bis(monomethyl terephthalate).

Free Radic Biol Med. 65:1005-11. 2013  
査読有 doi:  
10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.175.

(2)研究分担者

該当なし

〔学会発表〕(計7件)

佐々木宗一郎、馬場智久、向田直史  
Crucial involvement of CCL3-CCR5  
axis-mediated fibroblast accumulation  
in colitis-associated carcinogenesis in  
mice.

(3)連携研究者

該当なし

2013年12月11日、第42回日本免疫学  
会、幕張メッセ(千葉)

佐々木宗一郎、馬場智久、向田直史  
慢性炎症大腸炎モデルでは CCL3/CCR5  
を介して線維化、癌化が進行する。  
2013年10月4日、第72回日本免疫学会、  
パシフィコ横浜(神奈川)

佐々木宗一郎、馬場智久、向田直史  
CCL3-CCR5 axis regulates progression  
of fibrosis/carcinogenesis occurring as a  
result of chronic colitis in mice.  
2013年6月27日、第8回研究所ネット  
ワーク国際シンポジウム(京都)

〔図書〕(計1件)

Mukaida N., Sasaki S., Baba T. Tumor  
immunotherapy by utilizing a  
double-edged sword chemokines.  
Int Cancer Targeted Drug Delivery; an  
Elusive Dream. Springer Science +  
Business Media New York. Pp. 97-118,  
2013

小林芳郎、佐々木宗一郎  
A novel function of neutrophils via  
opioid peptides: maintenance of estrous  
cycle and regulation of pain. 生化学  
84(10): 866-70, 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/bun  
siseitai/JapContent.html](http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/bun<br/>siseitai/JapContent.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 宗一郎(SASAKI SOICHIRO)  
金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員  
研究者番号: 50583473