

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09307

研究課題名（和文）ケモカインと神経伝達物質による骨髄由来単球系細胞制御と炎症関連大腸癌の発症抑制

研究課題名（英文）Regulation of bone marrow-derived monocytic cells and inhibition of inflammation-associated colon cancer development by chemokines and neurotransmitters

研究代表者

榎屋 正浩（MASUYA, MASAHIRO）

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30281083

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：CCR2欠損マウスとCX3CR1欠損マウスの骨髄細胞を移植した骨髄キメラマウスを作成し、移植2ヶ月後にAOM/DSSによる傷害を開始した。DSS3サイクル投与終了時点でCCR2欠損キメラマウスとWTキメラマウスの大腸を比較すると、前者は後者に比して、（1）炎症部位への単球・線維細胞の浸潤が著明に減少し、（2）これらが産生するTIMP-1も有意に減少し、（3）type 1 collagenの分解亢進により大腸線維化が抑制されていた。3サイクル投与終了10週の時点ではCCR2欠損キメラマウス、CX3CR1欠損キメラマウスともにWTキメラマウスに比して、大腸の短縮は軽減され大腸腫瘍の数は減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患患者の診療で重要な課題は、慢性炎症による線維化（大腸の短縮）と大腸癌の発症・進展である。単球由来線維細胞は骨髄由来免疫抑制細胞やM2マクロファージなどの免疫を負に調節する細胞とともに癌発症・進展に関与すると考えられている。がん治療の場では免疫チェックポイント阻害剤による細胞傷害性T細胞の抗腫瘍効果増強が注目されているが、我々はケモカイン（CCL2とCX3CL1）による単球の炎症部位への動員とマクロファージ・線維細胞への分化を制御することが大腸炎関連線維化および大腸癌の発症を抑制することを明らかにした。このことは炎症性腸疾患患者の大腸癌発症予防法開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：We prepared bone marrow (BM) chimeric mice, which were reconstituted with BM cells derived from CC chemokine receptor 2 (CCR2)-deficient mice or CX3CR1 chemokine receptor 1 (CX3CR1)-deficient mice. After 2 months of BM transplantation, BM chimeric mice were treated with azoxymethane/dextran sodium sulfate (DSS). At 10 days after the third DSS treatment, in CCR2-deficient BM chimeric mice compared with in wild-type (WT) BM chimeric mice, the number of monocytes and fibrocytes in the colonic lamina propria and mRNA expression level of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the colon tissue were significantly reduced, and colon fibrosis was attenuated by hyper-degradation of extracellular type I collagen. At 10 weeks after the third DSS treatment, shortening of the colon length was dampened and the number of colon tumors was significantly reduced in both CCR2-deficient BM chimeric mice and CX3CR1-deficient BM chimeric mice compared with in WT BM chimeric mice.

研究分野：単球系細胞と臓器線維化

キーワード：単球 線維細胞 CCR2 CX3CR1 AOM/DSS 大腸線維化 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

造血細胞特に単球が様々な臓器の傷害時に線維芽細胞および筋線維芽細胞様細胞に分化することは我々のみならず、これまでに多くの研究者が報告している。我々は、単一造血幹細胞キメラマウスへの癌細胞(メラノーマおよび肺がん)移植実験から、腫瘍内およびそれを取り巻くカプセルを構成する線維芽細胞が造血細胞由来であること(Exp Hematol 2006;34:208)を明らかにしていたので、AOM/DSS 投与による大腸炎関連大腸癌発症モデルにおいて癌微小環境に出現する癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblasts; CAF)も造血細胞由来であるのか、そうであるならどのような機序で骨髄から大腸組織に動員されるのかについて、骨髄キメラマウス(EGFP マウスの全骨髄細胞を 10 Gy 放射線照射後の C57BL/6J マウスに移植)に azoxymethane (AOM)/ dextran sodium sulfate (DSS)による傷害を慢性的に与えるモデルを用いて検討してきた。その結果、(1) DSS による大腸炎の進行に伴い、大腸粘膜上皮下に多くの造血細胞由来(EGFP 陽性)の CD45 陽性炎症細胞(線維細胞を含むかは不明)と CD45 陰性非造血系細胞(線維芽細胞ならびに筋線維芽細胞と推測される)が浸潤し(その数は腫瘍部位の方が非腫瘍部位よりも多い)、遠位大腸(特に直腸)に線維化と腫瘍形成が認められること、そして(2) 傷害開始と同時に angiotensin II type 1 receptor blocker (ARB)を投与すると、大腸の短縮ならびに腫瘍形成が抑制されることを確認した。ARB は angiotensin II による CC chemokine ligand 2 (CCL2)産生を抑制するとともにその受容体の CC chemokine receptor 2 (CCR2)を阻害することにより、単球系細胞の炎症部位への侵入を抑制し線維化や腫瘍形成を抑制したものと推測されたが、腫瘍形成抑制は不十分であった。

## 2. 研究の目的

マクロファージは大腸炎関連大腸癌において重要な役割を担っているが、炎症の場には CCR2 陽性で CCL2 に反応して末梢血から傷害大腸に浸潤する炎症性マクロファージと CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1)陽性で CX3C chemokine ligand 1 (CX3CL1)に反応して炎症部位を移動する組織常在マクロファージが存在する。また、単球由来の線維細胞もケモカインを介して骨髄から動員されているが、どのケモカインがより重要なのかは不明のままである。ケモカイン経路が炎症関連大腸癌発生に関連することを明らかにする目的で、腸炎において重要な役割を演じることが知られている CCL2 と CX3CL1 の受容体をそれぞれ RFP と GFP にて置換した CCR2<sup>RFP/RFP</sup> マウスと CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> マウスを交配して CCR2<sup>+/RFP</sup>CX3CR1<sup>+/GFP</sup> マウスを作成する。このマウスに AOM/DSS を投与して大腸炎後に大腸癌を発症するモデルを用いて、CCR2 陽性単球または CX3CR1 陽性単球が大腸のどのような部位でどのような表現型を有する細胞(マクロファージ、線維細胞、癌微小環境での癌関連線維芽細胞など)に分化するのかを検討する。次に、CCR2<sup>RFP/RFP</sup> マウス(CCR2 欠損となる)および CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> マウス(CX3CR1 欠損となる)の骨髄細胞を移植した骨髄キメラマウスに AOM/DSS を投与して大腸内の骨髄由来単球系細胞の種類(M1 マクロファージ/M2 マクロファージへの極性化、線維細胞および線維芽細胞への分化)と数の変化を検討するとともに、大腸の線維化ならびに腫瘍の発生・進展を抑制できるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス:

我々の施設で繁殖させている CCR2<sup>RFP/RFP</sup> マウスと CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> マウスを交配して CCR2<sup>+/RFP</sup>CX3CR1<sup>+/GFP</sup> マウスを作成した。また、CCR2<sup>RFP/RFP</sup> マウス、CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> マウスおよび wild-type(WT)マウス(EGFP トランスジェニックマウスも含む)の骨髄細胞を C57BL/6J-Ly5.1 マウスに移植して骨髄キメラマウスを作成した。

## ( 2 ) AOM/DSS 傷害モデル :

急性傷害 : 8-10 週齢の CCR2<sup>+/RFP</sup>CX3CR1<sup>+/GFP</sup> マウスに 1%DSS を 7 日間飲料水で投与し、その後通常の水を与えた。DSS 投与開始前、3 日後、9 日後、16 日後にマウスの末梢血、大腸を摘出した。

慢性傷害 : 骨髄移植から 2 ヶ月経過した 3 種類の骨髄キメラマウスに AOM を腹腔内投与し、その 1 週間後から 1%DSS を 7 日間飲料水で投与し、その後 14 日間は通常の水を投与するのを 1 サイクルとして 3 サイクル実施した。3 サイクル投与終了 10 日目ならびに 10 週後に各マウスから末梢血、骨髄、脾臓、大腸を摘出し、大腸の長さ、腫瘍の数と径を測定した。

## ( 3 ) 大腸組織の病理組織学的解析

摘出した大腸組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、一部は凍結切片を作成し、一部はさらに 10%ホルマリンで固定しパラフィン切片を作成した。パラフィン切片から H-E 標本、Sirius-red 染色標本を作成し、線維化や腫瘍形成の状況を観察した。凍結切片は抗 CD45 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 procollagen-I 抗体、抗  $\alpha$ -SMA 抗体とこれらに対する蛍光色素を結合した二次抗体で染色し、laser confocal microscope を用いて大腸組織内に浸潤する F4/80 陽性マクロファージ、procollagen-I 陽性または  $\alpha$ -SMA 陽性の線維細胞・線維芽細胞・筋線維芽細胞の数を検索した。

## ( 4 ) フローサイトメトリーによる大腸粘膜固有層の細胞の解析および分離

大腸組織を collagenase と DNase で処理して得られた細胞を抗 CD45.2 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 Ly6C 抗体、抗 collagen-I で染色し、LSR Fortessa を用いて GFP(CX3CR1) と RFP(CCR2)の発現強度と各種抗体の発現様式から各種単球由来細胞(マクロファージ、樹状細胞、線維細胞)の解析を行う。また、FACS Aria を用いて、各種単球由来細胞を分離した。

## ( 5 ) 大腸組織および分離細胞の遺伝子解析

大腸組織および分離細胞から mRNA を抽出し、CCL2、CX3CL1、CXC chemokine ligand 12 (CXCL12)、collagen-I、transforming growth factor- 1 (TGF- 1)、metalloproteinases、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)の発現を検討した。

# 4 . 研究成果

## ( 1 ) 急性大腸炎下での単球系細胞の数とケモカイン受容体発現の動向

CCR2<sup>+/RFP</sup>CX3CR1<sup>+/GFP</sup> マウスを用いて 1%DSS 投与前、投与から 3 日後、9 日後、16 日後に大腸粘膜固有層の単球系細胞をフローサイトメトリーにて観察した。大腸粘膜固有層の Ly6C<sup>+</sup>単球、CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>collagen I<sup>+</sup>線維細胞は時間依存性に増加したが(図 1)、

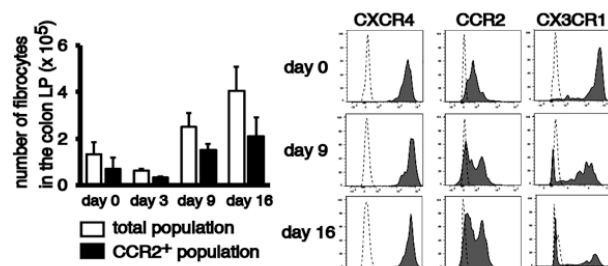


図 1

F4/80<sup>+</sup>マクロファージは 9 日後をピークに 16 日目には半減した。ケモカイン受容体発現に関しては、単球・マクロファージは炎症期間中を通して CXCR4 と CCR2 は陽性であったが、炎症進行に伴い CX3CR1 陰性細胞の頻度が増加した。線維細胞でも CXCR4 は陽性であったが、時間経過に伴って CCR2 陽性 CX3CR1 陰性細胞が増加した(図 1)。また、大腸組織におけるケモカイン発現は急性期には CCL2 と CXCL12 が有意に増加したが、慢性期では CCL2 のみ増加していた。以上から、AOM/DSS による慢性炎症では CCR2/CCL2 axis が重要であることが推測された。

## ( 2 ) AOM/DSS 慢性傷害に伴う大腸線維化

EGFP 骨髄キメラマウスに AOM/DSS 傷害を与えた。炎症の進行に伴い、大腸の長さは短縮し(図

2)、Sirius red 染色標本から大腸組織へのコラーゲン線維の沈着増加が確認された(図3)。

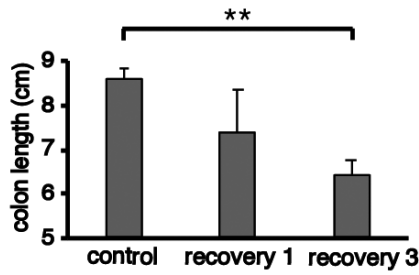


図 2

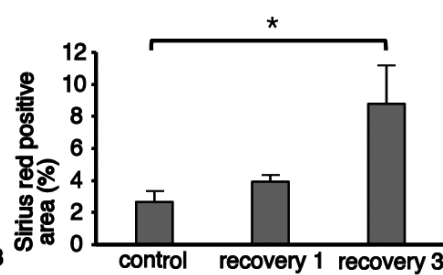
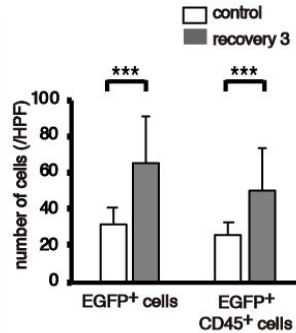
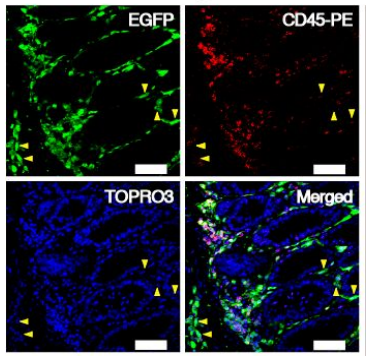


図 3

Recovery 3 は DSS  
3 サイクル投与後  
を示す。



傷害大腸には骨髓由来の血液細胞  
(EGFP 陽性)が有意に増加し(図4)、  
EGFP+CD45+procollagen-I+ 線維細  
胞も増加していた。

図 4

### (3) フローサイトメトリーによる大腸粘膜固有層の細胞の解析

EGFP 骨髓キメラマウスを用いて、DSS 傷害を与える前  
と3サイクルのDSS投与後にマウス大腸から粘膜固有  
層の細胞を分離し、フローサイトメトリーにより各種  
系列の細胞数の変化を検討した。単球と線維細胞は他  
の系列の細胞に比して、慢性傷害後により細胞数が増  
加していることが判明した(図5)。

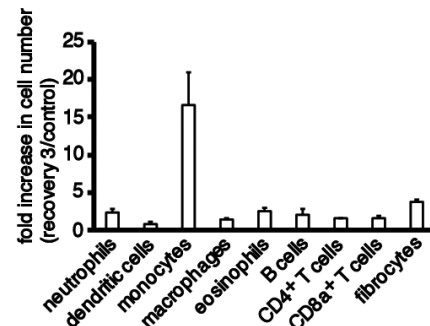


図 5

### (4) CCR2<sup>RFP/RFP</sup> 骨髓キメラマウスと WT 骨髓キメラマウスにおける大腸線維化の比較

CCR2<sup>RFP/RFP</sup> 骨髓キメラマ  
ウスと WT 骨髓キメラマウス  
から摘出した大腸を比較す  
ると、前者は後者に比して、  
大腸の短縮が軽減され(図  
6)、コラーゲン線維の沈  
着も有意に減少した(図7)。

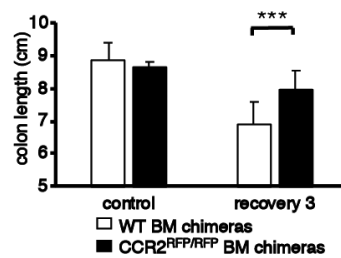


図 6

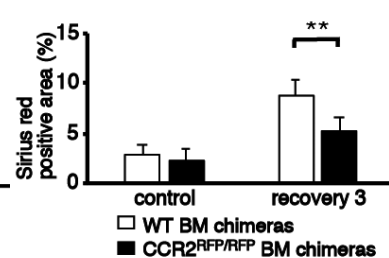


図 7

そして、前者では大腸粘膜固有層に  
出現する単球と線維細胞が有意に  
減少していた(図8と9)。  
線維細胞には CCR2 陽性と CCR2 陰  
性の2種類が存在することがわ  
かる。以上から、CCR2 陽性の単  
球および線維細胞が大腸線維化  
に強く関与することが判明した。

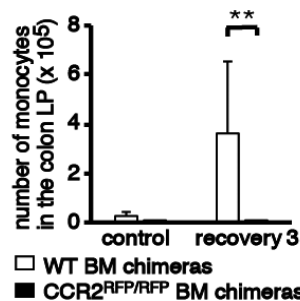


図 8

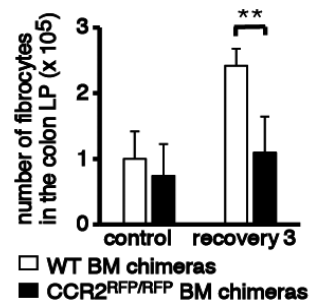


図 9

両骨髓キメラマウスの大腸組織において collagen I、TGF- $\beta$ 1、metalloproteinases の発現に

は差がなかったが、TIMP-1 は CCR2<sup>RFP/RFP</sup> 骨髄キメラマウスで有意に減少していた。TIMP-1 は CCR2 陽性単球系細胞と線維芽細胞が産生することを確認したことから、CCR2<sup>RFP/RFP</sup> 骨髄キメラマウスでは CCR2 陽性単球系細胞の減少に伴い TIMP-1 が減少することで metalloproteinases の作用が亢進して collagen I の分解が促進され線維化が軽減したのではないかと推測された。

( 5 ) CCR2<sup>RFP/RFP</sup> 骨髄キメラマウス、CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> 骨髄キメラマウスと WT 骨髄キメラマウスにおける大腸腫瘍形成の比較

3 サイクルの DSS 投与終了から 10 週経過時点では CCR2<sup>RFP/RFP</sup> 骨髄キメラマウス、CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> 骨髄キメラマウスともに WT 骨髄キメラマウスに比して、大腸の短縮は軽減され大腸腫瘍の数は減少した。CCR2<sup>RFP/RFP</sup> 骨髄キメラマウスと CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup> 骨髄キメラマウスでは大腸内で減少する単球系細胞の種類に差があるが、それでも腫瘍形成の抑制に関しては同等の結果が得られた。今後は大腸腫瘍形成において単球に発現する CX3CR1 が果たす役割を詳細に解明したい。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕( 計 6 件 )

1. Kageyama Y, Miwa H, Arakawa R, Tawara I, Ohishi K, Masuya M, Nakase K, Katayama N. Expression of CD25 fluctuates in the leukemia-initiating cell population of CD25-positive AML. PLoS One 2018; 13: e0209295. doi: 10.1371/journal.pone.0209295. 査読有
2. Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y, Fujiwara H, Mishida T, Akatsuka Y, Ikeda H, Tanimoto K, Terakura S, Murata M, Inaguma Y, Masuya M, Inoue N, Kidokoro T, Okamoto S, Tomura D, Chono H, Nukaya I, Mineno J, Naoe T, Emi N, Yasukawa M, Katayama N, Shiku H. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. Blood 2017; 130: 1985-1994. doi: 10.1182/blood-2017-06-791202. 査読有
3. Minami H, Nagaharu K, Nakamori Y, Ohishi K, Shimojo N, Kageyama Y, Matsumoto T, Sugimoto Y, Tawara I, Masuya M, Miwa H, Katayama N. CXCL12-CXCR4 axis is required for contact-mediated human B lymphoid and plasmacytoid dendritic cell differentiation but not T lymphoid generation. J Immunol 2017; 199: 2343-2355. doi: 10.4049/jimmunol.1700054. 査読有
4. Tanaka Y, Ohishi K, Sawai T, Iwasaki H, Kageyama S, Masuya M, Matsumoto T, Tanigawa T, Wada H, Shiku H, Ito M, Katayama N. Attempt to harvest a sufficient number of mononuclear cells in an appropriate blood product volume by modification of default apheresis setting. Ther Apher Dial 2017; 31: 507-511. doi: 10.1111/1744-9987.12562. 査読有
5. Ono R, Masuya M, Ishii S, Katayama N, Nosaka T. Eya2, a target activated by Plzf, is critical for PLZF-RARA-induced leukemogenesis. Mol Cell Biol 2017; 37: pii: e00585-16. doi:10.1128/MCB.00585-16. 査読有
6. Kobayashi H, Naito M, Masuya M, Maruyama M, Urata K, Takahashi Y, Tomaru A, Fujiwara K, Ohnishi M, Takagi T, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Urawa M, Gabazza EC, Taguchi O, Takei Y. Circulating fibrocytes correlate with the asthma control test score. Allergol Immunopathol 2016; 44: 191-196. doi: 10.1016/j.aller.2015.09.007. 査読有

〔学会発表〕( 計 2 件 )

1. Masuya M, Kuroda N, Hachiya N, Tawara I, Kageyama Y, Ohishi K, Miwa H, Katayama N. CCR2<sup>+</sup> monocyte-derived Ly6C<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> fibrocytes inhibit collagen degradation and contribute to the development of colon fibrosis via production of TIMP-1. 第 60 回アメリカ血液学会、2018 年

2. Kuroda N, Masuya M, Tsuboi J, Nishikawa K, Takeuchi T, Katayama N. CCR2<sup>+</sup> monocytes give rise to collagen I-producing macrophages in the injured colon and contribute to the fibrosis via production of TIMP-1. Japan Digestive Disease Week 2018, 2018 年

〔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〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし