165　大腸癌における癌関連間質細胞の機能と特性の解明	仁科　隆史

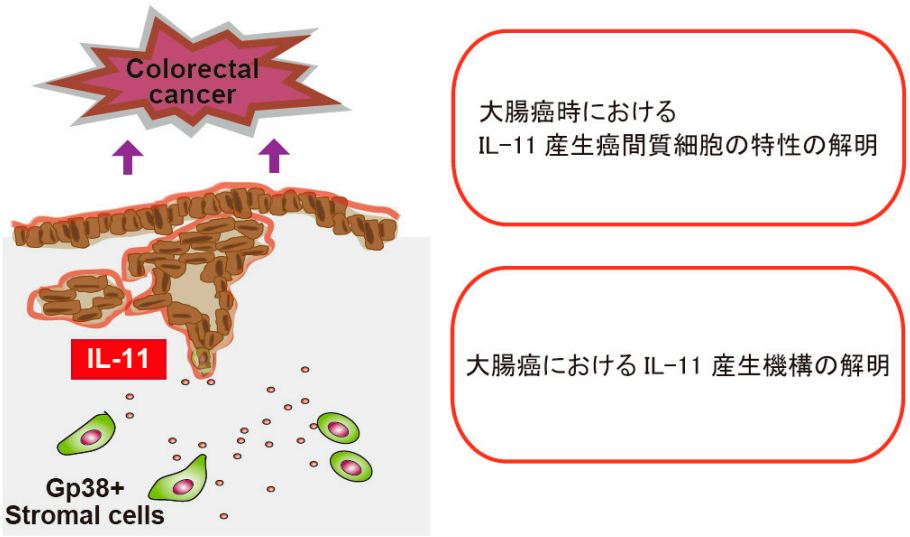
【目的】本邦での死亡数第 2 位のがんである大腸癌の発症・進展には、癌組織周辺の微小環境が重要な役割を果たしていると考えられているが、その機構については依然不明である。我々は、大腸癌増悪に働くサイトカイン IL-11 が癌細胞周囲に存在する間質細胞で特異的に産生されていることを予備的な解析から見出している。本研究では、大腸癌における新たな治療標的同定を目指して、いまだ不明な癌関連間質細胞の腫瘍形成における役割を明らかにするために、IL-11 を産生する癌関連間質細胞の特性ならびに機能を解明することを目的とする。

【方法】我々が新たに樹立した IL-11 レポーターマウスを用いて、大腸癌形成時における IL-11 産生をイメージングし、腫瘍形成に関わる細胞の特性を明らかにする。具体的に、レポーターマウスを用いて、炎症誘発性大腸癌モデルマウスならびに散発性大腸癌モデルマウスを作出した。さらに、マウスより得られた知見がヒトでも見られるかを明らかにするために、ヒト大腸癌検体（大腸腺腫、早期癌、進行癌）を用いて解析を行った。

また、腫瘍形成に関わる IL-11 がどのように産生誘導されているかを阻害剤スクリーニングにより明らかにする。具体的に、大腸癌モデルマウスを用いて、腫瘍部で産生が亢進している分子、および活性化しているシグナル伝達経路に対する阻害剤を処理し、その発現への寄与を検討した。

【結果】大腸癌モデルマウスを作製し、*in vivo* で IL-11 産生細胞の同定を試みた。その結果、IL-11 の産生 EGFP 細胞が腫瘍形成に伴って、腫瘍間質領域に出現することを確認し、フローサイトメトリー及び免疫組織学的解析から産生細胞を各種分化マーカーや特異的細胞表面タンパク質から特徴付けることができた。また実際に、これらのマーカー発現が、ヒト病理所見と一致するかを、ヒト大腸癌検体（大腸腺腫、早期癌、進行癌）をもちいて免疫組織学的解析を行った。その結果、腫瘍間質領域で IL-11 の発現が確認され、マウスモデルの結果と相関した細胞分化マーカーの発現が見られる事が分かった。どのようにして IL-11 の産生が誘導されているかを明らかにするために、IL-11 の発現を抑制できる阻害剤の探索を行った結果、ある酵素阻害剤を用いた場合に、IL-11 の発現が腫瘍部で減少することが示された。また、この阻害処理群においては、腫瘍細胞の細胞増殖、ならびに細胞死の亢進が認められた。すなわち、この活性化経路を介して、腫瘍形成が促進されることが示唆された。

研究計画



165. 大腸癌における癌関連間質細胞の機能と特性の解明

仁科　隆史

東邦大学 医学部 生化学講座 病態生化学分野

Key words：大腸癌，癌関連間質細胞，レポーターマウス，IL-11，炎症

緒　言

消化管においては、粘膜傷害によって管腔内細菌群の粘膜下への移行により、細胞死や感染に応答して免疫応答や粘膜修復応答が誘導される。そして、修復機構応答が収束せずに慢性炎症へと変化した潰瘍性大腸炎などは大腸癌の発生と強い相関が示されている。また大腸癌の発癌過程においては、癌原遺伝子や癌抑制遺伝子の遺伝子変異が順に蓄積することにより、正常な上皮細胞が良性腫瘍を経て悪性腫瘍へと変化するモデル（散発性大腸癌モデル）が示され、近年では慢性炎症が癌形成に寄与せずとも、癌の微小環境自体が炎症環境であることが示されている。すなわち、炎症は癌形成を促進する一方で、癌化を促進する遺伝子変異は、炎症促進因子を誘導することで癌微小環境を変化させていると考えられるが、その詳細は依然として不明である。

我々はこれまで、肝臓や腸管において炎症に伴い産生されるサイトカイン IL-11 が、抗酸化機構や細胞の代償性増殖を亢進させる働きをもつことを見出してきた［1，2］。一方で、ヒト大腸癌部では IL-11 の mRNA 量が亢進しており、腫瘍マウスモデルを用いた解析から IL-11 の阻害により腫瘍形成が抑制されることが報告されている［3，4］。しかしながら、各組織における IL-11 の産生細胞は不明であったことから、IL-11 の産生を *in vivo* でモニタリングするために、我々は IL-11 遺伝子のレポーターマウスを新たに樹立した（発表準備中）。そして炎症誘発性大腸癌モデルマウスを用いた解析の結果、癌細胞周囲に存在する間質細胞で IL-11 が産生されることを見出した（発表準備中）。癌細胞周囲に存在する間質線維芽細胞は大腸癌形成に重要であると考えられており［5，6］、その細胞の特性や機能の解明は、新たな治療戦略を考える上で非常に重要である。本研究で我々は、いまだ不明な大腸癌関連間質細胞の腫瘍形成促進機構を明らかにするために、IL-11 を産生する大腸癌関連間質細胞の特性ならびに機能を明らかにすることを目的とした。

そして、解析を進めた結果、現在までに IL-11 はあるシグナル伝達経路の活性化依存的に癌細胞周囲に存在する間質線維芽細胞で IL-11 が産生されることを見出した（発表準備中）。また、ヒト大腸癌検体をもちいて免疫組織学的解析を行った結果、腫瘍間質領域で IL-11 の発現が確認され、マウスモデルの結果と相関した細胞分化マーカーの発現が見られる事を見出している（発表準備中）。

大腸癌の増悪には、癌細胞だけでなく、その周囲に存在する間質細胞が重要な役割を担っていることが示されつつあるが、不明な点も多い。今回の我々の結果から癌細胞周囲に存在する特異的な間質線維芽細胞がサイトカインのひとつである IL-11 を産生することで、癌形成に寄与していることを見出した。また、この IL-11 の産生機構を阻害剤により抑制すると、癌細胞の増殖抑制や細胞死が認められた。すなわち、IL-11 の産生誘導機構の解明は、大腸癌の新たな治療標的の創出につながる研究基盤になると考えられる。

方　法

1. 大腸癌時における IL-11 産生癌間質細胞の特性の解明

我々が新たに樹立した IL-11 レポーターマウスを用いて、大腸癌形成時における IL-11 産生をイメージングし、腫瘍形成に関わる細胞の特性を明らかにする。具体的に、このマウスは *IL-11* 遺伝子プロモーター及び組織特異的エンハンサー領域下で蛍光タンパク質 EGFP を発現するように組み換えを行ったレポーターマウスである。そして、このマウスに対して、アゾキシメタン（AOM）ならびにデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を用いて、炎症誘発性大腸癌モデルマウスを作出した。加えて、*APC*$^{min/+}$マウスとレポーターマウスを交配し、散発性大腸癌モデルマウスを作出した。さらに、マウスより得られた知見がヒトでも見られるかを明らかにするために、ヒト大腸癌検体（大腸腺腫、早期癌、進行癌）を用いて解析を行った。

2. 大腸癌における IL-11 産生機構の解明

腫瘍形成に関わる IL-11 がどのように産生誘導されているかを阻害剤スクリーニングにより明らかにする。具体的に、AOM および DSS を用いて作出した炎症誘発性大腸癌モデルマウスならびに散発性大腸癌モデルマウスを用いて、腫瘍部で産生が亢進している分子、および活性化しているシグナル伝達経路に対する阻害剤を処理し、その発現への寄与を検討した。

結　果

1. 大腸癌時における IL-11 産生癌間質細胞の特性の解明

腫瘍形成に関わる IL-11 の産生細胞を同定するために、我々が樹立した IL-11 レポーターマウスを用いて炎症誘発性大腸癌モデルマウスを作製、または *APC*$^{min/+}$マウスと交配し散発性大腸癌モデルを作製し、*in vivo* で IL-11 産生細胞の同定を試みた。その結果、IL-11 の産生 EGFP 細胞が腫瘍形成に伴って、腫瘍間質領域に出現することを確認し、フローサイトメトリー及び免疫組織学的解析から産生細胞を各種分化マーカーや特異的細胞表面タンパク質から特徴付けることができた（図 1a、b）。現在は、GFP 陽性細胞を分取し、マイクロアレイ法により、特異的な遺伝子発現を解析している。また、マウス IL-11 を特異的に認識するモノクローナル抗体 IL-11 抗体を用いた免疫染色から、IL-11 レポーターマウスを用いた解析結果と同様の結果が得られた［7］。

加えて、マウスの研究から明らかとなったこれらのマーカー発現が、実際にヒト病理所見と一致するかを、ヒト大腸癌検体（大腸腺腫、早期癌、進行癌）をもちいて免疫組織学的解析を行った。その結果、腫瘍間質領域で IL-11 の発現が確認され（図 1c）、マウスモデルの結果と相関した細胞分化マーカーの発現が見られる事が分かった。また、進行に伴って、IL-11 産生細胞が増大することが示された。

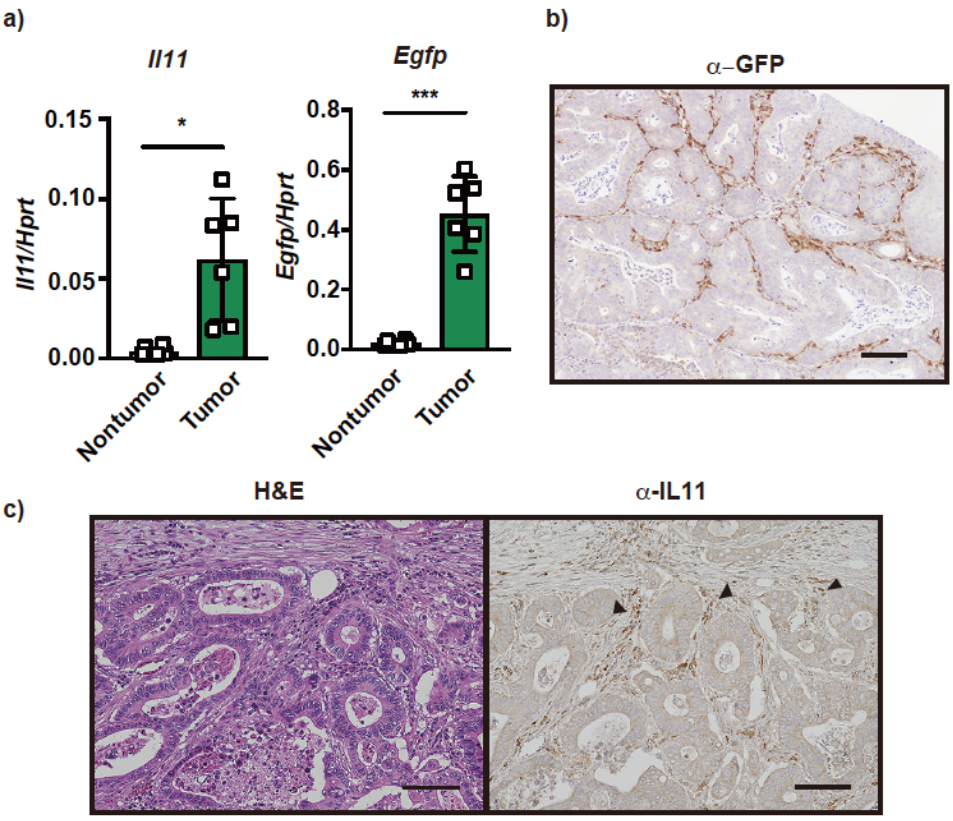


図 1. 大腸腫瘍部に IL-11 産生間質細胞が観察される

a) AOM／DSS 処理を行い、大腸癌を誘発した IL-11 レポーターマウス腫瘍部（Tumor）および非腫瘍部（Nontumor）の qPCR。非腫瘍部と比較して腫瘍部において、IL-11 ならびに GFP の高い発現が認められた。（n=6）得られた結果は、two-tailed unpaired Student t test にて解析。*$p < 0.05$、***$p < 0.001$。

b) AOM／DSS 処理を行い、大腸癌を誘発した IL-11 レポーターマウス腫瘍部。腫瘍部間質に IL-11 を産生する GFP 陽性細胞が観察された。スケールバーは 100 μm。

c) ヒト大腸進行癌検体を用いたヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色ならびに抗 IL-11 抗体を用いた免疫染色。腫瘍部間質細胞領域に、IL-11 産生細胞が観察された。スケールバーは 100 μm。三角形は、陽性細胞を示す。

2. 大腸癌における IL-11 産生機構の解明

どのようにして IL-11 の産生が誘導されているかを明らかにするために、過去の報告から IL-11 の産生誘導することが報告されているサイトカインが、腫瘍部位において高発現しているかを調べた。その結果、報告されている分子において、わずかながらでは腫瘍部における発現亢進が見られた。しかしながら、この分子に対する中和抗体を用いても IL-11 産生に影響が見られなかったことから、他の経路を介して産生が誘導されている可能性が示唆された。そこで、どのようにして IL-11 の産生が誘導されているかを明らかにするために、IL-11 の発現を抑制できる阻害剤の探索を行った結果、ある酵素阻害剤を用いた場合に、IL-11 の発現が腫瘍部で減少することが示された（図 2a）。また、この阻害処理群においては、腫瘍細胞の細胞増殖、ならびに細胞死の亢進が認められた（図 2b、c）。すなわち、この活性化経路を介して、腫瘍形成が促進されることが示唆された。この活性化経路が、IL-11 発現癌関連線維芽細胞において、IL-11 以外の腫瘍形成に関わる分子の発現を制御することで腫瘍形成に関与していることも考えられるので、マイクロアレイ法により同定した IL-11 発現癌関連線維芽細胞において、特異的に発現している分子をより詳細に解析を現在行っている。

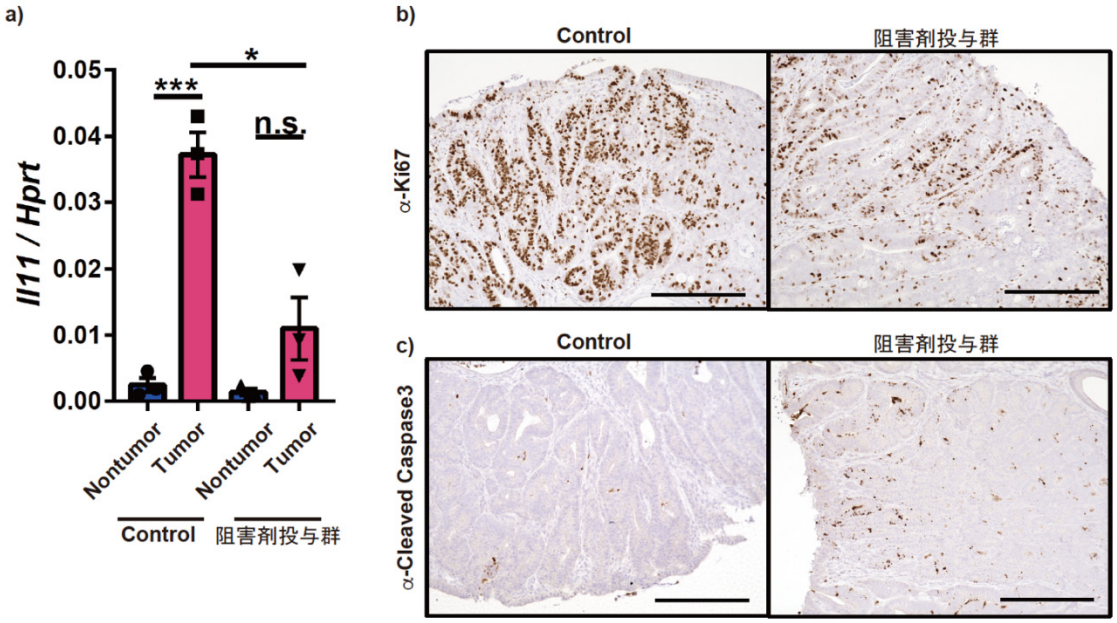


図 2. 阻害剤処理により、IL-11 の発現が抑制し、癌細胞の細胞増殖の抑制、細胞死が亢進する

a) *APC*$^{min/+}$マウス大腸の非腫瘍部（Nontumor）および腫瘍部（Tumor）組織を用いた qPCR。酵素阻害剤投与群においては、Control と比較して IL-11 の発現が減少した。（n＝3）得られた結果は、one-way ANOVA にて解析した。*p < 0.05、***p < 0.001, n.s.: not significant。

b) *APC*$^{min/+}$マウス大腸腫瘍部組織に対する抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色。酵素阻害剤投与群においては、Control と比較して、Ki-67 陽性細胞の減少が認められた。スケールバーは 100 μm。

c) *APC*$^{min/+}$マウス大腸腫瘍部組織に対する抗 cleaved caspase-3 抗体を用いた免疫染色。酵素阻害剤投与群においては、Control と比較し　て、cleaved caspase-3 陽性細胞の増加が認められた。スケールバーは 100 μm。

考　察

大腸癌の増悪には、癌細胞だけでなく、その周囲に存在する間質細胞が重要な役割を担っていることが示されつつあるが、不明な点も多い。今回の我々の結果から癌細胞周囲に存在する特異的な間質線維芽細胞がサイトカインのひとつである IL-11 を産生することで、癌形成に寄与していることを見出した。また、この IL-11 の産生機構を阻害剤により抑制すると、癌細胞の増殖抑制や細胞死の亢進が認められた。すなわち、IL-11 の産生誘導機構の解明は、大腸癌の新たな治療標的の創出につながる研究基盤になると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東邦大学医学部の中野裕康、山﨑創、出口裕、竹田若水、三上哲夫、澁谷和俊、東海大学の大塚正人、兵庫医科大学の大村谷昌樹、順天堂大学の多田昇弘、中村衣里、八木田秀雄、小島裕子、東京薬科大学の田中正人、浅野謙一である（敬称略）。本研究は、上原記念生命科学財団研究奨励金、JSPS 科研費（17K15626、26460397）による研究費助成を受けて行った。研究遂行にご協力いただいた共同研究者にこの場を借りて、感謝申し上げます。また、手厚く助成いただきました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Nishina T, Deguchi Y, Miura R, Yamazaki S, Shinkai Y, Kojima Y, Okumura K, Kumagai Y, Nakano H. Critical Contribution of Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (NRF2) to Electrophile-induced Interleukin-11 Production. J Biol Chem. 2017 Jan 6;292(1) :205-216. doi: 10.1074/jbc.M116.744755. Epub 2016 Nov 21. PubMed PMID: 27872193; PubMed Central PMCID: PMC5217680.

2) Nishina T, Komazawa-Sakon S, Yanaka S, Piao X, Zheng DM, Piao JH, Kojima Y, Yamashina S, Sano E, Putoczki T, Doi T, Ueno T, Ezaki J, Ushio H, Ernst M, Tsumoto K, Okumura K, Nakano H. Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. Sci Signal. 2012 Jan 17;5(207) :ra5. doi:10.1126/scisignal.2002056. PubMed PMID: 22253262.

3) Putoczki TL, Thiem S, Loving A, Busuttil RA, Wilson NJ, Ziegler PK, Nguyen PM, Preaudet A, Farid R, Edwards KM, Boglev Y, Luwor RB, Jarnicki A, Horst D, Boussioutas A, Heath JK, Sieber OM, Pleines I, Kile BT, Nash A, Greten FR, McKenzie BS, Ernst M. Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. Cancer Cell. 2013 Aug 12;24(2) :257-71. doi: 10.1016/j.ccr.2013.06.017. PubMed PMID: 23948300.

4) Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Céspedes MV, Sevillano M, Nadal C, Jung P, Zhang XH, Byrom D, Riera A, Rossell D, Mangues R, Massagué J, Sancho E, Batlle E. Dependency of colorectal cancer on a TGF-β-driven program in stromal cells for metastasis initiation. Cancer Cell. 2012 Nov 13;22(5) :571-84. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.013. PubMed PMID: 23153532; PubMed Central PMCID: PMC3512565.

5) Isella C, Terrasi A, Bellomo SE, Petti C, Galatola G, Muratore A, Mellano A, Senetta R, Cassenti A, Sonetto C, Inghirami G, Trusolino L, Fekete Z, De Ridder M, Cassoni P, Storme G, Bertotti A, Medico E. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. Nat Genet. 2015 Apr;47(4) :312-9. doi: 10.1038/ng.3224. Epub 2015 Feb 23. Erratum in: Nat Genet. 2016 Sep 28;48(10) :1296. PubMed PMID: 25706627.

6) Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llergo A, Espinet E, Hernando-Momblona X,Iglesias M, Sevillano M, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Byrom D, Cortina C, Morral C, Barceló C, Tosi S, Riera A, Attolini CS, Rossell D, Sancho E, Batlle E.Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. Nat Genet. 2015 Apr;47(4) :320-9. doi: 10.1038/ng.3225. Epub 2015 Feb 23. PubMed PMID:25706628.

7) Deguchi Y, Nishina T, Asano K, Ohmuraya M, Nakagawa Y, Nakagata N, Sakuma T, Yamamoto T, Araki K, Mikami T, Tanaka M, Nakano H. Generation of and characterization of anti-IL-11 antibodies using newly established Il11-deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Oct 28;505(2) :453-459. doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.128. Epub 2018 Sep 26. PubMed PMID: 30268501.