

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：皮膚発がんにおける骨髄由来細胞とケモカインの包括的役割解析

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：

種々の臓器において炎症反応の遷延化，すなわち慢性炎症が発癌において重要なステップであることが知られており，皮膚発がんにおいても同様である．そこで，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/200µl 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．また，マクロファージおよびT細胞浸潤も KO マウスで有意に減少していたが，CX3CL1-CX3CR1 シグナルがマクロファージおよびT細胞浸潤に密接に関連し，皮膚発がんにおける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：骨髄由来細胞，ケモカイン，皮膚発癌

1. 研究開始当初の背景

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，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，サイトカイン・ケモカインによる炎症性シグナルの活性化が，がんの発症・進展に関与している．

皮膚は物理的または化学的刺激に対して恒常性を維持するために，その機能は多義に亘っている．特に皮膚組織の機能的・構造的破綻は「創傷」と呼ばれるが，創傷を受けた組織では，破壊された組織・細胞などに対し，修復過程，すなわち Wound healing (創傷治癒) が起こる．しかしながら，慢性炎症のように皮膚組織に対する刺激が継続することは正常な創傷治癒機構を破綻させ，その結果として皮膚組織のがん化が生じる．創傷治癒過程における微小環境と癌の微小環境は，白血球浸潤や線維芽細胞の増殖，血管新生など共通点が多い．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．そこで，遺伝子欠損マウスを用いて慢性炎症による皮膚発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．

2. 研究の目的

申請者らは既に平成 23 年度において，ケ

モカインレセプターの CX3CR1 遺伝子欠損マウスでは皮膚発がんが有意に減弱していたことから，皮膚発がんにおけるケモカインシグナルの重要性を示唆する結果を得ている．これらの研究をさらに発展させ，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 CX3CR1 遺伝子欠損マウスを用いた．

2) 二段階皮膚発がんモデル

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

3) 腫瘍形成

23 年度において CX3CR1 遺伝子欠損マウスでは，皮膚発がんが有意に減弱していたことから，皮膚発がんにおける CX3CR1 陽性細胞の同定およびその由来について骨髄キメラマウスを樹立して，がん幹細胞との関連について検討を行う．

4) 病理組織学および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、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た。また、CX3CL1, CX3CR1, マクロファージ, Tリンパ球, および新生血管を免疫組織化学的に検索した「

5) 遺伝子発現検索

背部皮膚を採取し、リアルタイム RT-PCR 法で遺伝子発現を検索した。

4. 研究成果

1) 野生型マウスにおいて TPA 塗布 2 および 10 週後において、皮膚における CX3CL1 および CX3CR1 の遺伝子発現が有意に上昇していた (図 1)。また、2 重蛍光免疫染色によって、マクロファージが CX3CL1 および CX3CR1 の発現細胞であった。また、CX3CR1 は T 細胞とマクロファージにも発現が認められた (図 2)

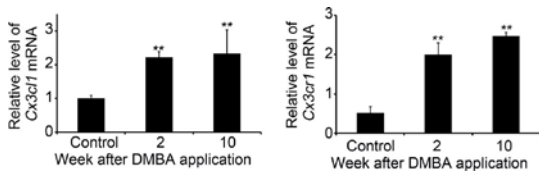


図 1

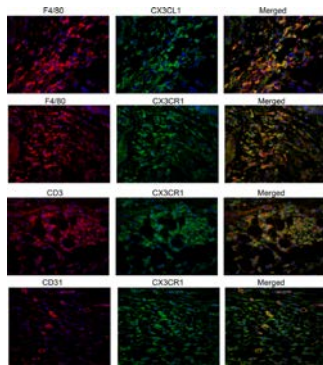


図 2

2) WT マウスでは、乳頭腫形成が TPA 塗布 10 週目以降から観察され、20 週目では薬 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 (図 3)。

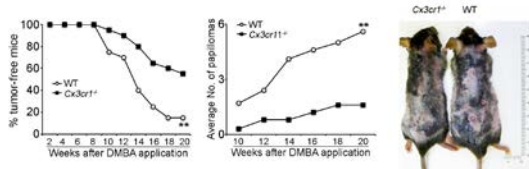


図 3

3) 病理組織学的に WT マウスでは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 (図 4)。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、KO マウスでは、マクロファージ、リンパ球ともに有意に減弱していた。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 (図 5)。

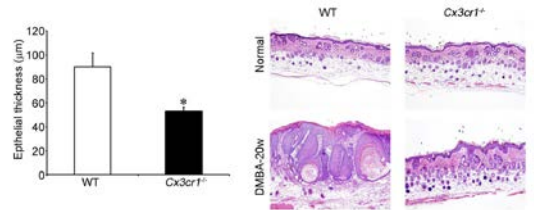


図 4

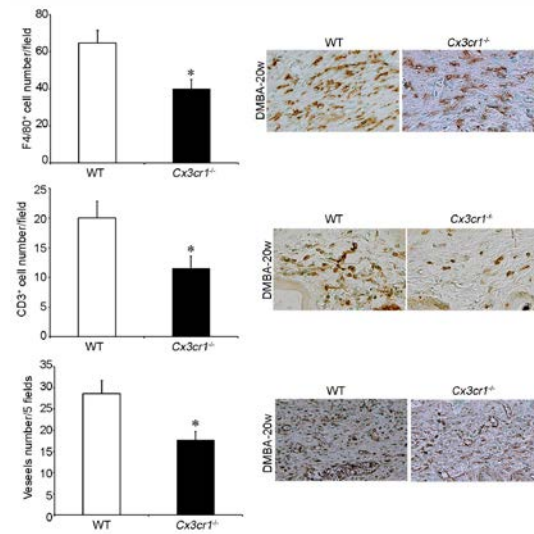


図 5

4) 皮膚局所における CXCL1, CXCL2, IL-1β, IL-6, TNFα 及び COX-2 の遺伝子発現が KO マウスで減弱していた (図 6)。

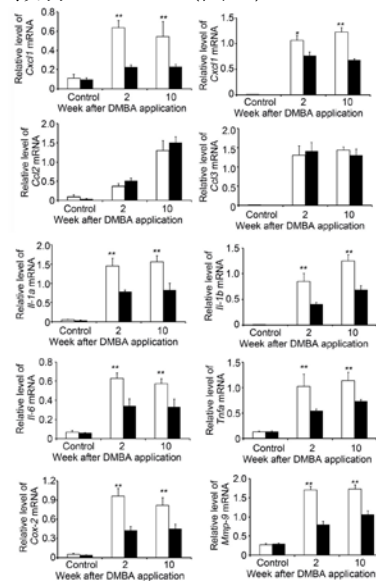


図 6

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 3 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. Kimura A, Ishida Y, Inagaki M, Nakamura Y, Sanke T, Mukaida N, Kondo T. Interferon- γ is protective in cisplatin-induced renal injury by enhancing autophagic flux. *Kidney Int*, 82:1093-104. 2012
3. Lu P, Li L, Liu G, Baba T, Ishida Y, Nosaka M, Kondo T, Zhang X, Mukaida N. Critical role of TNF- α -induced macrophage VEGF and iNOS production in the experimental corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53:3516-26. 2012

[学会発表] (計 3 件)

1. Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Kawaguchi M, Mukaida N, Kondo T. Essential role of CX3CR1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of bone marrow-derived fibocyte infiltration. 10th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research, Geneva, 2012.9
2. Kondo T, Ishida Y, Mukaida N. Pathophysiological roles of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chemical-induced skin carcinogenesis. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, 2012.9
3. Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Kawaguchi M, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Lack of TNF-Rp55 Impairs Thrombus Resolution through Reduced Expression of MMPs and uPA. 45th Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology, Maui, 2012.10

[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法医学教室・教授
近藤稔和

(2) 研究分担者

和歌山県立医科大学法医学教室・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