

京都大学	博士（医学）	氏名	喜安佳之
論文題目	Disruption of CCR1-mediated myeloid cell accumulation suppresses colorectal cancer progression in mice (マウスモデルにおいて腫瘍部への CCR1 陽性骨髄球の集簇を阻害すると腫瘍の増殖・転移が抑制される)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>(目的・方法) 消化管外科学講座ではこれまでに大腸癌臨床検体を用いた検討から、癌抑制遺伝子 SMAD4 が欠失すると癌細胞からケモカイン CCL15 が分泌されることで、腫瘍微小環境にケモカイン受容体 CCR1 陽性の腫瘍関連好中球や骨髄由来免疫抑制細胞などの骨髄球が集簇して大腸癌の浸潤・転移を促進することを報告してきた。本研究では前臨床試験として同系マウスモデル (MC38 皮下腫瘍モデルおよび CMT93 肝転移モデル) を用いて、CCR1 陽性骨髄球の腫瘍への集簇を抑制することが腫瘍の増殖・転移にどのような影響を及ぼすかを検証した。</p> <p>(結果) マウスの末梢血、骨髄における血球細胞の FACS 解析では、CCR1 は好中球や単球には高発現していたがリンパ球には殆ど発現していなかった。まず CCR1 ノックアウト (CCR1 KO) マウスと wild-type (WT) マウスに、ケモカイン CCL9 (ヒトでは CCL15 が相同遺伝子) を発現しているマウス大腸癌細胞株 (MC38 および CMT93) を接種して比較検討したところ、CCR1 KO マウスでは MC38 皮下腫瘍も CMT93 肝転移巣もいずれも WT マウスに比べ有意に抑制された ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。また蛍光免疫染色の検討では、腫瘍周囲に集簇する CCR1 陽性骨髄球はマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP2、MMP9)、免疫抑制酵素 (iNOS)、血管新生因子 (VEGF) を発現していた。次に、WT マウスを放射線照射してのちに CCR1 KO マウスまたは WT マウスの骨髄を移植する骨髄移植モデルにたいし腫瘍細胞を接種して検討したところ、CCR1 KO マウスの骨髄移植群では MC38 皮下腫瘍と CMT93 肝転移巣のいずれもが WT マウスの骨髄移植群に比べ有意に抑制されていた ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。また腫瘍微小環境中に存在する CD8⁺T 細胞、Foxp3⁺制御性 T 細胞、CD31⁺血管内皮細胞、Ly6G⁺好中球の数を計測し定量評価したところ、CCR1 KO マウスの骨髄移植群では MC38 皮下腫瘍および CMT93 肝転移巣のいずれにおいても CD8⁺T 細胞数が有意に増加し、Foxp3⁺制御性 T 細胞数、CD31⁺血管内皮細胞数、Ly6G⁺好中球数が有意に減少していた。さらに、この骨髄移植モデルに抗 PD-1 抗体を投与して MC38 皮下腫瘍の抗腫瘍効果について検討したところ、CCR1 KO マウス骨髄移植群は抗 PD-1 抗体投与群と同程度の抑制効果を示したが、CCR1 KO マウス骨髄移植と抗 PD-1 抗体投与の両者による相乗効果は認めなかった。</p> <p>最後に、CCR1 シグナルを特異的に抑制する抗 CCR1 抗体 (KM5908) を新規開発し、マウス皮下に継続投与 (10 μg/g, 週 2 回) して in vivo モデルにおける KM5908 の抗腫瘍効果について検討した。KM5908 投与群では isotype 投与群に比べ腫瘍周囲に集簇する CCR1 陽性骨髄球数が有意に減少しており、また MC38 皮下腫瘍および CMT93 肝転移巣のいずれもが有意に抑制された ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。</p>			

(結語) 癌微小環境中に集簇する CCR1 陽性骨髄球をターゲットとした抗 CCR1 阻害療法は、SMAD4 の発現が低下した大腸癌に対する新規治療になりえることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

当教室ではこれまでに、大腸癌から癌抑制遺伝子 SMAD4 が欠失するとケモカイン CCL15 が分泌され、ケモカイン受容体 CCR1 陽性の骨髄球が腫瘍周囲に集簇し浸潤・転移を促進することを報告してきた。本研究では同系マウスモデルを用いて CCR1 陽性骨髄球の集簇抑制が腫瘍の増殖・転移に及ぼす影響について検証した。

血球細胞の解析では CCR1 は好中球や単球に高発現していた。まず CCR1 ノックアウト (KO) マウスと wild-type (WT) マウスに、CCL9 (ヒトでは CCL15 が相同遺伝子) を発現しているマウス大腸癌細胞株 (MC38 および CMT93) を接種したところ、WT マウスに比べ CCR1 KO マウスでは MC38 皮下腫瘍も CMT93 肝転移巣も有意に抑制された。また蛍光免疫染色の検討では、腫瘍周囲に集簇する CCR1 陽性骨髄球は MMP2、MMP9、iNOS、VEGF を発現していた。

次に放射線照射後の骨髄移植モデルで検討したところ、CCR1 KO マウスの骨髄移植群では MC38 皮下腫瘍と CMT93 肝転移巣のいずれもが WT マウスの骨髄移植群に比べ有意に抑制されていた。また、CCR1 KO マウスの骨髄移植群では腫瘍微小環境における CD8⁺T 細胞が増加し、Foxp3⁺制御性 T 細胞、CD31⁺内皮細胞、Ly6G⁺好中球が減少していた。

最後に新規開発した抗 CCR1 抗体の抗腫瘍効果について検討した。抗 CCR1 抗体投与群では isotype 投与群に比べ腫瘍周囲に集簇する CCR1 陽性骨髄球数が有意に減少し、MC38 皮下腫瘍および CMT93 肝転移巣のいずれもが有意に抑制された。

以上の研究は大腸癌微小環境の分子生物学的メカニズムの解明に貢献し新たな治療戦略の構築に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 7 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降