

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10116

研究課題名(和文)ケモカインネットワークを標的とした食道癌新規悪性度診断と治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new diagnosis and treatment procedures based on chemokine network for esophageal cancer

研究代表者

竹内 裕也 (Takeuchi, Hiroya)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20265838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌は現行の集学的治療を行ってもなお予後不良な癌腫のひとつである。本研究ではケモカインネットワークを標的とした新たな食道扁平上皮癌悪性度診断法と、新たな癌治療の開発を目指して研究を行った。過去の手術検体を用いた検討では、CXCL12-CXCR4, IL8-CXCR2, CCL5-CCR5のケモカインネットワークがそれぞれ予後不良因子であると同時に、ケモカインネットワークの発現数が多いほど予後不良であることを示した。また、食道扁平上皮癌細胞株を用いた検討では、上記ネットワークの抑制により細胞増殖能を抑制できることを見出し、新たな治療標的となり得る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is one of the deadliest cancers worldwide. The purpose of this study was to develop a new method for evaluating the degree of malignancy of ESCC and a novel therapeutic approach for ESCC focusing on chemokine network. Immunohistochemical analysis of the past surgical specimen revealed that positive expression of CXCL12-CXCR4, IL8-CXCR2, and CCL5-CCR5 were the independent prognostic factors as well as histological stage, and the number of expressing networks had correlation with poor prognosis. Secondly, we reported that the proliferative ability of ESCC overexpressing or exposed to above mentioned chemokine were significantly enhanced compared with wildtype cells in vitro. Third, the antagonists of chemokine receptors inhibited the tumor growth of ESCC in vivo. Taken together, chemokine network was not only a promising biomarker but also a novel molecular target for inhibiting ESCC proliferation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道扁平上皮癌 ケモカイン CXCL12 IL-8 CCL5

1. 研究開始当初の背景

ケモカインは白血球の遊走因子として研究されてきたサイトカインの一種だが、2001年 Muller らによって乳癌の臓器特異的転移にケモカインネットワークの一種である CXCL12-CXCR4 ネットワークが関与していること報告されて以降、ケモカインネットワークを標的として様々な癌腫における癌細胞動態との関連が研究されてきた。我々は予後不良な癌腫のひとつである食道扁平上皮癌に着目し、癌転移の成立機序の解明や新規治療法の開発を目標として研究を行ってきた。先行研究では、食道扁平上皮癌における CCR7 発現がリンパ節転移に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

2. 研究の目的

研究代表者の専門とする食道扁平上皮癌は高率にリンパ節転移や遠隔転移をきたす癌腫であり、現行の集学的治療を行っても予後不良である。本研究では、癌-宿主間でのケモカインネットワークに着目し、食道扁平上皮癌におけるリンパ節転移や血行性転移に関わる分子生物学的因子とその転移成立機序の解明と治療を目的とした。特にこれまでに得られた食道扁平上皮癌における基礎的・臨床的検討により、本研究ではケモカイン・ケモカインレセプターネットワークを標的とした新しい癌治療法と、癌悪性度診断法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 術前未治療の食道扁平上皮癌の切除検体におけるケモカイン(CXCL12, IL-8, CCL5)とそのレセプターの発現を免疫組織染色法により検討し、各々のケモカイン-レセプター発現と臨床病理学的背景、患者予後との関連を検討した。また、ケモカイン-レセプターの発現数と患者予後との関連についても検討した。

(2) 8種の食道扁平上皮癌細胞株におけるケモカインおよびレセプターの mRNA 発現を real time RT-PCR 法にて測定し、レセプターを高発現しケモカインの発現の低い細胞株を選別した。選別した細胞株の培養上清にケモカインを添加したときの細胞増殖の変化を water soluble tetrazolium salt (WST) 法で観察した。また、培養上清にケモカイン選択的アンタゴニストを加えたときの細胞増殖の変化を同様に WST 法で観察した。

(3) プラスミドベクターを用いてケモカインを高発現させた食道扁平上皮癌細胞株を作成し、in vitro での細胞増殖能の変化を WST 法で観察した。

(4) ケモカインを高発現させた食道扁平上皮癌細胞株をヌードマウス背部に皮下注射し、ケモカイン選択的アンタゴニストを投与し腫瘍増殖に変化がみられるか観察した。

4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮癌切除例における食道組織中のケモカインの発現を免疫組織染色法にて検討したところ、CXCL12 陽性は 62 例 (79%)、IL-8 陽性は 24 例 (38%)、CCL5 陽性は 30 例 (47%) であり、それぞれケモカイン陽性例は有意に無再発生存割合が不良であった ($p=0.02$, $p<0.01$, $p=0.02$, 図 1)。多変量解析においても、ケモカイン発現は病理学的因子とは独立した予後不良因子となっていた。また、3種類のケモカインと5種類のレセプターのうちの発現数が多いと、無再発生存割合が有意に不良であった。

(2) 8種の食道扁平上皮癌細胞株(TE1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11)におけるケモカインおよびレセプターの mRNA 発現を real time RT-PCR 法にて測定したところ、TE4 では CXCL12, IL-8, CCL5 の発現が低く、対応するレセプターである CXCR4, CXCR2, CCR5, CCR3, CCR1 が高発現していた。TE4 培養上清にケモカインを添加すると、それぞれ細胞増殖が有意に促進され、それぞれのケモカイン選択的アンタゴニストを添加すると細胞増殖が有意に抑制された(図 2)。

(3) 上記(2)で選別した TE4 にプラスミドベクターを用いて CXCL12, IL-8 を導入すると、細胞増殖が有意に促進された。

(4) CXCL12 を過剰発現させた TE4 の transfectant をヌードマウスの背部に皮下注射し、CXCR4 選択的アンタゴニストである AMD3100 を皮下投与すると、有意に腫瘍増殖が抑制された(図 3)。また、同様に IL-8 を過剰発現させた TE4 の transfectant をヌードマウスの背部に皮下注射し、CXCR2 選択的アンタゴニストである SB225002 を腹腔内投与すると、有意に腫瘍増殖が抑制された。

図 1. 食道扁平上皮癌切除検体における CXCL12 発現と予後

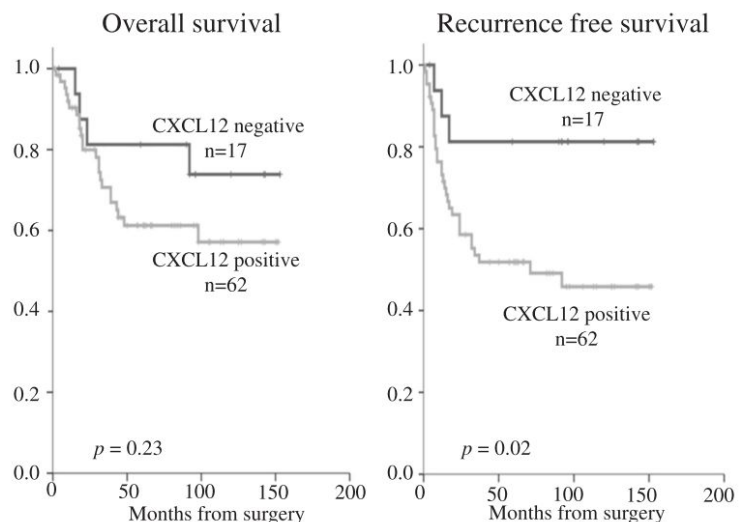


図 2. 食道扁平上皮癌細胞株 TE4 の増殖能の検討：ケモカインネットワーク刺激ないし抑制に対する変化

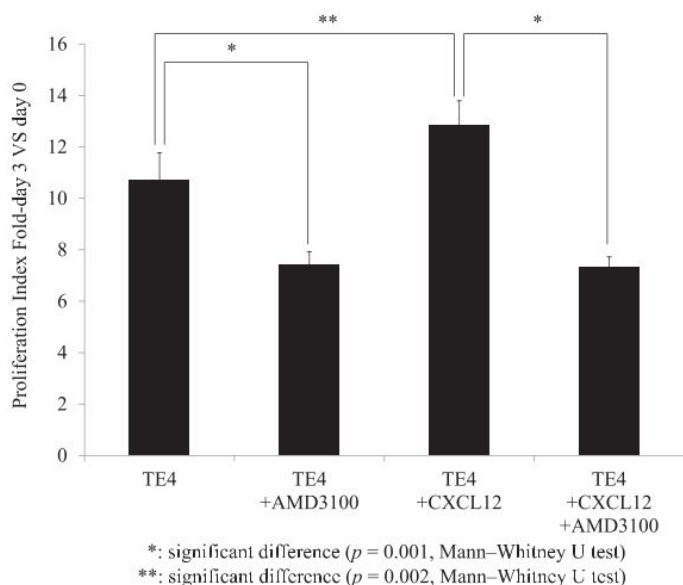
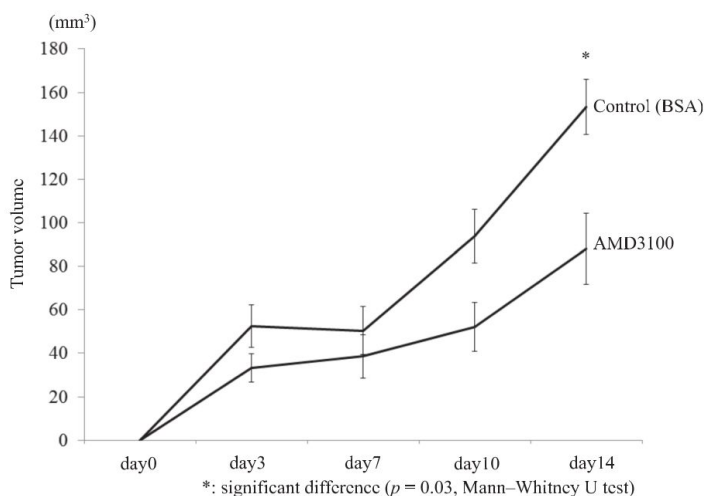


図 3. マウス皮下腫瘍モデルにおける腫瘍増殖能の検討



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 1 件)

Uchi Y, Takeuchi H, Matsuda S, et al. CXCL12 expression promotes esophageal squamous cell carcinoma proliferation and worsens the prognosis. BMC Cancer 2016;16(1):514. doi:

10.1186/s12885-016-2555-z

〔学会発表〕(計 5 件)

発表年月：2015 年 10 月
 発表者：井上 正純，竹内 裕也，他

発表演題：
 食道扁平上皮癌細胞動態における IL-8/CXCR2 network の役割
 学会等名：第 74 回日本癌学会学術集会

発表年月：2015 年 10 月
 発表者：井上 正純，竹内 裕也，他
 発表演題：食道扁平上皮癌細胞動態における IL-8/CXCR2 network の働き
 学会等名：第 53 回日本癌治療学会学術集会

発表年月：2016 年 4 月
 発表者：Masazumi Inoue, Hiroya Takeuchi, et al.
 発表演題：Role of IL-8/CXCR2 network in the tumor cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma
 学会等名：American Association for Cancer Research 107th Annual Meeting 2016

発表年月：2016 年 9 月
 発表者：井上 正純，竹内 裕也，他
 発表演題：Chemokine network と食道扁平上皮癌悪性度・癌細胞動態との関わり
 学会等名：第 27 回日本消化器癌発生学会総会

発表年月：2017 年 11 月
 発表者：井上 正純，竹内 裕也，他
 発表演題：周術期感染性合併症と癌の再発・予後 ケモカインネットワークからみた食道癌周術期と癌転移再発
 学会等名：第 30 回 日本外科感染症学会総会学術集会

〔図書〕(計 1 件)
 井上 正純，竹内 裕也，北川 雄光. ケモカインネットワークからみた術後 SIRS と癌転移再発. Surgery Frontier 22 巻 4 号 p374-377, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

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

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 裕也 (Takeuchi, Hiroya)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20265838

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()