

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591561
 研究課題名（和文） 食道癌における臓器特異性転移機序の解明と新しい癌転移抑制剤の開発
 研究課題名（英文） Chemokine/Chemokine Receptor Axis in Esophageal Cancer Metastasis:
 A Promising Strategy for Anticancer Drug Therapy
 研究代表者
 竹内 裕也（TAKEUCHI HIROYA）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：20265838

研究成果の概要：

癌転移の詳細な機構は未だ解明途上であるが、本研究において我々はケモカイン・ケモカインレセプターネットワークに着目し、特に食道扁平上皮癌における転移との関連を検討した。結果、胸部食道扁平上皮癌におけるケモカインレセプターCCR7の発現とリンパ節転移及び予後は極めて強い相関を示し、これらの分子が癌転移の成立に深く関わっている可能性が示唆された。現在、基礎研究及び癌転移モデルマウスを用いて詳細な転移機構を研究中である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌、食道外科学、免疫学

1. 研究開始当初の背景

がん転移の成立にはがん細胞、宿主、解剖学的・機械的要因の3要素が関わっている。さらにはがん転移の臓器特異性についてはanatomical-mechanical theoryとseed-soil theoryがよく知られている。一般的に固形がんではリンパ行性転移が血行性転移に先行して起こり、リンパ節転移の有無はがんの悪性度を定める因子かつ予後因子として重要視され、外科的治療

においてはリンパ節郭清が実践されている。近年、腫瘍から最初のリンパ流を受けるリンパ節をセンチネルリンパ節とよび、最初のがん微小転移はまずこのセンチネルリンパ節から生じるといふ仮説(sentinel node concept)が提唱された。メラノーマや乳癌ではsentinel node conceptの妥当性が実証され、現在消化器がんその他でも検証が行なわれている。一方センチネルリンパ節はがん細胞に対する局所免疫が最初に起こる場所であり、リンパ節転移成立のメカニズムを解

明するにあたり極めて重要な部位であると考えられる。

我々は現在までこのセンチネルリンパ節を含めたリンパ節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を目的として消化器癌やメラノーマを対象に種々の研究を進めてきた。これまでに VEGF や細胞周期調節遺伝子異常が食道扁平上皮癌のリンパ節転移と有意に相関していることを明らかにした (Clin Cancer Res 1997; Oncol Rep 2001; Int J Cancer 2004)。また大腸癌では c-MET 過剰発現がリンパ節転移と相関しており、c-MET を介したシグナル伝達系が Inhibitory of apoptosis protein である XIAP を活性化させていることを細胞株と臨床検体を用いた実験で明らかにし発表した (Clin Cancer Res 2003; Clin Cancer Res 2005)。さらにリンパ管新生に関与する VEGF-C にも注目し、大腸癌組織でその発現を検討している。

一方メラノーマにおいては転移巣における腫瘍細胞の differentiation melanoma-associated antigen genes (tyrosinase, TRP-2, MART-1) の発現減弱が予後不良因子となることを初めて明らかにした (Cancer Res 2003)。これは転移巣における腫瘍細胞が宿主の免疫機構から逃避する機序と考察される。さらにメラノーマでは本来 chemokine receptor の一種である CCR7 を高率に発現しており、センチネルリンパ節内の high endothelial venules より分泌される chemokine (CCL21/SLC) により有意に遊走しやすくなっていた。また CCR7 を高発現したメラノーマはリンパ節転移と相関があり、CCR7 を発現するメラノーマ細胞はセンチネルリンパ節から分泌される CCL21/SLC によってセンチネルリンパ節へ遊走することが明らかとなった (Clin Cancer Res 2004)。これらの結果はがん転移の seed-soil theory とも合致しており、メラノーマが比較的早期からリンパ節転移を起こす要因の 1 つと考えられる。さらにメラノーマ細胞の chemokine receptor 発現には遺伝子のメチル化、脱アセチル化による epigenetic な調節機構が関与していた (Cancer Res 2005)。また興味深いことにセンチネルリンパ節内でメラノーマ転移巣が大きくなるにつれてセンチネルリンパ節内での CCL21/SLC の発現は有意に減少することが明らかとなった (Clin Cancer Res 2004)。CCL21/SLC は本来 CCR7 陽性の免疫担当細胞 (成熟樹状細胞や naïve T 細胞など) をリンパ節へ遊走させる働きがあり、我々の結果は転移成立時に腫瘍細胞から何らかの形でリンパ節内における CCL21/SLC の分泌が抑制され、宿主の局所免疫を制御しているものと考察され、現在そのメカニズムの解明を進めている。

最近ではやはり chemokine receptor の 1 つで

ある CXCR4 発現が大腸癌で高率に発現しており、臨床検体を用いた検討で CXCR4 発現は大腸癌切除後の予後不良因子であることを明らかにした (J Clin Oncol 2005)。CXCR4 のリガンドであるケモカイン CXCL12 は肝組織中に高発現しており、大腸癌肝転移巣では CXCR4 が有意に高発現していたことから、CXCL12(ケモカイン)-CXCR4(ケモカインレセプター)ネットワークが大腸癌の臓器特異性転移を説明しうる可能性を示した。

従って、本研究はこの chemokine/chemokine receptor axis に注目し、食道癌におけるリンパ節転移及び遠隔転移機構を解明することを目的とすると同時に、その抑制を試みることで新たな癌に対する治療戦略の基礎を築くことにある。現在、臨床医学における治療の 2 大コンセプトは個別化 (individualization) 及び 縮小化・低侵襲 (less invasive) であり、これらをどのように達成するかが今後の医療の重要な課題であることに異論はない。従って、食道癌における chemokine/chemokine receptor の発現を明らかにすることで、chemokine receptor microarray の確立による癌転移予測など、個々の癌患者に合わせた治療へのアプローチが可能となり、レセプターを発現しない癌に対するセンチネルリンパ節ナビゲーションサージェリーと組み合わせた縮小手術など非常に幅広い臨床応用が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌は高率にリンパ節転移、他臓器転移 (肺転移、肝転移) を起こす癌であり、現在行われている手術、放射線療法、化学療法を組み合わせても予後は極めて不良である。本研究は癌-宿主間のケモカインネットワークに着目し、食道癌におけるセンチネルリンパ節を含めた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を目的とする。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、転移抑制剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 消化器癌、特に食道扁平上皮癌に着目し、CXCR2、CXCR4、CCR6、CCR7 などの chemokine receptor 発現を real time RT-PCR assay、Western blot、免疫染色法を用いて mRNA、蛋白レベルで解析する。ま

た chemokine receptor 発現を有する食道癌細胞株にそれぞれの ligand (chemokine) を加え、細胞形態や遊走能、増殖能、浸潤能の変化を観察する。

(2) 食道癌細胞株における chemokine receptor 発現調節因子を同定し、発現調節機構を解明する。とくに低酸素や血管新生に着目して、chemokine receptor 発現の変化を *in vivo*、*in vitro* に観察する。

(3) 食道癌細胞株における chemokine receptor に対するそれぞれのリガンドである chemokine の発現を検討し、autocrine の可能性を検討する。またこの autocrine が食道癌の増殖、浸潤、転移にどのような役割を果たしているか検証する。

(4) 切除された食道癌臨床検体約 100 例におけるこれら chemokine receptor の mRNA、蛋白発現を real time RT-PCR assay、免疫染色法を用いて検討し、臨床病理学的因子（とくにリンパ節転移や他臓器転移）や予後との相関を解析する。また食道癌細胞における複数の chemokine receptor を解析することにより chemokine receptor profile が、患者の転移予測、予後予測を可能するかを検証する。

(5) 腸間膜センチネルリンパ節癌転移ラットも出るにおいて、食道癌センチネルリンパ節微小転移成立時における chemokine と免疫担当細胞の変化を経時的に観察し、転移成立機構を明らかにする。さらに、臨床検体を用いて食道癌センチネルリンパ節と非センチネルリンパ節での chemokine 発現量の比較を行う。

(6) 癌細胞脾注肝転移モデルマウスにおける食道癌肝転移と chemokine/chemokine receptor 発現の関係を解析する。

(7) (5)(6)の動物モデルを使い、HIV 治療薬として開発中の chemokine receptor CXCR4 阻害薬の AMD3100 や 7-transmembrane G-protein binding receptor である T140 を投与した際の、抗腫瘍効果、転移抑制効果を検討する。

4. 研究成果

胸部食道扁平上皮癌におけるケモカインレセプター CCR7 の発現とリンパ節転移及び予後との関連を検討した。対象は当院で根治術を施行した胸部食道扁平上皮癌患者 105 例。これらに対し、抗 CCR7 抗体を用いた免疫組織化学的手法を用いて、その発現を検討した。評価は対象症例の臨床的背景を知らない医

師 2 名により行い、その intensity (スコア 0~2) 及び proportion (スコア 0~3) を評価し、(intensity) × (proportion) 0 で CCR7 陽性と判定し、分類した。結果、CCR7 陽性例は 105 例中 28 例 (26.7%) に認められた。CCR7 陽性例は、リンパ節転移の頻度が有意に高く 28 例中 23 例 (82.1%) に転移を認められた ($p=0.04$)。また、予後に関しても 5 年全生存率 (OS) 及び無再発生存率 (DFS) についても有意な差を認められた (OS/DFS: $p=0.02/p<0.01$)。T1 症例における検討では CCR7 陽性例は 61 例中 17 例 (27.9%)、リンパ節転移率は 17 例中 10 例 (58.9%) で ($p<0.01$)、OS、DFS においても同様に有意な差を認められた (OS/DFS: $p=0.04/p<0.01$)。食道扁平上皮癌における CCR7 発現は、リンパ節転移頻度及び再発生存期間に関して有意な相関を認められた。特に、T1 症例における検討では、EMR 後のリンパ節転移予測因子としても有用である可能性が示唆され、現在当院で試験的に行っている早期食道癌 EMR 症例におけるセンチネルリンパ節理論を用いた低侵襲治療と組み合わせたテーラーメイド治療へ応用できる可能性が示唆された。現在、リンパ節における局所免疫機構など詳細な機能解析などを通じてその役割の解明途上であり、同時に食道癌細胞株を用いたマウスリンパ節転移モデルを作製し、*in vivo* における転移機序の解明も同時に進めている。CXCR4 に関しては、同様に 105 例の検討でリンパ節転移との有意な相関は認められたものの、遠隔転移形式及び予後との相関は認めなかったが、何らかの悪性度に関わる因子として今後も研究を進めていく予定である。

基礎的分野に関しては、食道癌細胞株 TE を用いて *in vitro* で実験を進めた。TE series において real time RT-PCR により細胞株全てにおいて程度の差はあるが、CCR7、CXCR4、CXCR2 の発現を認められた。これらのうち、CCR7、CXCR4 について高発現株と低発現株を選択し、ligand を用いた chemotaxis assay を行ったところ、高発現株において有意な遊走能の亢進が認められた ($p<0.05$)。また、これらをリアルタイムに動態を visualize できるデバイスを用いて観察したところ、ligand を反応させた細胞株はコントロールと比して同様に遊走能の亢進が認められた。また、NOG マウスを用いた食道癌転移モデルマウスを preliminary に作製し、これに成功した。今後はこのモデルを用いて詳細な *in vivo* 転移機構の解明を行っていく予定である。

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)

〔学会発表〕(計 3 件)

入野誠之、竹内裕也、才川義朗、須田康一、安藤崇史、平岩訓彦、吉川貴久、上田政和、北川雄光. 食道扁平上皮癌リンパ節転移におけるケモカインレセプターCCR7 の役割. 第 39 回癌とリンパ節研究会 京都 (2007.10.25)

入野誠之、竹内裕也、才川義朗、安藤崇史、平岩訓彦、吉川貴久、上田政和、北島政樹、北川雄光. 食道扁平上皮癌の臓器特異性転移機構におけるケモカインレセプターCXCR4 の意義. 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 (2007.10.3 - 5)

Irino T, Takeuchi H, Kitagawa Y, Ando T, Hiraiwa K, Yoshikawa T, Ueda M, Kitajima M. CXCR4 Chemokine Receptor 4 Induces Organ-Specific Cancer Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. International Surgical Week ISW 2007 Montreal, Canada (2007.08.26-30)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹内 裕也 (TAKEUCHI HIROYA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20265838

(2)研究分担者

北川 雄光 (KITAGAWA YUKO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：20204878
入野 誠之 (IRINO TOMOYUKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20445216

(3)連携研究者

なし