

平成22年5月25日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790953

研究課題名（和文） ケモカイン受容体 CXCR3 を介した大腸癌進展機構の解析と治療

研究課題名（英文） ~G[X`eb\_X`bY`6[X`b^aX`eXVXcgbe`6K6E&amp;`a`Vb\_ba`VTaVXe`XgTfgTf\`f`

研究代表者

河田 健二 (KAWADA KENJI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90322651

研究成果の概要（和文）：リンパ節転移巣から樹立された大腸癌細胞株 SW620 は同一患者の原発巣から樹立された SW480 と比較し、ケモカイン受容体 CXCR3, CXCR4 はいずれも発現量が増加していた。各受容体とも運動能、浸潤能、増殖能をそれぞれ亢進させるが、興味深い事に我々は CXCR3 からのシグナルを予め刺激した条件では CXCR4 の作用がより増強されることを見出した。この結果は CXCR3 がその単独作用のみならず CXCR4 との相乗的相互作用により大腸癌の悪性化、転移過程に作用する可能性を示唆している。miRNA 法にて CXCR3 単独、CXCR4 単独、CXCR3/CXCR4 の両者、の発現を抑制した 3 種類の安定細胞株を樹立し、マウス転移モデルにおいて転移能がどのように変化するか解析中である。

研究成果の概要（英文）：

The SW480 cell line was derived from a primary Duke B colon cancer, whereas the SW620 cell line was derived from a lymph node metastasis of the same patient. Both CXCR3 and CXCR4 were much higher expressed in the SW620 than in the SW480. Cell migration, invasion and proliferation were induced by interaction of ligands with CXCR3 or CXCR4 in both cell lines. Importantly, CXCR4-induced migration and invasion were promoted when CXCR3 was pre-activated with its ligands in advance. These results suggest that CXCR3 can play a role in colon cancer metastasis by cooperating with CXCR4 synergistically. We established three stable cell lines using miRNA; CXCR3 knockout, CXCR4 knockout and CXCR3/CXCR4 double knockout cell lines. We have compared the metastatic potential of the three cell lines with the control cells by rectal transplantation model in nude mice.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

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：大腸癌、ケモカイン受容体、転移

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ケモカインとその受容体については炎症、感染、アレルギー疾患等の分野ばかりでなく、癌の悪性化、転移にも関与していることが明らかとなってきた。

(2) 申請者らは今までにケモカイン受容体 CXCR3 がメラノーマや大腸癌においてリンパ節転移を促進し予後の悪化に結びつくこと、また CXCR3 と CXCR4 を共発現している症例が最も予後が悪いことを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では大腸癌の悪性化・転移過程に関与するシグナル伝達経路のうちケモカイン受容体、中でも CXCR3 及び CXCR4 に焦点を当て、その分子機構を明らかにするとともにそれらが転移の治療ターゲットに結びつか解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 高い転移能をもつヒト大腸癌細胞株 SW620, Colo205, HT29, HCT116 らは CXCR3 と CXCR4 を共発現している。これらの細胞株をもちいた *in vitro* 実験（細胞増殖能、運動能、浸潤能など）を行い、①CXCR3 ligand のみ、②CXCR4 ligand のみ、③CXCR3 ligand と CXCR4 ligand の両方、を加えた条件で検討し、両受容体の間に機能的相互作用があるかどうか検討する。

(2) CXCR3、CXCR4 の発現抑制が転移を抑制する可能性について大腸癌のマウス転移モ

デルを用いて検討する。miRNA を遺伝子導入することで ①CXCR3 のみ発現抑制、②CXCR4 のみ発現抑制、③CXCR3 と CXCR4 の両者を発現抑制、した3種類の細胞株を樹立し、マウス転移モデルにおいて転移能がどのように変化するか解析する。さらに CXCR3 阻害剤 (AMG487)、CXCR4 阻害剤 (AMD3100) らを用いた解析も行うことで、より臨床応用へ向けた検討も行う。

(3) ヒト臨床検体をもちいた検討。手術切除標本をもちいて正常大腸上皮、大腸癌原発巣、大腸癌転移巣（リンパ節、肝臓、肺）における CXCR3、CXCR4、CXCR3 ligand、CXCR4 ligand の発現について免疫組織染色、定量的 RT-PCR 法にて解析する。

## 4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌細胞株 SW480 と SW620 は、同一患者の原発巣、リンパ節転移巣からそれぞれ樹立されている。両者の genetic background は同一であるにも関わらずその悪性度は大きく異なっており、実際マウス転移モデルにおける転移能（リンパ節、肝臓、肺）は SW480 では 0-10%にすぎないが、SW620 では 70-80%と大きく増加した。

(2) SW480 と SW620 のケモカイン受容体 CXCR3 と CXCR4 の発現量を比較したところ、SW620 では CXCR3 は 10 倍以上に、CXCR4 は 3 倍以上に増加していた。

(3) 細胞増殖能について MTT assay にて評価したところ、CXCR3 と CXCR4 の両受容体を発現している大腸癌細胞株はどれも CXCR3 ligand もしくは CXCR4 ligand を加えた場合には細胞増殖が亢進した。しかしながら

CXCR3 ligand と CXCR4 ligand を合わせて加えても増殖能に有意な変化は認められず、両受容体間には相互作用は認められなかった。

(4) 細胞運動能、細胞浸潤能については CXCR3 ligand もしくは CXCR4 ligand を加えた場合にはいずれも有意に運動能・浸潤能が亢進した。さらに興味深い事に、CXCR3 ligand の刺激条件下では CXCR4 の ligand に対する感受性が亢進することが確認された。これは形質細胞様樹状細胞において CXCR4 ligand による走化作用が CXCR3 ligand が共存する条件下では数倍に増加する報告とも一致している。これらの結果は CXCR3 からのシグナルが予め入る事で CXCR4 の作用がより増強されることを示しており、CXCR3 がその単独作用のみならず CXCR4 との相乗的相互作用により大腸癌の悪性化、転移過程に作用する可能性を示唆している。

(5) MAP キナーゼや PI3 キナーゼといったケモカイン受容体の下流シグナルについても検討したところ、CXCR3、CXCR4 とともにそれらのシグナルを下流にもっていることが確認された。現在はマイクロアレイの網羅的解析と組み合わせ、各受容体の下流で協調的に作用しているシグナルや遺伝子群の同定を進めている。

(6) 大腸癌細胞株 SW620 はヒト大腸癌のリンパ節転移巣から樹立された細胞株で、マウスの直腸に接種する同所性移植モデルにおいて高率(70-100%)に大動脈周囲リンパ節、肝臓、肺へと転移をおこす。我々は miRNA 法を用いて CXCR3 単独、CXCR4 単独、CXCR3/CXCR4 の両者を発現抑制した 3 種類の安定細胞株を樹立した。それぞれの細胞株では各受容体を 80-90%以上発現抑制されていることを蛋白レベル、mRNA レベルの両方で確認できた。現在はこれらの細胞株を使って、マウスモデルにおいて各臓器への転移能がどのように変化するか、微小転移段階から肉眼的転移巣形成段階まで経時的に(癌接種 1 週間後、2 週間後、4 週間後、6 週間後)で解析を行っている。微小転移に関しては定量的 PCR 法にて癌細胞の数を計測し、肉眼的転移巣形成に関しては GFP 導入した細胞株のため蛍光顕微鏡下にて評価している。安定細胞株をもちいた解析の次には、より臨床応用にむけた可能性を検討するため、CXCR3 単独、CXCR4 単独、CXCR3/CXCR4 の両者

を低分子阻害剤をもちいて抑制する事で、上述の転移モデルにおいて各臓器への転移能がどのように変化するか解析を進める事を予定している。

(7) 30 症例の手術標本を用いて正常腸管、大腸癌、転移巣(リンパ節、肝臓)における CXCR3 および CXCR4 の発現について免疫組織染色で検討したところ、リンパ節転移巣においては CXCR3 が、肝転移巣においては CXCR3 と CXCR4 の両者の発現細胞の比率が原発巣と比較し有意に増加していることが確認された。現在検討症例の数を更に増やすとともに、凍結標本をもちいた定量的 RT-PCR 法でも各受容体の発現量の検討を行っている。

## 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ryo Matsusue, Hajime Kubo, Shigeo Hisamori, Kae Okoshi, Hidekazu Takagi, Koya Hida, Keiko Nakano, Atsushi Itami, Kenji Kawada, Satoshi Nagayama, Yoshiharu Sakai. Hepatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis. *Ann Surg Oncol*. 査読有、Vol16. 2009. 2645-2653.
- ② 河田健二、武藤誠、大腸癌の浸潤・転移におけるケモカインシグナル、分子細胞治療、査読無、Vol18, 2009, 31-35.
- ③ 河田健二、細木久裕、坂井義治、武藤誠、大腸癌リンパ節転移におけるケモカイン受容体 CXCR3 発現の意義、*Biotherapy*、査読無、Vol22, 2008, 71-79.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 河田健二、大腸癌の浸潤・転移におけるケモカインシグナル、第 110 回日本外科学会、2010/4/9、名古屋

[図書] (計 1 件)

- Makoto Taketo, Kenji Kawada. Springer, *Cancer drug discovery and development- Chemokine receptors in cancer*. 2009, 63-78.

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/%7Egisurg/>

ヒト臨床検体をもちいた更なる解析のために「大腸癌におけるケモカイン受容体発現の意義」「大腸癌におけるケモカイン受容体 CXCR4 の免疫染色に関する臨床的意義」として京都大学医学部の倫理委員会の承認を受けており、京都大学医学部消化管外科のホームページにも公表している。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河田 健二 (KAWADA KENJI)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90322651