

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21792003

研究課題名 (和文)

CXC型ケモカインSDF-1を標的とした口腔癌に対する増殖転移抑制療法の開発

研究課題名 (英文)

Development of the inhibition therapy against growth and metastasis of oral cancer targeting CXC chemokine, SDF-1

研究代表者 内田 大亮 (UCHIDA DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：20335798

研究成果の概要 (和文)：

口腔癌細胞に対するケモカイン SDF-1 の作用を抑制することにより、その受容体 CXCR7 を介した増殖と CXCR4 を介した転移を集学的に抑制することを試みた。SDF-1 抗体は口腔癌細胞の *in vitro* での足場非依存性増殖を抑制したが、*in vivo* での増殖・転移に影響を与えなかった。一方、CXCR4 特異的阻害剤である AMD3100 は口腔癌細胞の転移を有意に抑制した。以上より、SDF-1 抗体による CXCR4 と CXCR7 の抑制は *in vivo* では困難であるが、CXCR4 特異的阻害剤である AMD3100 は、口腔癌の転移抑制療法に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We have tried to inhibit both growth via CXCR7 and metastasis via CXCR4 by the inhibition of SDF-1 on the oral cancer cells. SDF-1 antibody inhibited the anchorage independent growth of oral cancer cells *in vitro*, but did affect neither growth nor metastasis *in vivo*. However, a CXCR4 specific antagonist AMD3100 significantly inhibited the metastasis of oral cancer cells. These results indicated that inhibition of both CXCR4 and CXCR7 by the SDF-1 antibody is difficult, but AMD3100 may be a potent anti-metastatic therapy in cases of CXCR4-related oral cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：SDF-1, CXCR4, 口腔癌, 転移

1. 研究開始当初の背景

われわれは、口腔癌のリンパ節転移過程において、ケモカインレセプターCXCR4を発現している癌細胞がリンパ節間質の産生するリガンド stromal cell-derived factor (SDF)-1 に引き寄せられながら転移していることを見いだしてきた (Exp Cell Res 290:289, 2003; Lab Invest 84:1538, 2004; Int J Oncol 25:65, 2004; Mol Cancer Res 5:685, 2007)。

SDF-1 は長年 CXCR4 に対する唯一のリガンドとして考えられてきたが、近年新規ケモカインレセプターである CXCR7 が SDF-1 と結合することが明らかにされた。現在のところ SDF-1/CXCR7 システムは、SDF-1/CXCR4 システムとは異なり細胞増殖や細胞接着に関与すると考えられている (J Exp Med 203:2201, 2006)。

われわれは、口腔癌細胞株 7 株を用いて、

CXCR7 の発現を検討したところ、転移能に関係なく、ほぼすべての細胞株において CXCR7 の発現が認められた (未発表データ)。このことは、口腔癌細胞株における CXCR7 の発現が、細胞増殖など癌細胞特有の表現形質を維持するために重要であることを示唆している。これまで本分野においては、多くの研究者達が転移抑制を主目的に CXCR4 を研究してきたが、そのリガンドである SDF-1 自体をブロックできれば、CXCR7 を介した口腔癌の増殖と CXCR4 を介した口腔癌の転移を集学的に阻害できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では CXCR7 が CXCR4 と同様に口腔癌の治療標的分子になりうるか検討した上で、SDF-1 を標的とした口腔癌の新規治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SDF-1 の細胞増殖に与える影響

CXCR4 と CXCR7 を共発現している当研究室所有の口腔癌細胞株 B88 における SDF-1 依存性の足場依存性または足場非依存性の増殖能を MTT 法を用いて評価した。なお、中和作用を有する抗マウス SDF-1 抗体は R&D 社のものを使用した。

(2) SDF-1 抗体による実験的治療

すでにわれわれは B88 細胞をヌードマウス咬筋内に同所性移植すると、高頻度にリンパ節転移を生じることを明らかにしている (Exp Cell Res 290:289-302, 2003, 図1)。本研究でも同様のモデルを用い、SDF-1 抗体による実験的治療を行った。すなわち、200 万個の B88 細胞をヌードマウス咬筋内に同所性移植し、SDF-1 中和抗体による腫瘍増殖抑制効果とリンパ節転移抑制効果を評価した。なお、抗マウス SDF-1 抗体は 1 か月間腹腔内あるいは静脈内に連日投与し、使用濃度は論文記載 (Circulation 110:2924, 2004) の $10 \mu\text{g}/\text{body}$ と倍量の $20 \mu\text{g}/\text{body}$ とした。また、対象として CXCR4 特異的阻害剤である AMD3100 を、 $2.5 \text{ mg}/\text{kg}$ の投与量で連日皮下投与した。腫瘍径、体重変化は週 2 回測定し、リンパ節転移の有無は、1 か月後に屠殺し病理組織学的に検討した。また、リンパ節転移細胞数を $\beta\text{-actin}$ を用いた定量性 PCR により分子生物学的に評価した。



(図 1) 同所性移植モデル

4. 研究成果

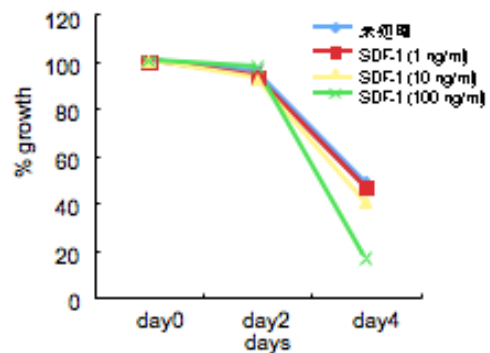
(1) 研究の主な成果

① SDF-1 の細胞増殖に与える影響

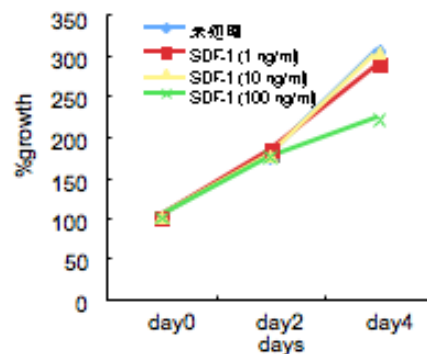
CXCR4 と CXCR7 を共発現している口腔癌細胞株 B88 を用いて、リガンド SDF-1 の細胞増殖に与える影響を検討した。まず、種々の濃度 (1, 10, 100 ng/ml) の SDF-1 が足場依存性増殖に与える影響を MTT assay を用いて検討したが、いずれの濃度においても細胞増殖促進効果は認められなかった (図 2 a, b)。

図 2) SDF-1 の足場依存性増殖に与える効果

a) Serum free

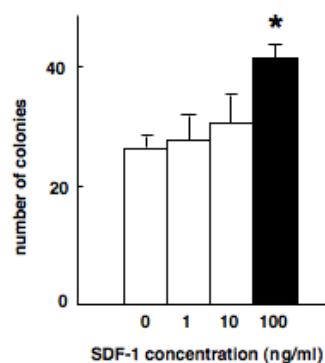


b) 10% FCS



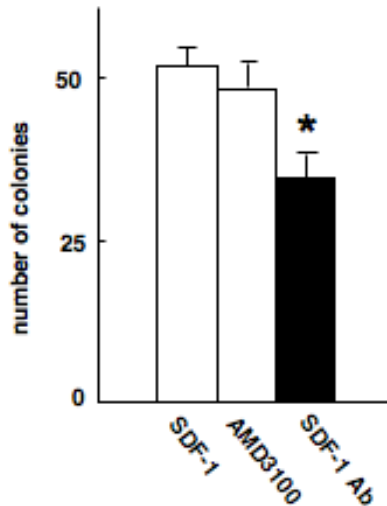
しかしながら、soft agar assay により足場非依存性増殖能に関して検討したところ、100 ng/ml の SDF-1 によりコロニー形成能の促進が認められた (図 3, *; $p < 0.05$)。

図 3) SDF-1 の足場非依存性増殖に与える効果



SDF-1 によるコロニー形成能は、CXCR4 阻害剤である AMD3100 では抑制されなかったが、抗ヒト SDF-1 抗体を添加すると有意に抑制された (図 4, $p < 0.05$) .

図 4) CXCR7 抗体による足場非依存性増殖の抑制



これらの結果より、SDF-1 が CXCR7 を介して足場非依存性増殖を制御している可能性が示唆された。

② SDF-1 抗体による実験的治療

実験に先立ち、非担癌状態のヌードマウスに抗マウス SDF-1 抗体を連日腹腔内投与したが、体重減少などの副作用や臓器不全などの副作用は認めなかった。そこで、咬筋内移植により担癌状態になったヌードマウスに $10 \mu\text{g/body/day}$ の SDF-1 抗体を連日腹腔内投与したが、B88 細胞の増殖・転移いずれに対しても有意な抑制効果は認めなかった (図 5) .

図 5) 抗 SDF-1 抗体が腫瘍の増殖転移に与える影響

| マウス番号 | 腫瘍体積 (mm^3) | 転移リンパ節数 |
|---------|------------------------|----------|
| 1 | 518 | 1 |
| 2 | 628 | 2 |
| 3 | 543 | 2 |
| 4 | 489 | 1 |
| mean±SD | 545±59.8 | 1.5±0.58 |
| 1 | 595 | 1 |
| 2 | 433 | 0 |
| 3 | 478 | 2 |
| 4 | 529 | 2 |
| mean±SD | 509±69.6 | 1.3±0.96 |

本実験は SDF-1 抗体の濃度が 1 点のみであったこと、投与経路が腹腔内であり腫瘍内濃度が上昇しなかった可能性があること、などの問題点があったため、SDF-1 抗体の投与量を倍量の $20 \mu\text{g/kg/body}$ とし、投与経路に関しても腹腔内と静脈内投与を比較した。その結

果、双方の投与経路にて転移細胞数の減少傾向が確認されたが、有意差はなかった。また、咬筋部腫瘍体積においても、抗マウス SDF-1 抗体投与群とコントロール群で有意な差は観察されなかった。しかしながら、比較実験として行った CXCR4 特異的阻害剤である AMD3100 の皮内投与群では、抗マウス SDF-1 抗体投与群と比較して有意な転移抑制効果を認めた (図 6) .

図 6) 抗マウス SDF-1 抗体と CXCR4 阻害剤が腫瘍の増殖転移に与える影響

| | 腫瘍体積 (mm^3) | 転移リンパ節数 |
|---|------------------------|----------|
| 未処理 | 592±31.3 | 1.6±0.5 |
| 抗SDF-1抗体 腹腔内投与 (500 ng/body) | 523±61.2 | 1.5±0.6 |
| 抗SDF-1抗体 静脈内投与 (500 ng/body) | 537±129 | 1.5±1.2 |
| AMD3100 皮内投与 (50 $\mu\text{g/body}$) | 612±53.3 | 0.3±0.5* |

以上の実験結果より、SDF-1 抗体による CXCR4 と CXCR7 の抑制は in vivo では困難であるが、CXCR4 特異的阻害剤である AMD3100 は、in vivo においても CXCR4 の抑制を介した転移抑制効果があることから、転移抑制剤として有用である可能性が示唆された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究結果の一部は、後述のごとく European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), European Cancer Organisation (ECCO), European Association for Cancer Research (EACR), the European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA) の機関誌である European Journal of Cancer (2009 年度 impact factor 4.121) に掲載されたことより、国内外における位置づけは重要と考える。

(3) 今後の展望

本研究実施前、SDF-1 は CXCR4 を受容体とするため、抗マウス SDF-1 抗体は少なくとも転移抑制効果は有すると推察していた。しかしながら、抗マウス SDF-1 抗体は口腔癌細胞の増殖転移に影響を与えず、CXCR4 特異的阻害剤 AMD3100 だけが口腔癌細胞のリンパ節転移を著明に抑制した。この結果は、抗体の組織内濃度の問題も考えられるが、マウス個体が産生する SDF-1 に対する抗マウス SDF-1 抗体の特異性が低かったことに由来するとも考えられる。今後、より特異度の高い SDF-1 抗体を使用することで、本研究結果とは異なる

る結果が得られるかもしれない。

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)

Uchida D, Onoue T, Kuribayashi N, Tomizuka Y, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y. Blockade of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma inhibits lymph node metastases, Eur J Cancer, 査読あり, 47, 2011, 452-459.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

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

内田 大亮 (UCHIDA DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 20335798

(2) 研究分担者: なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者: なし
()

研究者番号: