

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591957

研究課題名(和文)大腸癌におけるケモカイン・ケモカインレセプターの発現とメカニズムの検討

研究課題名(英文)CXCR4-CXCL12 signaling pathway is an important biological mediator in colorectal cancer cells

研究代表者

山口 明夫 (Yamaguchi, Akio)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10174608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌における転移機構として、リンパ行性転移、血行性転移、腹膜転移があり、いずれにおいても癌細胞自身の浸潤能が大きな役割を果たすことが考えられている。今回私どもはCXCR4-CXCL12シグナル伝達について検討を行ったところ、増殖能、浸潤能、管腔(脈管)形成に関与することが認められた。さらに薬剤機能として大腸癌で用いられている5-FUが増殖能、浸潤能を抑制する1つのメカニズムとして癌細胞におけるCXCR4発現を抑制することによりCXCR4-CXCL12シグナル伝達を阻害していることが考えられた。今回大腸癌においてCXCR4因子の新しいメカニズムが見出された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect and mechanism of CXCR4-CXCL12 signaling pathway in colorectal cancer cells. The CXCR4-CXCL12 system plays a role for proliferation, invasion, and tube formation of CXCR4-expressing colorectal cancer cells. Anticancer drug: 5FU inhibited proliferation and invasion activity of the colorectal cancer cells through down-regulation of CXCR4 expression. The CXCR4-CXCL12 signaling is an important biological mediator of colorectal cancer cells, suggesting that it is an important factor for the function of metastatic activity.

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 ケモカインレセプター 浸潤 転移

1. 研究開始当初の背景

近年悪性腫瘍は増加傾向にあり、2人に1人は罹患することが考えられている。その中で特に2012年の大腸癌による死亡者数は男性25,259人、女性21,747人と、半世紀で約8倍の増加となっている。治療としては手術療法、化学療法、放射線療法など進歩しているものの、未だに根治には至っていない。

大腸癌での主な転移形式としては、リンパ行性転移、血行性転移、腹膜転移があるが、いずれにおいても癌細胞自身の浸潤能との関連性が高く、そのメカニズムの解明は新規治療法から癌の撲滅へと発展する可能性が考えられる。

近年ケモカインならびにケモカインレセプターが白血球遊走因子として報告されたが、最近では多様な生物学的活性作用を有することも認められ、腫瘍細胞において浸潤、転移などに関与していることが推測されている。

ケモカインは内皮細胞、T細胞、マクロファージなどから産生され、免疫応答や炎症反応などの身体の維持に重要な因子であると考えられており、これまでに50種類以上が同定されている。大きく分類するとシステイン残基とシステイン残基により形成されるモチーフから4つのsub-family(CXC, CC, CX3C, C)に分類され、その中でCXCL12(Stromal cell-derived factor-1(SDF-1)とも言われている)は、Gタンパク質共役受容体のケモカイン受容体: CXCR4(CXC motif、染色体2q21.352 amino acids、7回細胞膜貫通部分を保有するG蛋白会合型のレセプター)のリガンドと言われている。またこのシグナル伝達系は細胞の発生や白血球遊走に重要な役割を果たすことが知られ、最近では悪性腫瘍の浸潤能、転移能などの悪性度に関与することが考えられている。Zeelenberg(1)はマウスの結腸癌細胞株において Chemokine receptor: CXCR4 の作用を抑制によって、肝臓・肺などの血行性転移能が減弱することを報告し、さらに Kim(2)はヒト大腸癌患者における肝転移巣について CXCR4 発現を検討したところ、低発現の症例と比較して強発現症例では有意に予後が不良となることを報告している。すなわちヒト大腸癌において CXCR4 が転移・予後に関与する重要な分子として考えられることから、今回大腸癌において CXCR4 遺伝子が如何なるメカニズムに関わっているか検討をおこなった。

2. 研究の目的

ケモカインは白血球の遊走化および活

性化因子として作用するサイトカインとして知られている。さらにサイトカインの情報を細胞内に伝達するためにはケモカインレセプターが必要であり、これまでに数十種類が見出されている。また最近では細胞接着、免疫能などの多様な生物学的活性も有していることも考えられており、腫瘍細胞においても重要な作用に働くことが推測されている。特に大腸癌においては CXCR4-CXCL12 シグナル伝達系は転移能との関連性が高いと考えられている。

また悪性腫瘍における生存率に關与する重要な要素として抗癌剤に対する耐性機能がある。その一つの機序として癌細胞内における活性酸素の蓄積が何らかの形で抑制されることにより、癌細胞が酸化ストレスの活性化から回避できるようになることも考えられているが、その詳細は不明な点が多くある。

今回、大腸癌における CXCR4-CXCL12 シグナル伝達系に関する作用、さらに抗癌剤耐性機能を含めた研究は新しい転移浸潤機構ならびに薬剤抵抗性の機序を見出す可能性があり、その意義は大きいと考えて検討を行なうこととした。

3. 研究の方法

(1) 細胞株の培養

大腸癌細胞株(HCT116, LoVo)をRPMI1640(10% fetal bovine serum)を培養液として37℃、5%CO₂下で培養管理を行った。

(2) CXCR4 mRNA の発現の検討

大腸癌細胞株から total RNA を抽出、Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase を用いて cDNA 作製後、ケモカインレセプター: CXCR4 に対する specific primer を用いて CXCR4 mRNA の発現を検討した。

CXCR4-AX:GGAGGGGATCAGTATATACA

CXCR4-BX:GAAGATGATGGAGATGATGG

PCR の設定は denaturation (94 °C, 1 min), annealing (50 °C, 1.5 min), extension (72 °C, 2 min) として 35 サイクル施行した。PCR 産物は 1.2% アガロースゲルまたはアクリルアミドゲルに泳動した。

(3) CXCR4 発現と増殖能の検討

大腸癌細胞株(CXCR4 高発現型)に対して Si-RNA(CXCR4)またはコントロール Si-RNA を Lipofectamine2000 にて導入後(CXCR4 mRNA の発現が抑制されていることを確認)、CXCL12(20ng/ml)を加えて2日培養し、The Cell Titer 96

Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を用いて細胞増殖について検討を行った。

(4) CXCR4 発現と浸潤能の検討

前述と同様に Si-RNA(CXCR4) またはコントロール Si-RNA を導入後、各細胞を Biocoat Matrigel 6-well invasion chamber (BD Biosciences) の上部ウエルに 5×10^4 個の各細胞と CXCL12 を加え、36 時間 37 °C、5%CO₂ 下で培養後、綿棒で Matrigel 上面の細胞を除去した。次いで浸潤細胞を methanol で固定し、Diff-Quick solution(Sysmex, Japan) にて染色して光学顕微鏡下に浸潤細胞数を測定した。

浸潤能に変化が見られるか、検討をおこなった。

(5) CXCR4 発現と血管新生増殖因子: Vascular endothelial growth factor (VEGF)発現の検討

前述と同様に Si-RNA(CXCR4) またはコントロール Si-RNA を導入後、各細胞に CXCL12、24 時間の刺激を加える。次いで RNA を抽出して Light cycler Real time PCR 法にて VEGF mRNA 発現の検討を行った。

(6) CXCR4 発現と Tube formation 形成の検討(In vitro)

前述と同様に Si-RNA(CXCR4) またはコントロール Si-RNA を導入後、各細胞の培養液を Tubular Formation System(KURABO, Japan) のウエルに注入して、Tube formation の形成について検討した。

(7) CXCR4 mRNA の発現の検討

大腸癌細胞株を培養後、抗癌剤: 5-FU を 4,8,12,24,48,72 時間暴露し、上記(2)と同様に CXCR4 mRNA の発現を検討した。

(8) 抗癌剤暴露大腸癌細胞株における CXCL12 による増殖能の検討

大腸癌細胞株(抗癌剤: 5-FU を含む) を 24 時間培養後、CXCL12 加えて培養を継続して、細胞の増殖率を MTS assay にて検討した。

(9) 抗癌剤暴露大腸癌細胞株における CXCL12 による浸潤能の検討

大腸癌細胞株(抗癌剤: 5-FU を含む) を 24 時間培養後、細胞を Biocoat Matrigel 6-well invasion chamber の上部ウエルに 5×10^4 個の各細胞と CXCL12 を加え、36 時間 37 °C、5%CO₂ 下で培養後、綿棒で Matrigel 上面の細胞を除去した。次いで浸潤細胞を

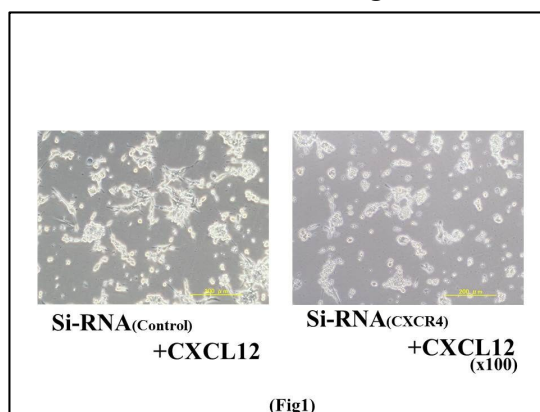
methanol で固定し、Diff-Quick solution にて染色して光学顕微鏡下に浸潤細胞数を測定した。

浸潤能に変化が見られるか、検討をおこなった。

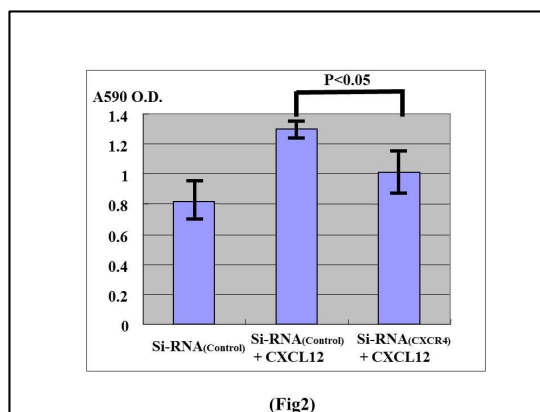
4. 研究成果

(1) 大腸癌細胞株における CXCR4 antagonist: CXCL12 刺激による増殖率の検討

大腸癌細胞株:LoVo(高 CXCR4 発現型)に Si-RNA(Control)または Si-RNA(CXCR4)を導入後、CXCL12 にて刺激を加えた場合の細胞増殖能を検討した結果を(Fig1)に示した。



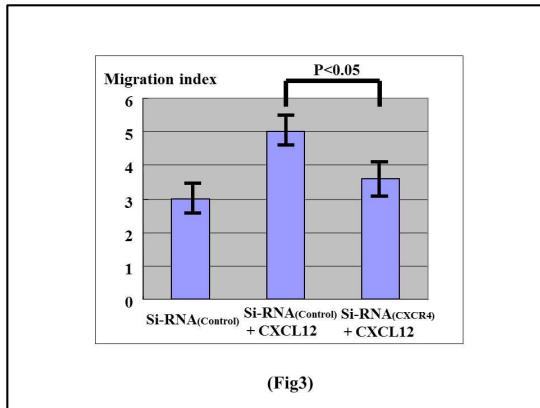
Si-RNA(Control) 導入細胞のみの吸光度は約 0.8 であったのに対して、CXCL12 の刺激を加えた場合には約 1.3 と増加を認めた。さらに Si-RNA(CXCR4)を導入された細胞に CXCL12 の刺激を加えた場合には約 1.0 と増加率が有意に抑制されることが認められた(Fig2)。



(2) 大腸癌細胞株における CXCR4 antagonist: CXCL12 刺激による浸潤能の検討

大腸癌細胞株:LoVo(高 CXCR4 発現型)に Si-RNA(Control) 導入した細胞の Migration index は約 3 であったのに対して、CXCL12 の刺激を加えた場合には約 5 と増加を認めた。さらに Si-RNA(CXCR4)を導入された細胞に CXCL12 の刺激を加えた場合には約 3.5 と増

加率が有意に抑制されることが認められた (Fig3)。



(3) 大腸癌細胞株における CXCR4 antagonist: CXCL12 刺激による血管増殖新生因子の検討

大腸癌細胞株:LoVo(高 CXCR4 発現型)に Si-RNA(Control)または Si-RNA(CXCR4)を導入後、CXCL12 にて刺激を加えた場合の血管増殖新生因子:VEGF mRNA の発現について検討した。Si-RNA(Control) 導入した細胞に CXCL12 の刺激を加えた場合の発現量を 100%とすると Si-RNA(CXCR4)導入細胞に CXCL12 を加えた場合には 47%と有意に VEGF mRNA の発現量が低下することが認められた (Fig4)。

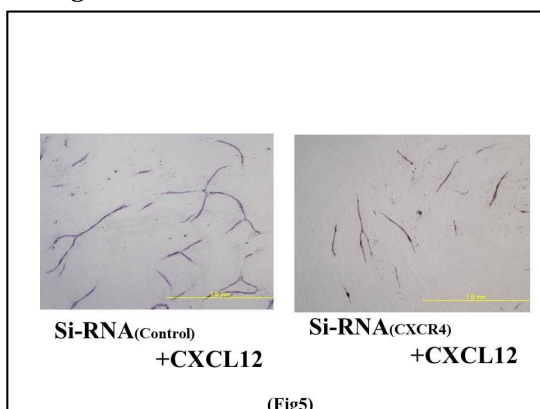
(Light cycler Real time PCR法)

	Concentration (copy)		(1)/(2)	%
	(1)VEGF*	(2)GAPDH		
CXCL12	12.63E+04	3.52E+05	0.36	100%
CXCL12 + Si RNA	5.30E+04	3.15E+05	0.17	47%

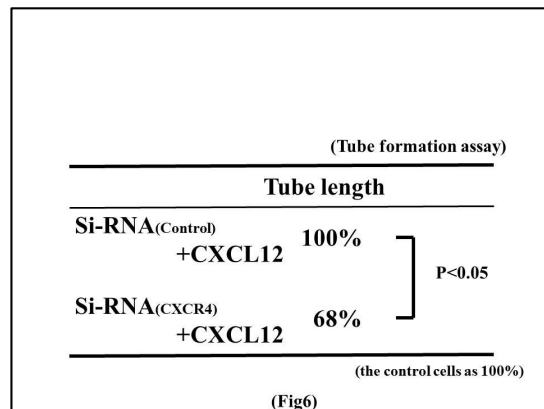
*VEGF: Vascular endothelial growth factor **P<0.05

(4) 大腸癌細胞株における CXCR4 antagonist: CXCL12 刺激による tube formation の検討

(3)で作製した細胞における culture medium を Tube formation chamber に加えて、各々の tube formation の伸張を検討した (Fig5)。

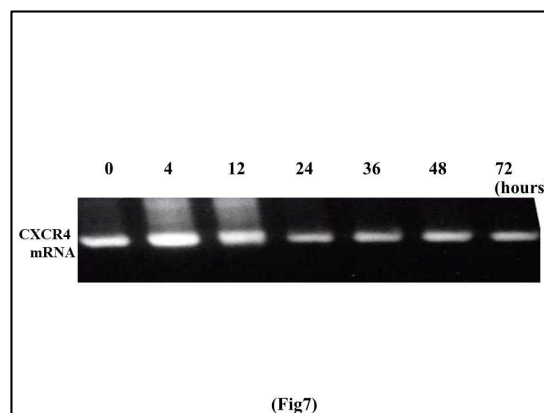


Si-RNA(Control)を導入した細胞での tube formation の伸張を 100%とすると、Si-RNA(CXCR4)を導入した場合には 68%と有意に tube formation の伸張が抑制されることが認められた (Fig6)。



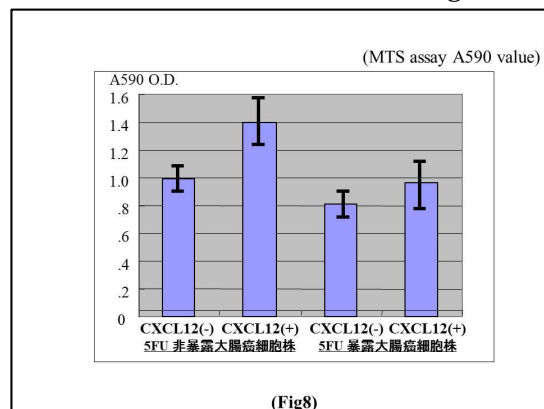
(5) 大腸癌細胞株における 5-FU の暴露と CXCR4 mRNA 発現の検討

大腸癌細胞株:HCT116(高 CXCR4 発現型)の培養液に抗癌剤 5FU を暴露させた場合の CXCR4 mRNA 発現を検討したところ、暴露時間が 24 時間以上になると発現が抑制されることが認められた (Fig7)。



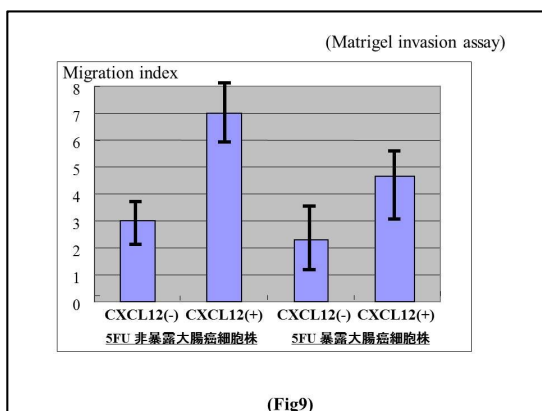
(6) 5-FU の暴露大腸癌細胞における CXCL12 刺激と増殖能の検討

大腸癌細胞株:HCT116 を 5-FU を暴露させない状態で MTS assay による吸光度を測定すると約 1 であったのに対して、CXCL12 の刺激を加えた場合には約 1.4 と有意に増加を認めた。また細胞を 5-FU で暴露させた後の吸光度は約 0.8、5FU 暴露後に CXCL12 の刺激を加えた場合には約 0.95 となり、CXCL12 による細胞増殖率が 5FU の暴露によって低下することが認められた (Fig8)。



(7) 5-FU の暴露大腸癌細胞における CXCL12 刺激と浸潤能の検討

大腸癌細胞株:HCT116 を 5-FU を暴露させない状態での Migration index は約 3 であったのに対して、CXCL12 の刺激を加えた場合には約 7 と増加を認めた。また細胞を 5-FU で暴露させた後の Migration index は約 2.2 であったのに対して、また 5-FU 暴露細胞に CXCL12 の刺激を加えた場合には約 4.7 となり、CXCL12 による細胞浸潤能が 5FU の暴露によって低下することが認められた(Fig9)。



参考文献

1) Kim J, Mori T, Chen SL, Amersi FF, Martinez SR, Kuo C, Turner RR, Ye X, Bilchik AJ, Morton DL, Hoon DS. Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Ann Surg.* 2006 ;244:113-120.

2) Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *CancerRes.* 2003 ;63:3833-3839.

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 10 件)

* corresponding author

Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, Yamaguchi A. Anti-Prokineticin1 (PROK1) Monoclonal Antibody Suppresses Angiogenesis and Tumor Growth in Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology.* 2014 May 17. 査読有

Goi T, Ueda Y, Nakazawa T, Sawai K, Morikawa M, Yamaguchi A. Measures for preventing wound infections during

elective open surgery for colorectal cancer: scrubbing with gauze. *International Surgery.* 99, 2014: 35-39. 査読有

Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, Yamaguchi A. Prokineticin 1 expression in gastrointestinal tumors. *Anticancer Research.* 33, 2013: 5311-5315. 査読有

Kimura Y, *Goi T, Nakazawa T, Hirono Y, Katayama K, Urano T, Yamaguchi A. CD44variant exon 9 plays an important role in colon cancer initiating cells. *Oncotarget.* 4, 2013: 785-791. 査読有

Tabata S, *Goi T, Nakazawa T, Kimura Y, Katayama K, Yamaguchi A. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor strengthens cell invasion ability via prokineticin receptor 2 in colon cancer cell lines. *Oncology Report.* 29, 2013: 459-463. 査読有

Obata S, *Goi T, Nakazawa T, Kimura Y, Katayama K, Yamaguchi A. Changes in CO2 concentration increase the invasive ability of colon cancer cells. *Anticancer Research.* 33, 2013: 1881-1885. 査読有

Aso K, *Goi T, Nakazawa T, Kimura Y, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. The expression of integrins is decreased in colon cancer cells treated with polysaccharide K. *International Journal of Oncology.* 42, 2013: 1175-1180. 査読有

Uwafuji S, * Goi T, Naruse T, Kurebayashi H, Nakazawa T, Hirono Y, Yamaguchi A. Protein-bound polysaccharide K reduced the invasive ability of colon cancer cell lines. *Anticancer Research.* 33, 2013: 4841-4845. 査読有

Fujishima Y, *Goi T, Kimura Y, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. MUC2 protein expression status is useful in assessing the effects of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for peritoneal dissemination of colon cancer. *International Journal of Oncology.* 40, 2012: 960-964. 査読有

Inoue T, *Goi T, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. RIN1-Ras-ERK pathway plays an important role in carcinogenesis in colon cancer cell line LoVo. *Oncology Research.* 19, 2011: 527-534. 査読有

〔図書〕(計3件)

五井孝憲、山口明夫. 手術記録の書き方
S 状結腸癌切除術. 消化器外科 2014.
37: 674-677.

五井孝憲、飯田敦、山口明夫. 結腸癌に
対する細径化鉗子を用いた患者と医師に
優しい reduced port surgery. 臨床雑誌
外科 2013. 75: 938-942.

山口明夫、五井孝憲. 大腸・肛門外科に
おける現況と今後. 日本医師会雑誌
2011. 140: 677-1680.

〔その他〕

ホームページ等

<http://geka1.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山口 明夫 (Yamagichi Akio)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10174608

(2) 研究分担者

五井 孝憲 (Goi Takanori)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60225638