

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591960

研究課題名(和文)ケモカインネットワークに着目した食道癌の新しい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)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20265838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌切除例における食道癌組織中のCXCR4とCXCL12の発現を検討したところ、CXCL12陽性例は有意に術後無再発生存割合が不良であり、多変量解析においても独立した予後不良因子となっていた。食道扁平上皮癌の増殖にはCXCL12/CXCR4ネットワークが関与しており、paracrineだけでなくautocrine systemが関与していることが示唆された。

食道扁平上皮癌切除例におけるCXCR2とCXCL8(IL-8)の発現を検討したところ、CXCR2(+)CXCL8(+)例は腫瘍の進行度と相関し、患者血清IL-8濃度、CRP、FDP、Fibrinogen値が有意に高値を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that a positive CXCL12 expression correlates significantly with a lower recurrence-free survival rate in our esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patient population. These results suggest that CXCL12 expression in ESCC promotes the proliferation of the tumour and has a direct impact on the recurrence rate independently of invasion or metastasis. Furthermore, the fact that both CXCL12 overexpression and CXCL12 exposure similarly promote proliferation denotes that ESCC cells expressing CXCL12 secrete this factor and cell proliferation is stimulated by the binding of CXCL12 to CXCR4 on the cell membrane, via autocrine growth. Increased expression of both CXCL-8 and CXCR-2 correlated with tumor progression, metastasis, higher preoperative levels of proinflammatory cytokines, CRP, activation of exogenous coagulation factors, and poor prognosis in ESCC patients.

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 CXCR4 CXCL8 CXCR2

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決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う仮説 (sentinel node concept) が提唱された。センチネルリンパ節は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、とくに癌-宿主間のケモカインネットワークに着目し、消化器癌(食道癌、大腸癌)を対象に種々の研究を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究は癌-宿主間のケモカインネットワークに着目し、難治性癌である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、腫瘍増殖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悪性度診断法と、癌治療法、転移抑制剤の開発を目指す。

(1) 食道扁平上皮癌におけるケモカイン・ケモカインレセプターアレイを開発し、悪性度診断(再発リスクと予後予測)、治療法選択に有用なプロファイリングを策定する。

(2) 食道扁平上皮癌におけるケモカインレセプターに対する特異的阻害薬の投与により、食道癌転移抑制実験を行う。また autocrine、paracrine の機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 術前未治療の食道扁平上皮癌切除例79例における食道癌組織中のCXCL12とCXCR4の発現を免疫組織染色法により検討し、CXCL12、CXCR4発現と臨床病理学的背景、患者予後との関連を検討した。腫瘍のパラフィン検体を用いて免疫組織染色を施行したが、一次抗体として、抗CXCL12抗体 (MAB350, 1:200; R&D Systems, Minneapolis, USA) と抗CXCR4抗体 (ab2090, 1:500; Abcam Inc, Cambridge, UK)を用いた。発色には、ENVISION

(DAKO)とDAB Kit (DAKO)を用いた。

(2) 食道扁平上皮癌切除例79例における食道癌組織中MIB-1 Index活性を免疫組織染色法により検討した。一次抗体としてKi67 (SP6, 1:200; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)を用いた。

(3) 8種の食道扁平上皮癌細胞株(TE1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11)のCXCL12 mRNA発現を real-time RT-PCR法にて測定した。

(4) 食道扁平上皮癌細胞株TE4をヌードマウス背部に皮下注射し、CXCR4阻害薬 (AMD3100)を定期的に静注し腫瘍増殖に変化が見られるかを観察した。

(5) 食道癌細胞株CXCR4発現株(TE4)培養上清にCXCL12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。

(6) プラスミドベクター pFLAG-CMV-4 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を用いてCXCL12発現プラスミドを作成した。さらにTE4にCXCL12発現プラスミドを遺伝子導入したうえでCXCL12高発現株を作成し、培養上清中のCXCL12を測定した。このCXCL12高発現株の細胞増殖をWST法により親株と比較した。

(7) 食道扁平上皮癌切除例79検体におけるCXCR2とCXCL8(IL-8)の発現を免疫組織染色法により検討した。これらの発現と臨床病理学的因子との関連を検討した。一次抗体として抗CXCR2抗体 (LS-A803, LifeSpan BioSciences, Seattle, WA)、抗CXCL8(IL-8)抗体 (ab18672, Abcam, Cambridge, UK)を用いた。

(8) 術前未治療の食道扁平上皮癌切除例59検体におけるケモカインレセプターCXCR2・CXCR4・CCR7の発現を免疫組織染色法により調べ、Receptor発現数が増加すると無再発生存率、全生存率の関係を検討した。抗CCR7抗体 (Medical and Biological Laboratories, Aichi, Japan)を用いた。

4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮癌切除例79例における食道癌組織中のCXCR4とCXCL12の発現を検討したところ、CXCR4陽性は48例 (61%)、CXCL12陽性は62例 (79%)であった。CXCL12陽性例はCXCR4陽性である割合が高い傾向を示した。

(2) CXCL12陽性例・CXCR4陽性例はそれぞれ細胞増殖の指標であるMIB-1 Indexが陰性例と比較して高く、とくにCXCR4陽性例 (MIB-1 Index 25%)はCXCR4陰性例 (MIB-1 Index 15%)に比べ、有意に細胞増殖が亢進していた。

(3) CXCL12陽性例は有意に術後無再発生存割合が不良であった。多変量解析においても、CXCL12陽性は独立した予後不良因子となっていた。

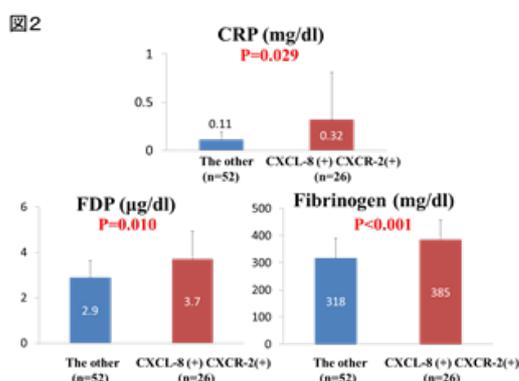
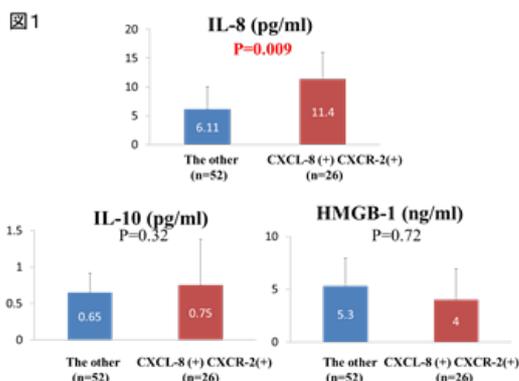
(4) 8種の食道扁平上皮癌細胞株(TE1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11)のCXCL12 mRNA発現を real-time RT-PCR法にて測定したところ、TE6,

8で高発現、TE1, 9, 10で低発現、TE4, 5, 11では中程度発現であった。

(5) 食道扁平上皮癌細胞株TE4をヌードマウス背部に皮下注射し、腫瘍体積を経時的に測定するとともに、CXCR4阻害薬(AMD3100)を定期的に静注したところ、AMD3100投与群で腫瘍増殖が有意に抑制された。

(6) 食道癌細胞株CXCR4発現株(TE4)培養上清にCXCL12を添加すると、細胞増殖が有意に亢進した。一方このTE4にCXCL12発現プラスミドを遺伝子導入し、CXCL12高発現株を作成したところ、CXCL12は培養上清中に高濃度に検出され、細胞増殖は有意に亢進した。これらの細胞増殖亢進はAMD3100投与で有意に抑制されたことから、食道扁平上皮癌の増殖にはCXCL12/CXCR4のparacrineだけでなくautocrine systemが関与していることが示唆された。

(7) 食道扁平上皮癌切除例79検体におけるCXCR2とCXCL8(IL-8)の発現を検討したところ、CXCR2(+)/CXCL8(+)例(26例)は腫瘍の進行度(腫瘍深達度、病理学的リンパ節転移、病期、リンパ管侵襲、脈管侵襲)と相関し、最も予後不良であることが明らかとなった。腫瘍組織中のCXCR2(+)/CXCL8(+)例は患者血清IL-8濃度、CRP、FDP、Fibrinogen値が有意に高値を示した(図1、図2)。



(8) 食道扁平上皮癌切除例59検体におけるケモカインレセプターCXCR2・CXCR4・CCR7の発現を調べたところ、Receptor発現数が増加すると無再発生存率、全生存率ともに

有意に不良となった。

(9) これまでの研究により食道扁平上皮癌におけるケモカインネットワークの腫瘍学的意義が明らかになりつつある。今後、メカニズムの解析とともに他のケモカインシグナルの検討、悪性度診断・治療への応用を模索していく。

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)

1. Ogura M, Takeuchi H, Kawakubo H, Nishi T, Fukuda K, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Saikawa Y, Omori T, Miyasho T, Yamada S, Kitagawa Y: Clinical significance of CXCL-8/CXCR-2 network in esophageal squamous cell carcinoma. Surgery, 査読有 154, 2013, 512-520. DOI: 10.1016/j.surg.2013.06.013

[学会発表](計7件)

1. Takeuchi H, Uchi Y, Ogura M, Nishi T, Irino T, Matsuda S, Inoue M, Fukuda K, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Kawakubo H, Saikawa Y, Omori T, Kitagawa Y. Chemokine and chemokine receptor network in esophageal squamous cell carcinoma. 第25回日本消化器癌発生学会総会, 2014年11月14日, 福岡県福岡市 ホテル日航福岡.
2. 井上正純, 竹内裕也, 中村理恵子, 高橋常浩, 和田則仁, 川久保博文, 才川義朗, 大森泰, 北川雄光. 食道扁平上皮癌における Chemokine receptor 発現と臨床病理学的特徴との関連. 第68回日本食道学会学術集会, 2014年7月3日, 東京都文京区 東京ドームホテル.
3. 井上正純, 竹内裕也, 中村理恵子, 高橋常浩, 和田則仁, 川久保博文, 才川義朗, 大森泰, 北川雄光. 食道扁平上皮癌における Chemokine-Chemokine Receptor 発現と予後との関連性に関する検討. 第69回日本消化器外科学会総会, 2014年7月18日, 福島県郡山市 郡山総合体育館.
4. 小倉正治, 竹内裕也, 川久保博文, 中村理恵子, 高橋常浩, 和田則仁, 才川義朗, 大森泰, 北川雄光. 食道癌における CXCL8 発現と臨床病理学的側面の検討. 第50回日本癌治療学会学術集会, 2012年10月26日, 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜.
5. 内雄介, 竹内裕也, 松田祐子, 中村理恵子, 高橋常浩, 川久保博文, 和田則仁, 才川義朗, 大森泰, 北川雄光. CXCL12-CXCR4 system と食道扁平上皮癌の増殖・予後との関連についての検討. 第50回日本癌治療学会学術集会, 2012年10月26日, 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜.

6. 小倉正治, 竹内裕也, 西知彦, 川久保博文, 中村理恵子, 高橋常浩, 和田則仁, 才川義朗, 大森泰, 北川雄光. 食道癌におけるCXCL8・CXCR2 発現と予後に与える影響. 第 65 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2012 年 10 月 18 日, 福岡県福岡市 福岡国際会議場.
7. 内雄介, 竹内裕也, 松田祐子, 川久保博文, 中村理恵子, 高橋常浩, 和田則仁, 才川義朗, 大森泰, 北川雄光. CXCL12/CXCR4 システムが食道扁平上皮癌の増殖・予後に与える影響についての検討. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日, 北海道札幌市教育文化会館.

〔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〕

なし

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・准教授
研究者番号：20265838