

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591975

研究課題名(和文)大腸癌転移制御におけるケモカイン・シグナル阻害の臨床応用へ向けた展開

研究課題名(英文)Chemokine signaling involved in colon cancer progression

研究代表者

河田 健二(KAWADA, Kenji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90322651

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)：高い転移能をもつ大腸癌細胞株SW620はCXCR3とCXCR4を共発現するが、CXCR3ノックダウン、CXCR4ノックダウン、CXCR3/CXCR4ダブルノックダウンした3種の細胞株を樹立したところ、CXCR3、CXCR4のノックダウンでもリンパ節、肝、肺への転移が抑制されたが、CXCR3/CXCR4ダブルノックダウンでは最も強く抑制された。骨髓球と癌悪性化との関連ではヒト大腸癌肝転移においてSAMD4欠損した転移巣はCCL15を発現し周囲にCCR1陽性骨髓球が集積し、術後の再発リスクが有意に高かった。以上の結果はCXCR3、CXCR4、CCR1の阻害薬が治療に結びつく可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Chemokines and their receptors play key roles in leukocyte trafficking and are also implicated in cancer metastasis. By constructing SW620 cell lines with reduced expression of CXCR3 and/or CXCR4 using microRNA, we investigated in vivo metastatic activities in a mouse rectal transplantation model. CXCR3-, CXCR4-, and CXCR3/CXCR4 double-knockdowns significantly reduced metastasis to lymph nodes, liver and lungs, compared with the control. Importantly, its suppressive effect was significantly stronger in CXCR3/CXCR4 double-knockdowns. Clinical specimens of liver metastasis showed a strong inverse correlation between levels of CCL15 and Smad4. Patients with CCL15-expressing metastases showed significantly shorter times of disease-free survival than those with CCL15-negative metastases.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 ケモカイン 転移

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

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) 癌細胞と間質細胞の相互作用が癌浸潤・転移に与える影響については多くの研究がされているが、なかでも骨髄由来細胞の役割が近年注目されている。

(3) 申請者らは今までに癌細胞に発現するケモカイン受容体 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 を共発現している大腸癌症例が最も予後が悪いこと、などを明らかにしてきた。

(4) 申請者らは今までにマウスモデルにおいて①Apc 遺伝子と Smad4 遺伝子の変異をもつ大腸癌モデルマウスにおいてケモカイン受容体 CCR1 陽性の未分化骨髄球が血中から癌浸潤部先端に集積し癌細胞の浸潤を促進すること、②肝臓に播種した癌細胞が分泌するケモカイン (ヒトでは CCL15) は CCR1 陽性の未分化骨髄球を肝転移巣周囲に引き寄せ、未分化骨髄球はマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP2, 9) を産生し周辺組織を脆弱化することで転移巣の拡大に寄与すること、③CCR1 を発現しない遺伝子改変マウスや CCR1 阻害薬投与により転移巣の拡大は抑制されマウスの生存期間も延長したこと、を報告してきた。このマウスで得られた知見が実際のヒト大腸癌の浸潤、肝転移形成過程においても当てはまるのかを検討するのは、CCR1 阻害剤の臨床応用を考える上で必須である。

2. 研究の目的

本研究では 1)大腸癌細胞に発現する CXCR3、CXCR4 が悪性化、転移過程にどのように関与するか検討を進めるとともに、2)大腸癌肝転移における CCR1 陽性骨髄球の役割についても解析を進め、これらケモカイン・シグナルの抑制が臨床応用へ結びつくか検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1)大腸癌細胞に発現する CXCR3、CXCR4 の役割について

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て in vitro 実験 (細胞増殖能アッセイ、運動能アッセイ (Transwell migration

assay)、浸潤能アッセイ (Matrigel invasion assay) など)を行い、1) CXCR3 ligand のみ、2)CXCR4 ligand のみ、3)CXCR3 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。

②CXCR3、CXCR4 の発現抑制が転移を抑制する可能性について検討する。具体的には miRNA を遺伝子導入することで 1)CXCR3 のみノックダウン、2)CXCR4 のみノックダウン、3)CXCR3 と CXCR4 をダブルノックダウン、した3種類の細胞株を樹立し、in vitro 実験 (前述の細胞増殖能アッセイ、運動能アッセイ、浸潤能アッセイなど)を行ない各受容体の機能やその下流シグナルを検討するとともに、in vivo 実験 (マウス転移モデル)により実際の転移能がどのように変化するかを解析する。

③実際のヒト臨床検体 (正常腸管、大腸癌原発巣、大腸癌肝転移巣、大腸癌リンパ節転移巣)をつかって、CXCR3 および CXCR4 の発現について定量的 RT-PCR 法や免疫組織染色法にて検討する。

2) CCR1 陽性未分化骨髄球の検討

①大腸癌細胞を使って、SMAD4 とケモカイン CCL15 発現との相関性について検討する。具体的には CCL15 のプロモーター解析を行い、SMAD4 が直接 CCL15 発現を制御している機序を、ルシフェラーゼ・アッセイや ChIP-qPCR アッセイで検討する。

②大腸癌細胞を用いて、SMAD4 を強制発現したり、shRNA を遺伝子導入して発現抑制した安定細胞株を樹立する。また CCL15 についても、強制発現したり、shRNA を遺伝子導入して発現抑制した安定細胞株を同様に樹立する。それらの細胞を使って in vitro 実験 (CCL15 発現の変化や TGF-beta シグナルの変化) や in vivo 実験 (マウス同所性接種モデルやマウス転移モデル)を行い、CCL15-CCR1 シグナルと大腸癌悪性化の機序についての解析を進める。

③実際のヒト大腸癌の臨床検体 (大腸癌肝転移巣、原発巣)を使用して、SMAD4、CCL15、CCR1 の免疫染色を行い、それらの間の相関性について検討するとともに、患者予後を含めた臨床病理学的因子との関連性についても解析する。

4. 研究成果

1)大腸癌細胞に発現する CXCR3、CXCR4 の役割について

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両者の genetic background は同一

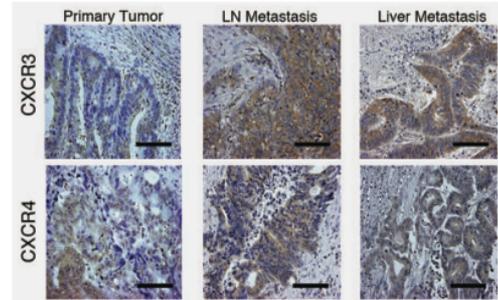
であるにも関わらずその悪性度は SW620 細胞のほうがずっと悪く転移能が高い。SW480 と SW620 のケモカイン受容体 CXCR3 と CXCR4 の発現量を比較したところ、SW620 では CXCR3 は 10 倍以上に、CXCR4 は 3 倍以上に増加していた。次に細胞運動能、細胞浸潤能については CXCR3 ligand もしくは CXCR4 ligand を加えた場合にはいずれも有意に運動能・浸潤能が亢進したが、さらに興味深い事に、CXCR3 ligand の刺激条件下では CXCR4 の ligand に対する感受性が亢進することが確認された。この結果は CXCR3 からのシ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唆している。

②大腸癌細胞株 SW620 は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 ノックダウン、CXCR4 ノックダウン、CXCR3/CXCR4 ダブルノックダウンの 3 種類の安定細胞株を 2 株ずつ樹立し、これらの細胞株を用いてマウスモデル (直腸同所性移植モデル) において各臓器への転移能がどのように変化するかを検討した。原発巣のサイズについては、コントロール株と比較し有意な差はどの細胞株にも認められなかった。一方、転移能についてはコントロール株では大動脈周囲リンパ節、肺、肝臓への転移能がそれぞれ 89%、65%、34% であったのに対し、CXCR3 単独ノックダウン株では 2 株いずれも大動脈周囲リンパ節、肺、肝臓への転移能は 14~29%、14~36%、0~7% と有意に減少した。また CXCR4 単独ノックダウン株では 2 株いずれも肝臓への転移は 0% と劇的に減少したが、大動脈周囲リンパ節および肺への転移は 50~53%、24~44% とコントロール株と比べ減少したものの抑制効果は弱かった。CXCR3/CXCR4 ダブルノックダウン株は 2 株いずれも大動脈周囲リンパ節、肺、肝臓への転移能は 0~24%、14~36%、0~6% と有意に減少したが、CXCR3 ノックダウン株と比較し有意な差は認めなかった (下表参照)。

| Inoculations | No. of metastasis | | |
|----------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | LN (%) | Liver (%) | Lungs (%) |
| SW480 ² | 4/20 (20) | 2/20 (10) | 2/20 (10) |
| SW620 | 11/15 (73) | 7/15 (47) | 10/15 (67) |
| Nonsilencing control | 26/29 (89) | 10/29 (34) | 19/29 (65) |
| miCXCR3-1 | 2/14 (14) | 0/14 (0) | 2/14 (14) |
| miCXCR3-2 | 4/14 (29) | 1/14 (7) | 5/14 (36) |
| Total | 6/28 (21) ^{3,4} | 1/28 (4) ³ | 7/28 (25) ³ |
| miCXCR4-1 | 9/17 (53) | 0/17 (0) | 4/17 (24) |
| miCXCR4-2 | 8/16 (50) | 0/16 (0) | 7/16 (44) |
| Total | 17/33 (52) ³ | 0/33 (0) ³ | 11/33 (33) ³ |
| miCXCR3/CXCR4-1 | 0/18 (0) | 0/18 (0) | 3/18 (17) |
| miCXCR3/CXCR4-2 | 4/17 (24) | 1/17 (6) | 4/17 (24) |
| Total | 4/35 (11) ^{3,4} | 1/35 (3) ³ | 7/35 (20) ³ |

③92 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、定量的 RT-PCR 法で検討したところ、原発巣では Stage が進むにつれて CXCR3、CXCR4 いずれも発現が有意に増加することが明らかとなった。また転移巣の検討では、リンパ節転移巣、肝転移巣のいずれにおいても CXCR3 と CXCR4 の両者とも原発巣に比べ発現がさらに有意に増加することが明らかとなった。

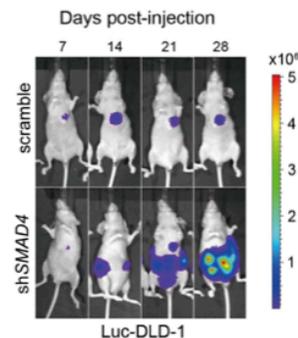


2) CCR1 陽性未分化骨髄球の検討

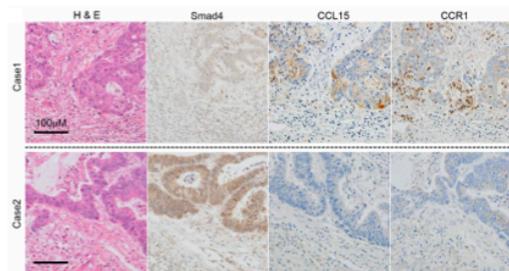
①ヒト大腸癌細胞株では SMAD4 をノックダウンおよび強制発現させることで、CCL15 発現がそれぞれ増加および減少した。さらに CCL15 のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイで、SMAD4 は CCL15 の発現を負に制御することが示された。CCL15 遺伝子のプロモーター解析では、転写開始点より上流 141 塩基の部位にある SBE (Smad binding element) と上流 31 塩基の部位にある TIE (TGF- β inhibitory element) が CCL15 発現を主に調整しており、さらに ChIP assay で Smad4 が CCL15 のプロモーターに直接結合していることが確認された。

②ルシフェラーゼを発現させた大腸癌細胞株を肝転移マウスモデルに使用して bioluminescent imaging で肝転移巣の増大を経時的に評価したところ、SMAD4 をノックダウンした癌細胞では肝転移が促進され、Smad4 を強制発現させた癌細胞ではそれが抑制された。さらに免疫組織染色の検討では Smad4 欠損大腸癌では CCL15 の発現が増加し、肝転移巣周囲に集積する CCR1 陽性骨髄球が有意に増加していることが確認された。CCL15 についても同様にノックダウンおよび強制発現

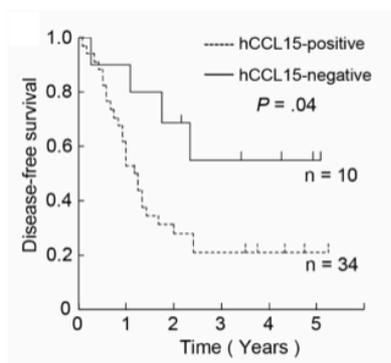
させた癌細胞を樹立したところであり、今後これらの細胞株を使って同様に in vivo モデルでの解析を行なっていく予定である。



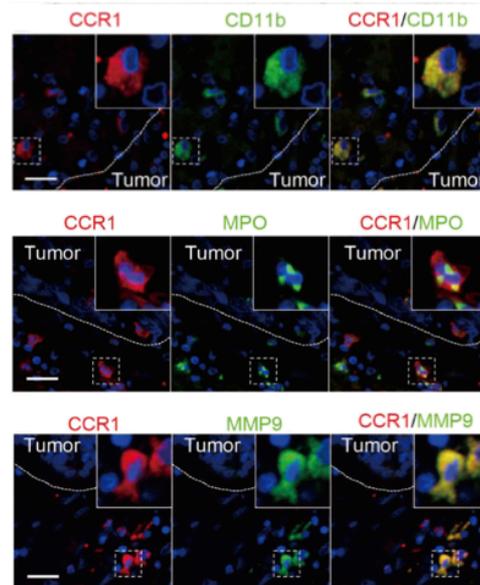
③マウスで観察された現象が実際の人ヒト大腸癌肝転移において当てはまるかを検証するために、実地臨床の大腸癌肝臓転移巣に対する肝臓切除標本（2006年から2010年の55症例，141肝転移巣）をもちいた解析を行なった。大腸癌肝転移巣のうち63%（89/141）ではSMAD4が欠損しており、そのような症例では大腸癌細胞がケモカインCCL15を有意に多く発現している（ $P < 0.01$ ）とともに、CCL15陽性大腸癌肝転移巣ではCCL15陰性のものに比べて転移巣周囲に集積するCCR1陽性骨髄球が3倍以上に有意に増加しており（ $P < 0.01$ ）、また腫瘍径の小さいものほど集積数が多かった（ $P < 0.01$ ）が明らかとなった。



さらに重要なことに、上記の患者のうち治療切除手術が行われた症例（44例）での無病生存期間（disease free survival）を検討したところ、CCL15陽性の大腸癌肝転移巣ではCCL15陰性のものに比べ有意に延長していた（ $P = 0.04$ ）。



さらに肝転移巣周囲に集積するCCR1陽性細胞の特徴を調べるために蛍光二重免疫染色を行ったところ、CCR1陽性細胞はCD11b陽性、MPO陽性である骨髄由来細胞であることが分かった。またマトリックス・メタロプロテアーゼ（MMP2, MMP9）陽性であり、これらの細胞がMMPを分泌し大腸癌肝転移巣の形成・増大に関与していると考えられた。



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 2 件）

①Murakami T, Kawada K, Iwamoto M, Akagami M, Hida K, Nakanishi Y, Kanda K, Kawada M, Seno H, Taketo MM, Sakai Y.
The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis.
Int J Cancer. 査読有、132(2):276-87. 2013
doi: 10.1002/ijc.27670.

②Itatani Y, Kawada K, Fujishita T, Kakizaki F, Hirai H, Matsumoto T, Iwamoto M, Inamoto S, Hatano E, Hasegawa S, Maekawa T, Uemoto S, Sakai Y, Taketo MM.
Loss of Smad4 in Colorectal Cancer Cells Promotes CCL15 Expression to Recruit CCR1+ Myeloid Cells and Facilitate Liver Metastasis.
Gastroenterology 145(5):1064-1075. 2013.
doi: 10.1053/j.gastro.2013.07.033.

〔学会発表〕（計 1 件）

①板谷喜朗、河田健二、他。
Loss of Smad4 in Colorectal Cancer Promotes CCL15 Expression to Recruit CCR1+ Myeloid Cells and Facilitate Liver Metastasis.
American College of Surgeons.
2013/10/6-10/10. Washington DC, USA

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

「大腸癌におけるケモカイン受容体発現の意義」「大腸癌進展過程におけるケモカイン受容体 CCR1 陽性骨髄球の役割の検討」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。

<http://gisurg.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

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・講師
研究者番号：90322651

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし