

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10192

研究課題名(和文) 臨床応用を目的としたゲムシタビン耐性膵癌における癌幹細胞マーカーCXCR4の検討

研究課題名(英文) Investigation of cancer stem cell marker CXCR4 in gemcitabine-resistant pancreatic cancer

研究代表者

竹山 廣光 (Takeyama, Hiromitsu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・名誉教授

研究者番号：00216946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌に対する化学療法はゲムシタビン(Gem)が広く使用されているが、その効果は十分に満足いくものではなく、その理由には耐性化があげられる。我々はGem耐性膵癌細胞株の樹立に成功し、DNAマイクロアレイで耐性化に伴い癌幹細胞マーカーであるCXCR4の発現が増強することを確認した。またCXCR4が癌間質相互作用を介しGem耐性膵癌の増殖・浸潤に関与していることをつきとめ、これはCXCR4 antagonistなどといったCXCR4シグナルの制御により抑制されることを確認した。以上よりCXCR4の制御がGem耐性膵癌においても新規治療薬の標的となるという新しい知見を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Gemcitabine (Gem) is widely used for chemotherapy for pancreatic cancer, but the effect is not fully satisfactory, and the reason is resistance. We succeeded in establishing a Gem-resistant pancreatic cancer cell line and confirmed that the expression of CXCR4, a cancer stem cell marker, is enhanced along with resistance with DNA microarray. We also found that CXCR4 is involved in the proliferation and infiltration of Gem-resistant pancreatic cancer via cancer stromal interaction, which was confirmed to be suppressed by control of CXCR4 signal such as CXCR4 antagonist. Based on the above findings, we found a new finding that control of CXCR4 is a target for novel therapeutic drugs in Gem-resistant pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科，肝胆膵外科

キーワード：膵癌 ゲムシタビン耐性 CXCR4 CXCR4 antagonist 新規膵癌治療薬

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌に対する化学療法はゲムシタピン(Gem)が広く使用されているが、その効果は十分に満足いくものではなく、その理由にはGemに対する耐性化がある。我々はそのメカニズムの解明のため、Gem耐性の膵癌細胞株の樹立に成功した。さらにGem耐性化に伴い、DNAマイクロアレイにより膵癌の癌幹細胞マーカーであるCXCR4の発現が増強していることを発見した。一方、今までにCXCL12/CXCR4シグナルが膵癌の増殖・血管新生に重要な役割を果たしていることを報告し、レセプター中和抗体(CXCR4 Ab)や低分子化合物が腫瘍抑制効果を持つことを確認している。

### 2. 研究の目的

これまでの研究成果を踏まえ、Gem耐性化によってCXCR4の発現が増強した膵癌に対して、CXCL12/CXCR4シグナルの制御が新たな分子標的薬剤としての役割を果たすことを検討し、臨床応用を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞株におけるGem耐性によるCXCR4発現の変化を検討する。

qPCRによるCXCR4 mRNA発現の変化を検討する。

免疫蛍光細胞染色(ICC)による細胞膜上のCXCR4タンパクの変化を検討する。

(2) Gem耐性化による膵癌細胞株の分子生物学的特徴の変化とCXCL12/CXCR4 axisの関与を検討する。

Gem-SおよびGem-Rの増殖能変化を増殖試験(WST-1 assay)で検討する。

Gem-SおよびGem-Rの浸潤の変化を浸潤実験(Matrigel invasion assay)で検討する。

CXCL12刺激の代わりに、線維芽細胞との共培養を行い、同様にGem-RとGem-Sの浸潤能の変化を比較し、CXCR4 antagonistの効果を検討する。

(3) ノドマウス皮下移植モデルでGem-SとGem-Rの腫瘍増殖能とGem投与による変化を検討する。

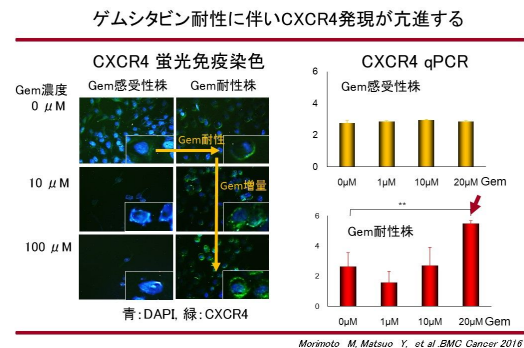
### 4. 研究成果

(1) 以下の結果から、膵癌はGemの耐性ととも CXCR4 の発現が亢進することが確認できた。さらにGem-RはGem刺激によりCXCR4の発現がさらに亢進することも確認できた。今までに我々は、膵癌はCXCL12/CXCR4シグナルを介して浸潤能・血管新生が亢進することを確認し、このシグナルの制御が抗腫瘍効果をもつことを報告している。今回の研究で、Gem耐性膵癌において、CXCL12/CXCR4シグナルが治療のターゲットとなり得ることを見出した。

Gem感受性膵癌細胞株(Gem-S)はGem刺激でCXCR4発現が低下したが、Gem耐性膵癌細胞株(Gem-R)はCXCR4発現がGem刺激で濃度依

存的に亢進した。

PCRの結果と同様に、Gem-SはGem刺激でCXCR4の発現の変化を認めなかったが、Gem-RはGem刺激で細胞膜上のCXCR4発現の亢進を認めた。



### (2)

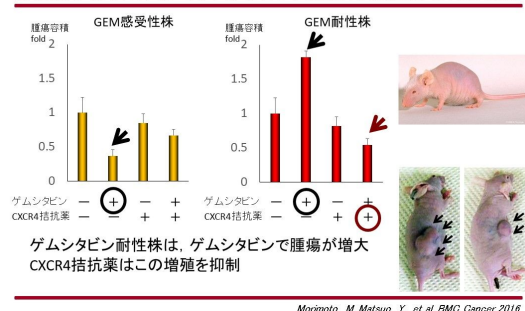
In vitroでは両群にあきらかな増殖能の変化を認めなかった。

CXCL12刺激で、両群とも浸潤能が亢進したが、Gem-Rの方が有意にGem-Sに比べ浸潤能が高く、これはCXCR4 antagonistによって有意に抑制された。

CXCL12より線維芽細胞との共培養によりGem-Rの浸潤能は有意に亢進した。この浸潤能はGem-RにおいてGem刺激によりさらに亢進した。またこの亢進はCXCR4 antagonistにより抑制された。

(3) Gem-SはGemの投与により腫瘍の増大は抑制されるが、Gem-RはGemの投与によりかえって腫瘍が増大するという事実をつきとめた。これは、Gem耐性獲得後にGemを使い続けると、かえって腫瘍をさせるという日常診療でまれに経験する事実と一致した。さらにGem+CXCR4拮抗薬により、Gem-RのGem単独投与による腫瘍増生を抑制し、コントロールより腫瘍をより縮小することを確認した。

### 膵癌皮下移植モデルでゲムシタピンとCXCR4拮抗薬の作用を検討



以上の結果より、in vitroからin vivoにわたり、Gem耐性に伴いCXCR4の発現が亢進し、その制御がGem耐性後膵癌の新規治療薬の標的となるとという新しい知見を見だし、BMC Cancerに論文を発表した。

### 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 10 件)

Ishiguro H, Wakasugi T, Terashita Y, Sakamoto N, Tanaka T, Mizoguchi K, Sagawa H, Okubo T, Takeyama H. Decreased expression of CDH1 or CTNNB1 affects poor prognosis of patients with esophageal cancer. World Journal of Surgical Oncology 査読有 2016 年 14:1-8

Sato T, Matsuo Y, Shiga K, Morimoto M, Miyai H, Takeyama H. Factors that predict the occurrence of and recovery from non-alcoholic fatty liver disease after pancreatoduodenectomy. Surgery 査読有 2016 年 160:318-330

Saito S, Ishiguro H, Kimura M, Ogawa R, Miyai H, Tanaka T, Mizoguchi K, Takeyama H. Clinical significance of NOTCH1 intracellular cytoplasmic domain translocation into the nucleus in gastric cancer. Biomedical Reports 査読有 2016 年 5:344-348

Takahashi H, Hara M, Tsuboi K, Sagawa H, Ishiguro H, Matsuo Y, Takeyama H. Laparoscopically resected obturator nerve schwannoma: A case report. Asian Journal of Endoscopic Surgery 査読有 2016 年 307-310

Morimoto M, Matsuo Y, Koide S, Tsuboi K, Shamoto T, Sato T, Saito K, Takahashi H, Takeyama H. Enhancement of the CXCL12/CXCR4 axis due to acquisition of gemcitabine resistance in pancreatic cancer: effect of CXCR4 antagonists. BMC Cancer 査読有 2016 年 16:1-13

松尾洋一, 社本智也, 森本守, 坪井謙, 佐藤崇文, 齊藤健太, 今藤裕之, 竹山廣光 Natural food を科学する ~ Zerumbone の膵癌に対する化学予防と抗腫瘍効果 ~ 栄養 - Trends of Nutrition - 査読無 2016 年 1:16-19

Sato T, Matsuo Y, Shiga K, Saito K, Morimoto M, Miyai H, Takeyama H. Laparoscopic resection of retroperitoneal lymphangioma around the pancreas: a case report and review of the literature. Journal of Medical Case Reports 査読有 2015 年 9:1-4

Sagawa H, Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yamashita Y, Suzuki S, Sato S, Shiomu K, Kato A, Kuno T, Matsuo Y, Kimura M, Takeyama H, Takahashi S. Connexin 32 and luteolin play protective roles in non-alcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats. Carcinogenesis 査読有 2015 年 36:1539-1549

Morimoto M, Hayakawa T, Kitagami H, Tanaka M, Matsuo Y, Takeyama H. Laparoscopic-assisted total gastrectomy for early gastric cancer with situs inversus totalis: report of a first case. BMC Surgery 査読有 2015 年 15:1-7

溝口公士, 竹山廣光 がん と EPA 日本静脈経腸栄養学会雑誌 査読有 2015 年 30:941-946

〔学会発表〕(計 21 件)

松尾洋一, 森本守, 坪井謙, 社本智也, 佐藤崇文, 齊藤健太, 今藤裕之, 高橋広城, 石黒秀行, 瀧口修司 膵癌肝転移能に関わる血管新生の役割とサイトカインネットワーク 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会 グランキューブ大阪 大阪府立国際会議場 (大阪府大阪市) 2017 年 7 月 27 日 - 2017 年 7 月 28 日

齊藤健太, 松尾洋一, 森本守, 坪井謙, 社本智也, 佐藤崇文, 大久保友貴, 前田祐三, 今藤裕之, 竹山廣光 Xanthohumol の膵癌細胞株における NF- $\kappa$ B シグナルを介した抗腫瘍効果に対する検討 第 72 回日本消化器外科学会総会 石川県立音楽堂ほか (石川県金沢市) 2017 年 7 月 20 日 - 2017 年 7 月 22 日

松尾洋一, 森本守, 佐藤崇文, 齊藤健太, 今藤裕之, 坪井謙, 社本智也, 坂本宣弘, 石黒秀行, 高橋広城, 竹山廣光 膵癌における血管新生因子発現に関する IGF-1 シグナルの役割 第 48 回日本膵臓学会大会 京都市勧業館みやこめっせ (京都市) 2017 年 7 月 14 日 - 2017 年 7 月 15 日

松尾洋一, 今藤裕之, 齊藤健太, 佐藤崇文, 坪井謙, 社本智也, 森本守, 小出修司, 竹山廣光 膵癌の early biomarker としての Lipocalin-2 の役割とシグナルの解明 第 117 回日本外科学会定期学術集会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2017 年 4 月 27 日 - 2017 年 4 月 29 日

松尾洋一, 今藤裕之, 齊藤健太, 佐藤崇

文, 坪井謙, 社本智也, 森本守, 小出修司, 竹山廣光 ケモカインを標的とした Gemcitabine に続く次世代膵癌治療薬の開発 第 103 回日本消化器病学会総会 京王プラザ (東京都新宿区) 2017 年 4 月 20 日 - 2017 年 4 月 22 日

松尾洋一, 森本守, 坪井謙, 社本智也, 佐藤崇文, 齋藤健太, 高橋広城, 石黒秀行, 若杉健弘, 坂本宣弘, 田中達也, 佐川弘之, 寺下幸夫, 竹山廣光 膵癌血管新生における Gro の役割 第 14 回日本消化器外科学会大会 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市) 2016 年 11 月 3 日 - 2016 年 11 月 6 日

松尾洋一, 森本守, 小出修司, 齋藤健太, 佐藤崇文, 坪井謙, 社本智也, 高橋広城, 竹山廣光 Gemcitabine 耐性に伴う膵癌血管新生・浸潤能の変化とサイトカインシグナルの役割 第 25 回日本がん転移学会 学術集会・総会 米子コンベンションセンター BiG Ship (鳥取県米子市) 2016 年 7 月 21 日 - 2016 年 7 月 22 日

松尾洋一, 森本守, 坪井謙, 社本智也, 佐藤崇文, 齋藤健太, 高橋広城, 石黒秀行, 若杉健弘, 竹山廣光 膵癌血管新生における ENA-78/CXCL5 の役割 第 71 回日本消化器外科学会総会 徳島県郷土文化会館あわぎんホール (徳島県徳島市) 2016 年 7 月 14 日 - 2016 年 7 月 16 日

松尾洋一, 森本守, 佐藤崇文, 坪井謙, 社本智也, 齋藤健太, 高橋広城, 若杉健弘, 竹山廣光 膵癌発癌に関わる血管新生因子 ~Kras 点突然変異の役割と下流シグナルの解明 第 116 回日本外科学会定期学術集会 グランキューブ大阪 大阪府立国際会議場 (大阪府大阪市) 2016 年 4 月 14 日 - 2016 年 4 月 16 日

佐藤崇文, 齋藤健太, 志賀一慶, 森本守, 松尾洋一, 竹山廣光, 小出修司, 友田佳介, 岡田祐二, 石川雅一 腹腔鏡下に脾の血流を温存しながら脾動脈瘤を切除し得た一例 第 7 回膵臓内視鏡外科研究会メルパルク京都 (京都府京都市) 2015 年 12 月 13 日

佐藤崇文, 松尾洋一, 前田祐三, 大久保友貴, 齋藤健太, 志賀一慶, 溝口公士, 佐川弘之, 坪井謙, 森本守, 原賢康, 高橋広城, 石黒秀行, 竹山廣光 腹腔鏡下に診断および治療しえた膵周囲嚢胞性リンパ管嚢腫の一例 第 28 回日本内視鏡外科学会総会 グランキューブ大阪 大阪府立国際会議場 (大阪府大阪市) 2015 年 12 月 10 日 - 2015 年 12 月 12 日

松尾洋一, 森本守, 佐藤崇文, 坪井謙, 社本智也, 齋藤健太, 竹山廣光 癌-間質相互作用からみた膵癌発癌における K-ras mutation の役割 第 26 回日本消化器癌発生学会総会 ANA CROWNE PLAZA YONAGO (鳥取県米子市) 2015 年 11 月 19 日 - 2015 年 11 月 20 日

佐藤崇文, 松尾洋一, 志賀一慶, 溝口公士, 坪井謙, 森本守, 宮井博隆, 高橋広城, 木村昌弘, 竹山廣光 膵頭十二指腸切除術後の脂肪肝に対する膵酵素剤の予防効果について 第 70 回日本消化器外科学会総会 公益財団法人浜松市文化振興財団アクトシティ浜松 (静岡県浜松市) 2015 年 7 月 15 日 - 2015 年 7 月 17 日

松尾洋一, 柴田孝弥, 坪井謙, 社本智也, 森本守, 佐藤崇文, 高橋広城, 石黒秀行, 木村昌弘, 竹山廣光 膵癌における Lipocalin-2 の発現と分子生物学的特徴の検討 第 70 回日本消化器外科学会総会 公益財団法人浜松市文化振興財団アクトシティ浜松 (静岡県浜松市) 2015 年 7 月 15 日 - 2015 年 7 月 17 日

松尾洋一, 坪井謙, 社本智也, 森本守, 佐藤崇文, 高橋広城, 石黒秀行, 若杉健弘, 木村昌弘, 竹山廣光, Sung B, Guha S NF- B を介した Zerubone の抗腫瘍血管新生に関する検討 日本外科代謝栄養学会第 52 回学術集会 品川区立総合区民会館さゆりあん (東京都品川区) 2015 年 7 月 2 日 - 2015 年 7 月 3 日

社本智也, 松尾洋一, 佐藤崇文, 坪井謙, 竹山廣光 膵癌におけるキサントフモールの血管新生抑制効果の検討 日本外科代謝栄養学会第 52 回学術集会 品川区立総合区民会館さゆりあん (東京都品川区) 2015 年 7 月 2 日 - 2015 年 7 月 3 日

佐藤崇文, 松尾洋一, 坪井謙, 社本智也, 竹山廣光 膵頭十二指腸切除後の脂肪肝発生に対する予測因子の検討 日本外科代謝栄養学会第 52 回学術集会 品川区立総合区民会館さゆりあん (東京都品川区) 2015 年 7 月 2 日 - 2015 年 7 月 3 日

松尾洋一, 柴田孝弥, 森本守, 佐藤崇文, 坪井謙, 社本智也, 高橋広城, 竹山廣光 膵癌における CXCL12/CXCR4 シグナルの解明と NF- B の関与 第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都港区) 2015 年 6 月 11 日 - 2015 年 6 月 13 日

森本守, 松尾洋一, 坪井謙, 柴田孝弥, 社本智也, 佐藤崇文, 竹山廣光 Gemcitabine 耐性膵癌に対する CXCR4 antagonist の有用性 第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都港区) 2015 年 6 月 11 日 - 2015 年 6 月 13 日

佐藤崇文, 松尾洋一, 坪井謙, 柴田孝弥, 森本守, 竹山廣光 膵頭十二指腸切除後の脂肪肝に対する膵酵素補充療法の治療効果に関する検討 第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都港区) 2015 年 6 月 11 日 - 2015 年 6 月 13 日

21 松尾洋一, 柴田孝弥, 森本守, 佐藤崇文, 坪井謙, 社本智也, 高橋広城, 石黒秀行, 若杉健弘, 木村昌弘, 竹山廣光 膵癌に

おける CXCL12/CXCR4 axis の役割とそのシ  
グナルの解明 第 115 回日本外科学会定  
期学術集会 名古屋国際会議場 ( 愛知県  
名古屋市 ) 2015 年 4 月 16 日 - 2016 年 4  
月 18 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

竹山廣光 ( TAKEYAMA Hiromitsu )  
名古屋市立大学・医学研究科・名誉教授  
研究者番号 : 0 0 2 1 6 9 4 6

### (2)研究分担者

松尾洋一 ( MATSUO Yoichi )  
名古屋市立大学・医学研究科・准教授  
研究者番号 : 4 0 3 8 1 8 0 0

森本守 ( MORIMOTO Mamoru )  
名古屋市立大学・医学系研究科・助教  
研究者番号 : 6 0 7 2 2 5 6 9

齊藤健太 ( SAITO Kenta )  
名古屋市立大学・医学研究科・助教  
研究者番号 : 1 0 7 7 0 2 4 0