

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19954

研究課題名(和文) IL-8/CXCR2を標的とした食道扁平上皮癌新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic agents targeting IL-8/CXCR2 network for esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

井上 正純 (INOUE, MASAZUMI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10627136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌切除例における癌組織中のIL-8とCXCR2の発現を検討したところ、IL-8/CXCR2共発現例で有意に術後無再発生存割合及び全生存割合が不良だったことからIL-8/CXCR2シグナルが食道扁平上皮癌細胞動態に関与していることが示唆された。食道扁平上皮癌細胞株を用いた実験ではin vitroにおいてIL-8/CXCR2シグナルを外因的・内因的に刺激すると細胞増殖は亢進し、外因的・内因的に抑制すると細胞増殖が抑制された。ヌードマウスを用いたin vivo実験でも同様の結果を得たことから、IL-8/CXCR2シグナル伝達が食道扁平上皮癌の細胞増殖に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that a positive IL-8 and CXCR2 expression correlates significantly with a lower recurrence-free survival rate and overall survival rate in our esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) patient population. These results suggest that IL-8/CXCR2 expression in ESCC has a direct impact on the cellular kinetics of ESCC. In vivo, Both internal and external stimulation or inhibition of the IL-8/CXCR2 network resulted in significant enhancement or suppression of cell proliferation in ESCC cell line. In vivo, stimulation or inhibition of the IL-8/CXCR2 network also resulted in enhancement or suppression of ESCC tumor proliferation. Our results demonstrated that stimulation of the IL-8/CXCR2 network clearly enhanced ESCC cell proliferation, while its inhibition obviously suppressed ESCC cell proliferation in vitro. These results indicate that control of IL-8/CXCR2 network signaling may be a new therapeutic strategy for ESCC.

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 IL-8 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定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、特に癌-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。ケモカインネットワークは乳癌における臓器特異的転移への関与が報告されて以降、様々な癌腫において研究対象とされてきた。特に、ケモカインネットワークである IL-8/CXCR2 ネットワークは炎症性肺疾患など他の領域で研究が進められており、IL-8/CXCR2 ネットワークをターゲットとした薬剤の臨床研究もなされていることから、消化器癌における役割を解明できれば早期に臨床応用できる可能性があると考え、研究対象としてきた。

### 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扁平上皮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、腫瘍増殖にかかわる分子生物学的因子とその転移成立機序の解明とケモカインネットワークを標的とした新規の治療法の開発を目的とする。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のうち、炎症性サイトカインとして広く知られ、炎症性疾患の分野でも研究が進められている IL-8/CXCR2 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。

### 3. 研究の方法

(1) 術前未治療の食道扁平上皮癌切除

例65例における食道癌組織中のIL-8およびCXCR2の発現を免疫組織染色法により検討し、IL-8、CXCR2発現と臨床病理学的背景、患者予後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。

(2) 10種類の扁平上皮癌細胞株(TE1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15)のCXCR2タンパク発現をWestern blotで調べた。また、細胞株の培養上清中のIL-8濃度を測定し、その発現を調べ、各細胞株におけるIL-8/CXCR2ネットワーク発現を検討した。

(3) 食道扁平上皮癌細胞株のうち、CXCR2発現株であるTE4の培養上清にIL-8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。

(4) 食道扁平上皮癌細胞株のうち、CXCR2発現株であるTE4の培養上清にCXCR2の選択的 antagonist(SB225002, Cayman Chemical)を添加したときの細胞増殖の変化をWST法で観察した。

(5) プラスミドベクター-pFLAG-CMV-4 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)を用いてIL-8発現プラスミドを作製した。さらにTE4にIL-8発現プラスミドを遺伝子導入したうえでIL-8高発現TE4株を作製し、培養上清中のIL-8を測定した。また、このIL-8高発現株の細胞増殖をWST法により親株と比較した。

(6) 食道扁平上皮癌細胞株のうち、CXCR2発現株であるTE4の培養上清にIL-8特異的siRNAを加え、IL-8の遺伝子発現を抑制したときの細胞増殖の変化をWST法で観察した。

(7) 食道扁平上皮癌細胞株TE4およびTE4にIL-8発現プラスミドを遺伝子導入したIL-8高発現TE4株をヌードマウス背部に皮下注射し、腫瘍増殖能を比較した。更にCXCR2選択的 antagonist (SB225002)を定期的に腹腔内投与した場合に腫瘍増殖能に変化が見られるかを観察した。

(8) 食道扁平上皮癌細胞株のうち、CXCR2発現株であるTE4をIL-8添加培地で培養し、細胞増殖能を亢進させた場合に、IL-8/CXCR2のsignal伝達にどのような変化が起こっているかをmicroarray+IPAを用いて解析・検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮癌切除例65検体におけるCXCR2とIL-8の発現を検討したところ、CXCR2およびIL8がともに陽性であった例(21例)においては、そのほかの群と比較して全生存率および無再発生存率がともに有意に不良であることがわかった(図1)。

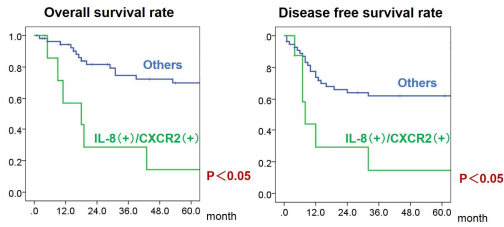


図1 生存曲線

(2) 10種の食道扁平上皮癌細胞株 (TE1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15) におけるCXCR2タンパク質発現をWestern blotで測定したところ、TE4, 5, 6, 8で高発現、TE1, 9, 10, 11, 14, 15では低発現であった。また、培養上清中のIL-8濃度はTE4, 5, 10, 14で高く、TE1, 6, 8, 9, 11, 15で低かった。以降の実験にはCXCR2とIL-8ともに発現を認めたTE4を用いた。

(3) 食道扁平上皮癌細胞株のうち、CXCR2発現株 (TE4) の培養上清にLigandであるIL-8を添加すると、細胞増殖が有意に亢進した (図2)。一方このTE4にIL-8発現プラスミドを遺伝子導入し、IL-8高発現TE4株を作製したところ、親株と比較してIL-8は培養上清中に高濃度に検出され、さらに細胞増殖は有意に亢進した (図3)。このことから、IL-8/CXCR2を外因的および内因的に刺激すると細胞増殖が亢進することが分かった。

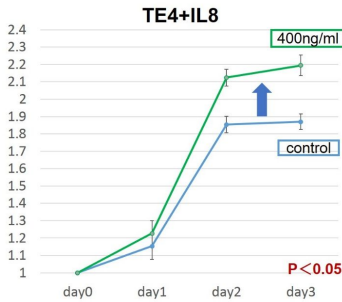


図2

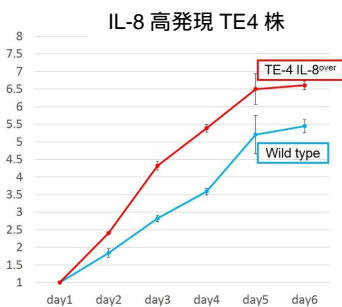


図3

(4) 食道扁平上皮癌細胞株のうち、CXCR2発現株 (TE4) の培養上清にCXCR2選択的 antagonist (SB225002) を投与した場合、細胞増殖は有意に抑制された。また、IL-8特異的siRNAを培地に添加することでも細胞増殖は有意に抑制されたことから、IL-8/CXCR2を外因的および内因的に抑制すると細胞増殖が抑制されることが分かった。

(5) (3) および (4) の結果から、食道扁平上皮癌の増殖にはIL-8/CXCR2のシグナル伝達が関与していることが示唆された。また、そのシグナル伝達メカニズムとしてはparacrine systemだけでなくautocrine

systemが関与していることが示唆された。

(6) 食道扁平上皮癌細胞株TE4およびIL-8高発現させたTE4細胞株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、IL-8高発現株で腫瘍増殖が亢進した。更にCXCR2選択的 antagonist (SB225002) を定期的に腹腔内投与したところ、SB225002投与群で腫瘍増殖が抑制された (図5)。このことからIL-8/CXCR2のシグナル伝達が食道扁平上皮癌の細胞増殖に関与していることがin vitroの実験でも裏付けられた。

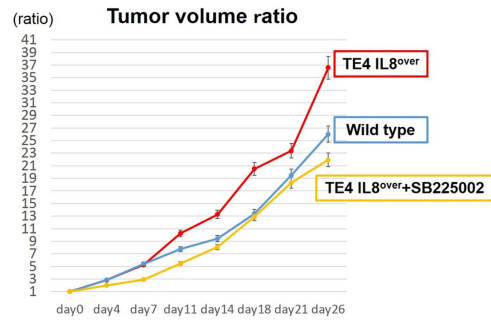


図4

(7) 食道扁平上皮癌細胞株のうち、CXCR2発現株であるTE4を、IL-8/CXCR2ネットワークのligandであるIL-8添加培地で培養し、microarray+IPAでIL-8/CXCR2のsignal伝達にどのような変化が起こるかを検討したが、具体的にどのようなメカニズムで細胞増殖能に変化を起こしているのかを説明できるような有意な結果を得ることはできなかった。

(8) これまでの研究により食道扁平上皮癌におけるIL-8/CXCR2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、更なるメカニズムを解析するとともに、他のケモカインシグナルの検討、ケモカインネットワーク発現に基づいた癌悪性度診断およびケモカインネットワーク標的とした治療への臨床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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 井上正純, 竹内裕也, 松田祐子, 小倉正治, 西知彦, 福田和正, 川久保博文, 北川雄光. ケモカインネットワークからみた食道癌周術期と癌転移再発, 第30回日本外科感染症学会, 2017年
2. Inoue M, Takeuchi H, Matsuda S, Nishi T, Fukuda K, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Kawakubo H, Kitagawa Y. Role of IL-8/CXCR2 network in the tumor cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. American Association

3. 井上正純, 竹内裕也, 松田祐子, 福田和正, 中村理恵子, 須田康一, 和田則仁, 川久保博文, 北川雄光. Chemokine network と食道扁平上皮癌悪性度・癌細胞動態との関わり. 第 27 回日本消化器癌発生学会総会, 2016年

〔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

井上 正純 (INOUE, Masazumi)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教  
研究者番号: 10627136

### (2)研究分担者

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

### (4)研究協力者

竹内 裕也 (TAKEUCHI, Hiroya)  
松田 祐子 (MATSUDA, Sachiko)