

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791301

研究課題名（和文）

食道癌における CXCR2 発現の臨床的意義の解明と新しい癌集学的治療法の開発

研究課題名（英文）

Clinical significance of IL-8 receptor expression in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

西 知彦 (NISHI TOMOHIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70445386

研究成果の概要（和文）：食道癌においてIL-8受容体であるCXCR2発現と合併症が予後に与える影響を検討した。82例の食道扁平上皮癌切除検体に抗CXCR2抗体を用いて免疫染色を行ったところCXCR2は33例に発現し、陽性例は陰性例に比べ予後不良であった。特に合併症例において陽性例は陰性例に比べ著明に予後不良であった。生体内外において、CXCR2陽性の食道扁平上皮癌細胞株にIL-8を曝露したところ増殖能が促進された。CXCR2陽性例のうち合併症例は嚴重なfollow及び積極的な補助化学療法が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We validate the effect of CXCR2, IL-8 receptor, expression and postoperative complications on long-term prognosis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using resected specimens and cancer cell lines. In immunohistochemical investigation, CXCR2 was expressed in 33 specimens of 82. The patients with CXCR2 expression in primary tumor had poorer prognosis compared to those with negative expression. Especially, the patients with CXCR2 expression who suffered postoperative complications had quite a poor prognosis. The proliferative ability was accelerated by exposure of IL-8 in the human ESCC cell line which expresses CXCR2 strongly in vivo and in vitro. Our results suggest that the expression of CXCR2 is associated with the proliferation of ESCC. The patients with IL-8 receptor expression who suffered postoperative complications probably need strict follow-up and aggressive adjuvant therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：食道外科学

### 1. 研究開始当初の背景

食道癌は各種診断技術や治療の進歩に伴いその予後は改善されてはきたが、未だ予後不良の癌のひとつである。

食道癌に限らず、手術という侵襲を契機に腫瘍の急速な再発、転移を認めることがあり、また、術後に縫合不全や感染などの合併症を起こした症例では長期予後が悪くなることが知られている。

本研究の指導者である慶應義塾大学外科学教室所属の竹内裕也らは、化学放射線療法後の食道癌手術において全生存期間を比べた際、術後縫合不全などの合併症を起こした症例では合併症がない症例に比べ有意に予後が不良であることを示し(図1)、侵襲および炎症と腫瘍の関係が注目されるようになった。

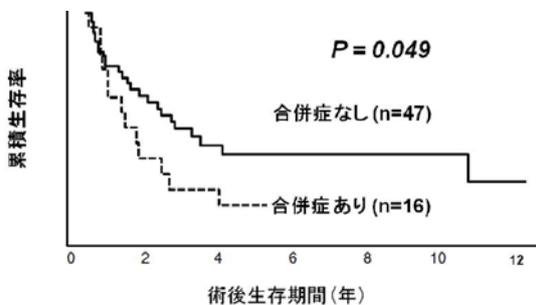


図1 食道癌術後合併症と予後の関係

竹内裕也 他、胸部食道癌に対する根治的放射線療法後

salvage手術の検討, 癌の臨 53(10):599-604, 2007

組織損傷と病原体による汚染は、直接免疫細胞を活性化してサイトカインなどのメディエーター放出を高める。2001年、Mullerらが乳癌患者において、サイトカインの一つであるCXCL12/SDF-1 $\alpha$ が転移の多い肝臓や肺、骨髄に特に多く発現し、逆にほとんど転移巣の見られない小腸や腎臓、皮膚等にはほとんど発現していないこと、その受容体であるCXCR4が乳癌細胞に発現していることを報告し、サイトカインと癌の関係が注目されるようになった。

食道癌に対する食道切除術は、消化器癌手術の中で最も侵襲が高い手術の一つであり、術後数時間でIL-1、IL-6、IL-8といった炎症性サイトカインの血中濃度が高値となる。

このうちIL-8の受容体であるCXCR2は様々な癌細胞に発現しており、IL-8が結合することにより血管新生、腫瘍増殖、浸潤、遊走が促進することが知られているが、食道扁平上皮癌におけるCXCR2発現の意義はいまだ明らかでない。

### 2. 研究の目的

食道扁平上皮癌切除検体および食道扁平上皮癌細胞株を用いて、CXCR2発現と術後合併症が予後に与える影響を検討し、その臨床腫瘍学的意義を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫組織化学的検討

1997年から2002年までにR0食道切除術を施行した82例の食道扁平上皮癌検体に抗CXCR2抗体を用いて免疫組織染色を行い、癌細胞の細胞膜における染色性を観察した。

染色性の有無と無再発生存期間(DFS)、全生存期間(OS)、腫瘍分化度、壁深達度(T)、リンパ節転移(N)、静脈侵襲(v)、リンパ管侵襲(ly)などの臨床病理学的因子との相関を検討した。術後肺炎または縫合不全を周術期合併症とし、合併症とCXCR2発現が予後に与える影響を検討した。

表1 患者背景

	n=82
性別(男:女)	73:9
年齢	59.7(44-81)歳
占居部位(Ut:Mt:Lt:Ae)	8:51:22:1
分化度(well:mod:poor)	16:55:8
壁深達度(pT1a:pT1b:pT2:pT3)	8:32:10:32
リンパ節転移(pN0:pN1:pN2:pN3:pN4)	31:28:13:9:1
壁内転移(pIM0:pIM1:記載なし)	71:8:3
進行度(fStage0:I:II:III:IVa)	7:18:24:32:1
ly(0:1:2:3)	17:27:27:11
v(0:1:2:3)	43:30:7:2
術後合併症(なし:あり)	52:30
(縫合不全, 胃管 Stump leakage, 術後肺炎)	

#### (2) 食道扁平上皮癌細胞株を用いた検討

食道扁平上皮癌由来細胞株TE series10種(TE1、TE4、TE5、TE6、TE8、TE9、TE10、TE11、TE14、TE15)におけるCXCR2発現の有無をWestern Blottingを用いて確認したところ、TE1、TE4、TE5で発現が弱く、TE8、TE9、TE11で発現が弱かった(図2)。このうち、ヌードマウスに生着するTE4とTE11を実験に用いることとした。

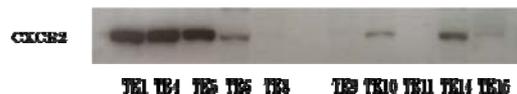


図2 食道癌扁平上皮癌細胞株におけるCXCR2の発現

① *in vitro*

WST法（テトラゾリウム塩の分解により生細胞数を解析する発色検出方法）を用いてIL-8とCXCR2の結合により食道癌細胞株の増殖能が亢進するか否かを検討する。

96ウェルマイクロタイタープレート内でTE4、TE11を $1 \times 10^4$ 個/100 $\mu$ Lで培養し、IL-8を投与しない群とIL-8濃度を200ng/mLとする群に分け、24時間培養する。各ウェルに細胞増殖試薬WST-8を加え、1時間培養する。吸光度測定器で各ウェルの吸光度を測定し、生細胞数を分析する。

② *in vivo*

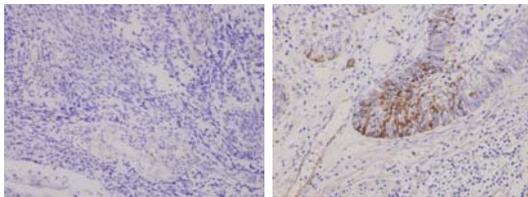
TE4、TE11をヌードマウスの背部に $3 \times 10^6$ 個/100 $\mu$ L皮下注射し、IL-8(300ng/200 $\mu$ L)を連日腹腔内投与する群(IL-8 i.p.群、5匹)と生理食塩水200 $\mu$ Lを連日腹腔内投与するコントロール群(NC群、5匹)に分け、7日後、14日後にそれぞれ腫瘍の長径と短径を測定する。(推定腫瘍体積) = (短径)<sup>2</sup> × (長径) × 0.4として計算する。

4. 研究成果

結果

(1) 免疫組織化学的検討

CXCR2は82例中33例(40.2%)に発現していた(図3)。



Negative: 49例 Positive: 33例

図3 抗CXCR2抗体による食道癌切除検体の免疫染色

CXCR2陽性例(33例)は無再発生存期間において、CXCR2陰性例(49例)に比べ予後不良の傾向であった(p=0.07)(図4)。

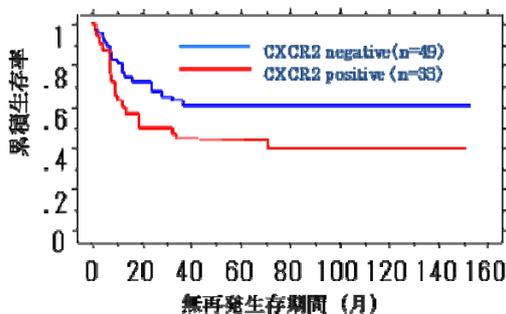


図4 CXCR2の発現と無再発生存期間

周術期合併症を伴った症例のうち、CXCR2陽性例はCXCR2陰性例に比べ有意に予後不良

であった(p=0.013)(図5)。

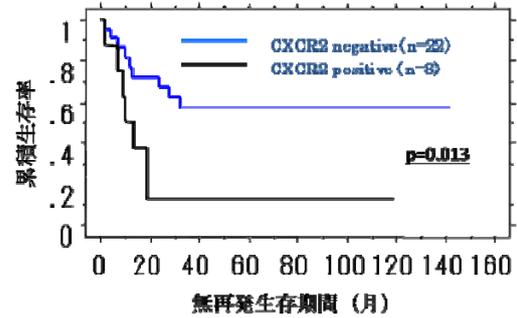


図5 合併症例におけるCXCR2の発現と無再発生存期間

CXCR2陽性例において、周術期合併症を伴った症例は伴わなかった症例に比べ予後が不良の傾向であった(p=0.07)(図6)。一方、CXCR2陰性例では、周術期合併症を伴った症例と伴わなかった症例で有意差を認めなかった(図7)。

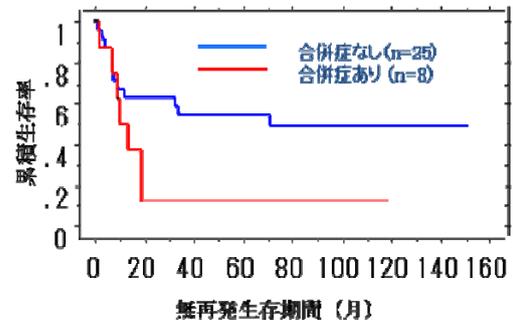


図6 CXCR2陽性例における合併症の有無と無再発生存期間

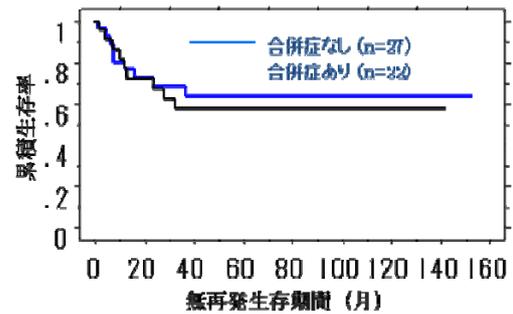


図7 CXCR2陰性例における合併症の有無と無再発生存期間

(2) 食道扁平上皮癌細胞株を用いた検討

① *in vitro*

CXCR2を強発現しているTE4はIL-8曝露により増殖能が亢進した。また、CXCR2弱発現のTE11はIL-8に曝露しても増殖能の亢進は認めなかった(図8)。

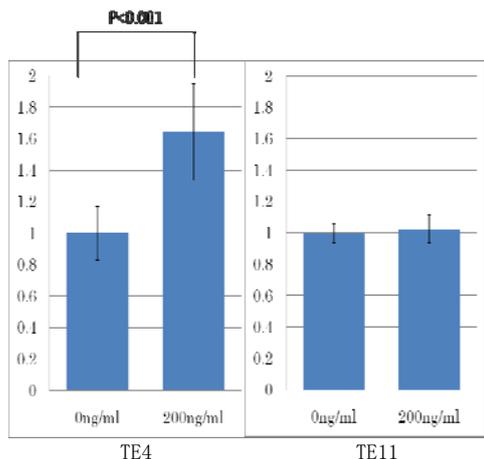


図8 IL-8投与によるTE4およびTE11の増殖能の変化

② *in vivo*

TE4を背部に皮下注射したヌードマウスにおいて、IL-8を腹腔内投与した群(IL-8 i.p.群)は生理食塩水を腹腔内投与した群(NC群)に比べ有意に推定腫瘍体積が多かった( $p=0.028$ )。一方、TE11を背部に皮下注射において、IL-8 i.p.群とNC群の推定腫瘍体積に有意差を認めなかった。

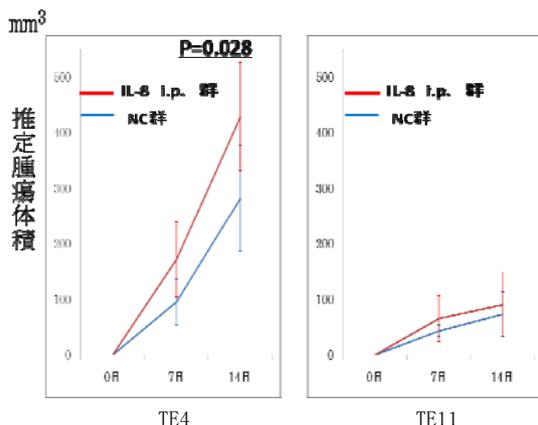


図9 腫瘍推定体積の経時的変化

本研究においてIL-8およびCXCR2のネットワークが食道扁平上皮癌の増殖能に関与している可能性が示唆された。

CXCR2を発現している症例のうち、高IL-8血症をきたす周術期合併症例は嚴重なfollowおよび積極的なadjuvant療法が必要であると考えられた。

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)

[学会発表] (計7件)

- ① 西 知彦、IL-8 receptor expression in esophageal squamous cell carcinoma is associated with adverse prognosis、8<sup>th</sup> International Symposium on Minimal Residual Cancer、2011年9月21日、大阪国際会議場
- ② 西 知彦、食道扁平上皮癌におけるIL-8 receptor発現及び周術期合併症が予後に与える影響、第111回日本外科学会定期学術集会、2011年5月25日、紙上開催
- ③ 西 知彦、Clinical significance of IL-8 receptor expression in esophageal squamous cell carcinoma、American Association for Cancer Research Annual Meeting 2011、2011年4月4日、フロリダ州オーランド
- ④ 西 知彦、食道扁平上皮癌におけるIL-8 receptor発現及び周術期合併症と予後の相関、第48回日本癌治療学会学術集会、2010年10月28日、国立京都国際会館
- ⑤ 西 知彦、Clinical significance of IL-8 receptor expression in esophageal squamous cell carcinoma、第69回日本癌学会学術集会、2010年9月23日、大阪国際会議場
- ⑥ 西 知彦、食道扁平上皮癌細胞株を用いたIL-8 receptor発現と増殖能の解析、第64回日本食道学会学術集会、2010年8月31日、石橋文化ホール
- ⑦ 西 知彦、食道扁平上皮癌におけるIL-8 receptor発現の臨床的意義、第110回日本外科学会定期学術集会、2010年4月10日、名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 知彦 (NISHI TOMOHIKO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：70445386