

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461033

研究課題名(和文) ケモカインCXCL12/CXCR4シグナル解析に基づく膵癌進展の病態解明

研究課題名(英文) The role of CXCL12/CXCR4 signal in the development of pancreatic cancer

研究代表者

宇座 徳光 (UZA, Norimitsu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30447958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌患者では血清CXCL12値が有意に高値であり、特に転移症例でより高値であった。切除標本では癌組織の辺縁にCXCR4が発現し、その周囲の間質にCXCL12発現細胞を認めた。またCXCL12刺激による膵癌細胞株では、癌の進展に関与する上皮間葉転換因子のE-cadherinの発現は低下し、Vimentinの発現が増加していた。

膵特異的CXCR4ノックアウトマウスと膵癌モデルマウスとの交配マウスでは、膵癌発症、転移巣および死亡率はいずれも低値であった。さらに本マウスでは前癌病変PanINの数にも差を認めた。以上より、CXCL12/CXCR4は膵発癌および進展に重要な役割を持っていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Serum CXCL12 was significantly expressed in patients with pancreatic cancer. Especially, its expression was more high in patients with metastasis. Immunohistological analysis demonstrated CXCR4 was expressed at the margin of cancerous lesions which was surrounded by CXCL12-expressed stromal tissue. Pancreatic cancer cell lines stimulated by CXCL12 showed down-regulation of E-cadherin, whereas up-regulation of Vimentin, which are important factors in Epithelial mesenchymal-transition. We generated pancreas-specific CXCR4 knockout mice model, interbred with pancreatic cancer model mice. In these mice, development of pancreatic cancer, metastatic lesion and mortality were significantly low compared to pancreatic cancer model mice. Moreover precancerous lesions, PanIN, also were decreased. Taken together, we demonstrated CXCL12/CXCR4 signal have important role in development of pancreatic cancer.

研究分野：膵癌病態解明

キーワード：膵癌 進展 CXCL12/CXCR4

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌の診断と治療法は飛躍的に進歩したが、それでもなお極めて生物学的悪性度の高い最難治癌のひとつである。その理由として、比較的早期に周囲組織への浸潤や遠隔転移を来し、診断時には既に進行しているためである。その罹患者数は増加の一途にあり、早急な病態解明、早期診断法の確立および新規治療法開発が急務となっている疾患である。

(2) 癌の浸潤や転移などその進展過程において、Cancer-associated fibroblast とよばれる線維芽細胞、Tumor-associated macrophage などの免疫担当細胞、血管やリンパ管および結合組織によって構成される特徴的な微小環境が存在し、癌の進展を制御している。近年、この癌を取り巻く微小環境の重要性が指摘されており、癌細胞と微小環境の相互作用が注目されている。また、この相互作用のうち癌細胞が形質転換し浸潤・転移を来す際の作用として上皮間葉相互作用(EMT)も注目されている。さらに、このEMTに關与する因子として、ケモカイン分子の役割が数多く報告されている。ケモカインは特定の白血球サブセットに対する遊走作用と活性化を支配するサイトカインとして発見された分子の総称であるが、種々の癌の進展への関与も報告されている。最近では、各種癌細胞が免疫担当細胞や血管内皮細胞とともに様々なケモカインやケモカインレセプターを発現し、癌微小環境におけるケモカインネットワークが、癌幹細胞の維持、細胞増殖、血管新生、浸潤・転移などの癌の進展に必須であると考えられている。ケモカイン CXCL12 とそのレセプターCXCR4 を介したシグナル伝達が、各種の癌において癌幹細胞の維持、増殖、あるいは転移などに必須の役割を果たしていることが報告されている。さらに膵癌においても、CXCL12/CXCR4 シグナルが細胞増殖、浸潤、転移、癌幹細胞維持などに関与していることが報告されている(図

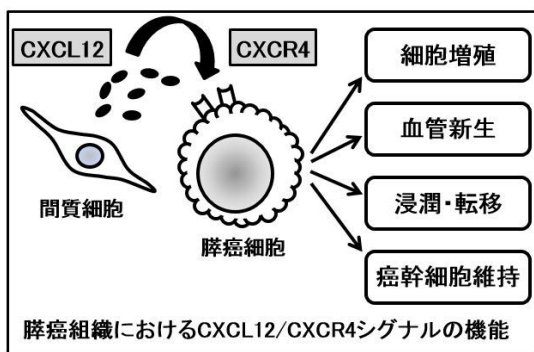


図1

1)。しかしながら、膵癌の微小環境において、どのような細胞間で CXCL12/CXCR4 シグナルが伝達され、どのような分子メカニズムによって癌の進展を制御しているかについては不明な点が多い。

(3) これまで申請者らは、CXCL12/CXCR4 を含むケモカインを標的とした研究経験を有して

いる。これらの経験に基づく検討から、ヒト膵癌組織では膵癌細胞に CXCR4 が、膵癌細胞の周囲組織に CXCL12 が発現していることを確認した。また膵癌細胞株を用いた検討では、CXCR4 の mRNA および蛋白の発現していることを確認した。これらの結果とこれまでの報告は、膵癌組織の微小環境では、膵癌細胞とそれを取り巻く間質の相互作用の存在に加え、その相互作用にケモカイン CXCL12/CXCR4 シグナルが重要な役割を有していることを示唆している。膵癌進展における CXCL12/CXCR4 シグナル解析は、その病態の解明のみならず、新規治療薬の開発にもつながるものと期待される。

2. 研究の目的

(1) ヒト膵癌における CXCL12/CXCR4 シグナルの発現解析および分布解析をする。また臨床病期との相関解析を行う。

(2) ヒト膵癌細胞株を用いた CXCL12/CXCR4 シグナルの発現解析と機能解析を行う。

(3) 膵特異的 CXCR4 ノックアウトマウスの作製と各種膵癌発症モデルとの交配による CXCL12/CXCR4 の機能解析を行い、膵癌発症から進展過程における CXCL12/CXCR4 シグナルの機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵癌における CXCL12/CXCR4 の検討
ELISA 法によりヒト膵癌患者の血清 CXCL12 値と進行度・予後との相関について検討する。

免疫組織学的検討により、ヒト膵癌切除組織における CXCL12 と CXCR4 の発現とその分布について解析する。

(2) ヒト膵癌細胞株を用いた検討

ヒト膵癌細胞株(MiaPaCa-2、BxPC-3 など)における CXCL12、CXCR4 の mRNA および蛋白発現について定量的 PCR 法およびウェスタンブロットング法にて解析する。

CXCL12 刺激による CXCR4 強制発現膵癌細胞株、CXCR4 ノックダウン膵癌細胞株を用いて、EMT 関連因子と血管新生因子の発現を解析する。検討する EMT 関連因子として、上皮系マーカーの E-Cadherin、間葉系マーカーの Vimentin、転写因子である Snail, Twist を解析し、また血管新生因子として VEGF, PDGF, MMP, IL-8 などを検討する。これらの mRNA の発現量を定量的 PCR 法にて、上清中の各種因子の産生量を ELISA 法にて解析する。

(3) 膵癌マウスモデルを用いた CXCL12/CXCR4 の解析

CXCL12 あるいは CXCR4 のノックアウトマウスは胎生致死であり、成体における機能解析は不可能である。このような問題点を解決するために、膵特異的プロモーター下に Cre recombinase を発現するマウスと CXCR4 flox マウスとの交配により膵特異的な CXCR4 ノックアウトマウスを作製する。このマウスを用

いて胎生期から成体に至る各時期における膵の経時的変化について評価を行い、膵形態形成における CXCL12/CXCR4 の機能について解析する。

膵特異的 CXCR4 ノックアウトマウスと膵前癌病変である膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) あるいは浸潤性膵癌を形成するモデルマウスをそれぞれ交配し、PanIN および膵癌の形成の有無とその悪性度、転移巣の有無、生存率などについて対照群と比較検討する。さらに血管新生、EMT 関連遺伝子の発現について検討する (図2)。

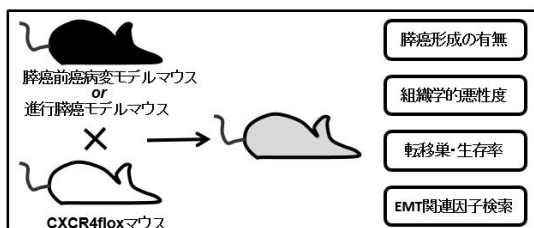


図2

4. 研究成果

(1) ヒト膵癌における CXCL12/CXCR4 の検討

膵癌患者の血清 CXCL12 値は、健常コントロール群と比較して有意に高値であった。また膵癌患者間の検討では、転移巣を有する進行症例でより高値であった。

膵癌切除標本を用いた免疫組織学的検討では、浸潤・転移における CXCL12/CXCR4 の役割を検討するために、癌組織の中心部、辺縁部における CXCL12 および CXCR4 の発現分布を検討した。CXCR4 発現細胞は癌中心部に比して病巣の先進部に多く発現していた。また CXCL12 発現細胞は癌病巣周囲の間質に多く分布していた。以上のことからケモカイン CXCL12/CXCR4 は浸潤や転移など癌の進展や予後に関与する因子である可能性が示唆された。

(2) ヒト膵癌細胞株を用いた検討

各種ヒト膵癌細胞株 (MiaPaCa-2, BxPC-3 など) を用いて CXCL12 および CXCR4 の mRNA および蛋白発現について定量的 PCR 法およびウェスタンブロッティング法にて解析した結果、各種細胞株で CXCR4 が有意に発現していた。これら細胞株に対して CXCL12 刺激による EMT 関連因子および血管新生因子の発現解析を行った。EMT 関連因子のうち、上皮系マーカーの E-Cadherin の発現は低下し、間葉系マーカーの Vimentin の発現が増加していた。また EMT 関連転写因子である Snail, Twist も発現が上昇した。さらに血管新生因子として IL-8 などの発現が増加していた。

この結果をふまえ、CXCR4 強制発現細胞株およびノックダウン細胞株を樹立し、同様の検討を行った。CXCR4 強制発現細胞株では上記分子の発現はさらに顕著となった。一方、CXCR4 ノックダウン細胞株では逆相関する傾向にあった。以上の結果から、CXCL12/CXCR4 は癌の浸潤・転移など癌の進

展に重要とされる EMT に強く関与することが示唆された。

3. 膵特異的 CXCR4 ノックアウトマウスを用いた膵発生および膵癌進展メカニズムにおける CXCL12/CXCR4 機能解析

上記のごとく CXCL12 あるいは CXCR4 のノックアウトマウスは胎生致死のため、膵特異的 CXCR4 ノックアウトマウス (CXCR4^{fl/fl} マウス) を作製した。このマウスの出生後の経時的変化について評価を行ったが、野生型マウスと比較して、形態や体重変化、肉眼的および顕微鏡的に膵形態形成において差は認めなかった。

次に膵特異的 CXCR4 ノックアウトマウスと膵前癌病変である膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) あるいは浸潤性膵癌を形成するモデルマウスをそれぞれ交配し、PanIN および膵癌の形成の有無とその悪性度、転移巣の有無、生存率について対照群と比較検討した。当初、膵特異的プロモーターとして Ptf1a を標的に Cre-loxP システムを用いて膵特異的各種ノックアウトマウスを作成した。しかしながら、膵特異的 CXCR4 ノックアウトマウスと進行膵癌モデルマウス (Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; TP53^{R172H}) を交配したマウス (Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; TP53^{R172H}; CXCR4^{fl/fl}) はコントロールマウス (Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; TP53^{R172H}) と比較して膵癌形成などにおいて有意な差は得られなかった。

そこで、異なるプロモーターをとして Pdx1 を用いて膵特異的 CXCR4 ノックアウトマウス (Pdx1-Cre; CXCR4^{fl/fl}) および進行膵癌モデルマウス (Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; TP53^{R172H}) を作製し交配を行い同様の解析を行った。本マウス (Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; TP53^{R172H}; CXCR4^{fl/fl}) はコントロール群の進行膵癌モデルマウスと比較して、膵癌形成および転移巣の数はいずれも有意に少なかった (図3)。

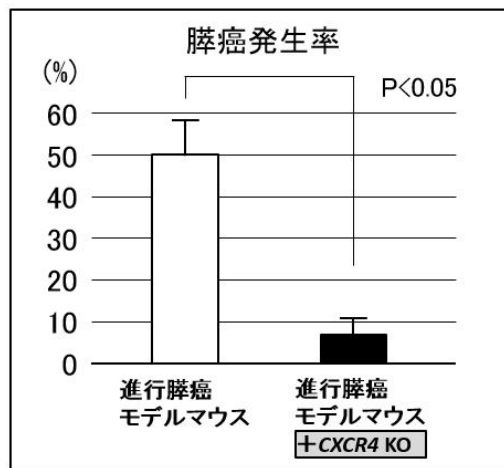


図3: CXCR4 KOマウス発癌

また生存率に関しても有意に高かった。さらに本マウスでは前癌病変である PanIN の数にも差を認めた。これは CXCL12/CXCR4 が癌の進展のみならず、発癌そのものにも関与している可能性を示唆している。そこで膵前癌病変モデルマウス (Pdx1-Cre; Kras^{G12D}) と膵特異的 CXCR4 ノックアウトマウスを交配

(*Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; CXCR4^{f/f}*) し、PanIN形成の差を検討した結果、本マウスでは前癌病変PanINの形成が少ない傾向にあった(図4)。

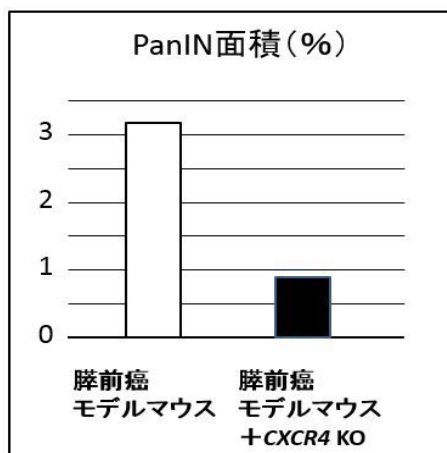


図4

さらに、ELISA法、定量的PCR法および免疫組織学的検討から進行膵癌モデルマウスと膵特異的*CXCR4*ノックアウトの交配マウス

(*Pdx1-Cre; Kras^{G12D}; TP53^{R172H}; CXCR4^{f/f}*) ではコントロール群の進行膵癌モデルマウスと比較してIL-18などの血管新生因子、VimentinなどのEMT関連遺伝子の発現が低下していた。以上より、*CXCL12/CXCR4* は浸潤や転移などの膵癌の進展のみならず、膵癌発症そのものにも関与していることが示された。これらの知見をもとに、さらなる解析によって*CXCL12/CXCR4* シグナルが膵癌の治療標的になる可能性が示された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇座徳光 (UZA, Norimitsu)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 30447958

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし