

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861338

研究課題名(和文) 卵巣癌におけるCX3CL1-CX3CR1システムの分子病態生理学的役割の解明

研究課題名(英文) Pivotal roles of CX3CL1-CX3CR1 systems in ovarian cancer progression

研究代表者

堀内 優子 (Horiuchi, Yuko)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60596972

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)：卵巣癌はその半数以上が初回手術時に腹膜播種を伴う進行症例である。進行症例に対する治療の主役は腫瘍減量手術に引き続く化学療法であるが、長期予後の改善は見られないのが現状である。さらなる予後改善のためには新規治療戦略が求められている。近年、癌細胞の浸潤・転移にケモカインシステムが深く関与していることが明らかになってきている。今回、我々はケモカインの一つであるフラクタルカイン(CX3CL1)およびそのレセプター(CX3CR1)に着目し、卵巣癌における腹膜播種の分子病態を検討した。

研究成果の概要(英文)：Despite the development of cytoreductive surgery and chemotherapy, epithelial ovarian cancer has the highest case-fatality rate among gynecologic cancers. In the biology of tumor growth and metastasis, the interactions between tumor and stromal cells via chemokine systems are essential. Several previous studies demonstrated that CX3CL1-CX3CR1 system was crucial in various disease models such as ischemia-reperfusion renal injury, bacterial peritonitis and inflammatory colitis. In this study, we explored the pathophysiological roles of CX3CL1-CX3CR1 system in ovarian cancer progression.

研究分野：卵巣癌

キーワード：卵巣癌 微小環境 ケモカイン・サイトカイン 腹膜播種

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌はその半数以上が初回手術時に腹膜播種を伴う進行症例である。進行症例に対する治療の主役は腫瘍減量手術に引き続く化学療法であるが、長期予後の改善は見られないのが現状である。さらなる予後改善のためには新規治療戦略が求められている。

癌の増殖、進展、転移を理解していく上で、癌細胞をとりまく微小環境での癌細胞と多様な免疫細胞、間質細胞との相互作用を解明することが重要である(図1)。癌細胞の産生するサイトカイン・ケモカインによって間質細胞が集簇し、癌微小環境内における癌細胞と間質細胞のクロストークによりマトリックスメタプロテアーゼ産生、増殖因子・血管新生因子の産生、上皮間葉細胞分化転換促進、免疫寛容システムなどが複雑に関与し、癌の増殖、進展、転移が促進される。

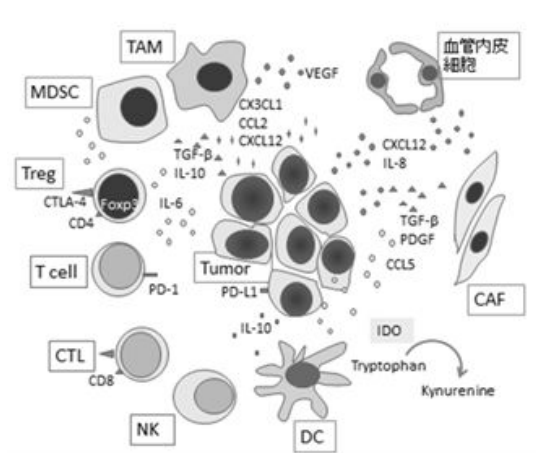


図1 癌微小環境内における間質細胞

## 2. 研究の目的

近年、癌微小環境におけるサイトカイン・ケモカインシステムの関与が明らかになってきている。ケモカインシステムの中で、接着因子と遊走因子の二面性をもつ CX3CL1 (フラクタルカイン)-CX3CR1 システムに着目し、癌微小環境における病態生理学的役割、宿主細胞と癌細胞との相互作用への関与を検討し、最終的には、卵巣癌における「新規分子標的治療」の確立を目指すことを目的とした。

本研究では卵巣癌腹膜播種における CX3CL1 およびそのレセプターである CX3CR1 の分子病態生理学的役割をマウス卵巣癌腹膜播種モデルおよびヒト卵巣腫瘍から得られた検体を用いて検討した。

## 3. 研究の方法

(1)学内倫理委員会承認の下、ヒト卵巣腫瘍の手術検体を用いて、卵巣腫瘍組織の CX3CL1, CX3CR1 の発現を免疫組織染色および RT-PCR にて検討した。

(2)マウス卵巣癌細胞株 ID8 細胞における CX3CL1 及び CX3CR1 の mRNA およびタンパク発現を検討した。次に培養液中に CX3CL1 を添加し、ID8 細胞の増殖能、遊走能を検討した。

(3)宿主におけるフラクタルカインシステムの機能解析のためフラクタルカインレセプター欠損マウスである  $Cx3cr1^{-/-}$  (KO) マウスを用いた。ID8 細胞 ( $5 \times 10^6$  個/マウス) をメスの 8 週齢の野生型 C57Bl/6 (WT) 及び KO マウスに腹腔内移植し、腹膜播種の程度、腫瘍関連分子の発現を検討した。また生存率についても検討した。

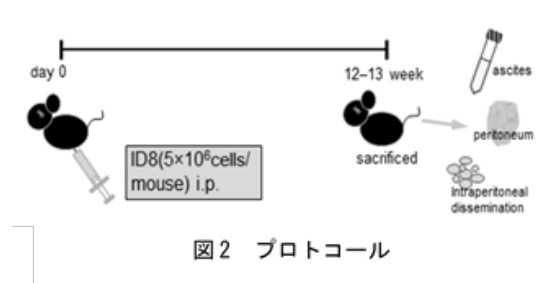


図2 プロトコール

## 4. 研究成果

(1)ヒト卵巣癌の免疫組織学的検討では、リガンドの CX3CL1 は腫瘍細胞に、受容体の CX3CR1 は腫瘍間質に局在していた。

(2)ID8 細胞において CX3CL1, CX3CR1 の mRNA およびタンパク発現を認めた。CX3CL1 添加により ID8 細胞の遊走能は亢進したが ( $P < 0.001$ ), 増殖能に差は認めなかった。

(3)ID8 細胞を WT および KO マウスに腹腔内移植後 79 日目では、WT マウスに比べて KO マウスの腫瘍重量、腫瘍形成数、腹水量が有意に減少した ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.001$ ,  $P = 0.001$ ) (図3)。生存期間は WT マウスに比べて KO マウスで有意に延長した ( $P < 0.001$ ) (図4)。また、腹膜播種腫瘍組織の免疫組織学的検討では WT マウスに比べて KO マウスにおいて腫瘍内に浸潤するマクロファージの減少を認めた。また KO マウスでは MMP-2, TGF- $\beta$  産生細胞の減少を認め、免疫二重染色にてこれらの産生細胞は腫瘍内に浸潤するマクロファージであると判明した。

宿主の CX3CR1 欠損により卵巣癌腹膜播種の進展は抑制された。卵巣癌微小環境における分子病理性のメカニズムについて検討したところ、腫瘍細胞から分泌されるフラクタルカインが、受容体を発現するマクロファージの腫瘍微小環境内への動員に関与し、腫瘍内

へ浸潤したマクロファージが MMP-2, TGF- $\alpha$  を産生する tumor-associated macrophage (TAM)として、卵巣癌進展に有利な環境を作り出すことが示唆された。卵巣癌治療においてフラクタルカインシステムに対する標的治療の可能性が示唆された。

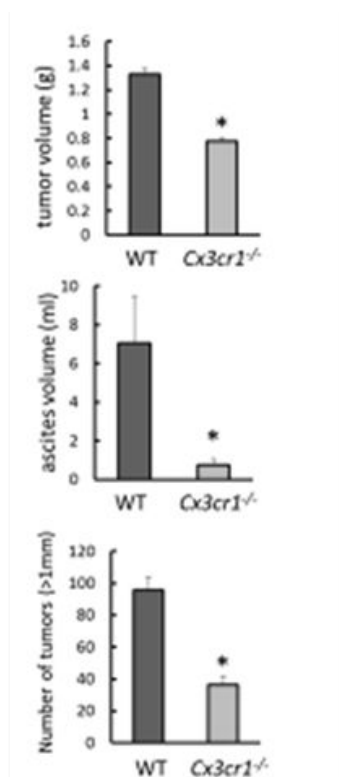


図3 ID8 細胞腹腔内移植後の腫瘍重量、腹水量、腫瘍形成数

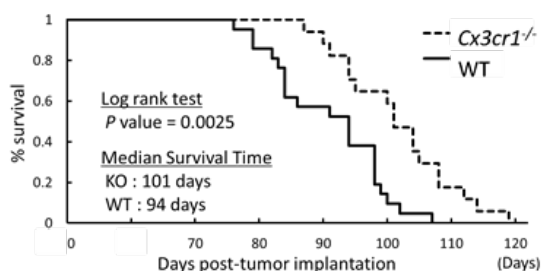


図4 ID8 細胞腹腔内移植後の生存率

## 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)

Mabuchi Y, Ota N, Kobayashi A, Tanizaki Y, Minami S, Ino K. Identical twins with mature cystic teratomas treated with laparoscopic surgery: Two case

reports. *Mol Clin Oncol.* 2017 Feb;6(2):276-278. DOI: 10.3892/mco.2016.1118. 査読有

Iwahashi N, Deguchi Y, Horiuchi Y, Ino K, Furukawa K. A Third Surgically Managed Ectopic Pregnancy after Two Salpingectomies Involving the Opposite Tube. *Case Rep Obstet Gynecol.* 2017;2017:1653529. DOI: 10.1155/2017/1653529. 査読有

Yahata T, Yagi S, Mabuchi Y, Tanizaki Y, Kobayashi A, Yamamoto M, Mizoguchi M, Nanjo S, Shiro M, Ota N, Minami S, Terada M, Ino K. Prognostic impact of primary tumor SUV(max) on preoperative (18)F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography and computed tomography in endometrial cancer and uterine carcinosarcoma. *Mol Clin Oncol.* 2016 Oct;5(4):467-474. DOI: 10.3892/mco.2016.980 査読有

Yagi S, Yahata T, Mabuchi Y, Tanizaki Y, Kobayashi A, Shiro M, Ota N, Minami S, Terada M, Ino K. Primary tumor SUVmax on preoperative FDG-PET/CT is a prognostic indicator in stage IA2-IIIB cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Mol Clin Oncol.* 2016 Sep;5(3):216-222. DOI: 10.3892/mco.2016.953 査読有

Mabuchi Y, Yahata T, Kobayashi A, Tanizaki Y, Shiro M, Ota N, Yagi S, Minami S, Ino K. Clinicopathologic Factors of Cervical Adenocarcinoma Stages IB to IIB. *Int J Gynecol Cancer.* 2015 Nov;25(9):1677-82. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000542. 査読有

Kobayashi A, Tanizaki Y, Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Toujima S, Kuninaka Y, Minami S, Ino K, Kondo T. AG490, a Jak2 inhibitor, suppressed the progression of murine ovarian cancer. *Eur J Pharmacol.* 2015 Nov 5;766:63-75. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.09.039. 査読有

Mabuchi Y, Yahata T, Kobayashi A, Tanizaki Y, Minami S, Ino K. Vaginal carcinoma in a young woman who underwent fertility-sparing treatment involving chemotherapy and conservative surgery. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015 Jun;41(6):989-92. DOI: 10.1111/jog.12638. 査読有

Kobayashi T, Minami S, Mitani A, Tanizaki Y, Booka M, Okutani T, Yamaguchi S, Ino K. Acute fatty liver of pregnancy associated with fetal mitochondrial trifunctional protein deficiency. J Obstet Gynaecol Res. 2015 May;41(5):799-802. DOI: 10.1111/jog.12609. 査読有

Tanizaki Y, Kobayashi A, Toujima S, Shiro M, Mizoguchi M, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Takikawa O, Ino K. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer by inducing an immunosuppressive environment. Cancer Sci. 2014 Aug;105(8):966-73. DOI: 10.1111/cas.12445. 査読有

Tanizaki Y, Kobayashi A, Shiro M, Ota N, Takano R, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Terada M, Ino K. Diagnostic Value of Preoperative SUVmax on FDG-PET/CT for the Detection of Ovarian Cancer. Int J Gynecol Cancer. 2014 Mar;24(3):454-60. DOI: 10.1097/IGC.000000000000074. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

Yuko Tanizaki, Aya Kobayashi, Tamaki Yahata, Mika Mizoguchi, Michihisa Shiro, Nami Ota, Yasushi Mabuchi, Shigetaka Yagi, Sawako Minami, Kazuhiko Ino. CX3CL1-CX3CR1 system enhances ovarian cancer progression via recruitment CX3CR1 positive tumor associated macrophages (TAMs). 第 68 回 日本産婦人科学会、2016 年 4 月、東京都

谷崎優子, 小林彩, 東嶋左緒里, 溝口美佳, 石田裕子, 野坂みずほ, 木村章彦, 馬淵泰士, 八木重孝, 南佐和子, 向田直史, 近藤稔和, 井籠一彦. Fractalkine system が腫瘍随伴マクロファージの動員を介して卵巣癌腹膜播種を促進する. 第 53 回 日本癌治療学会、2015 年 10 月、京都府

谷崎優子, 小林彩, 東嶋左緒里, 石田裕子, 野坂みずほ, 木村章彦, 南佐和子, 向田直史, 近藤稔和, 井籠一彦. フラクタルカインシステムが TAM を誘導し卵巣癌腹膜播種を促進する. 第 57 回 日本婦人科腫瘍学会、2015 年 8 月、岩手県

谷崎優子, 小林彩, 東嶋左緒里, 溝口美

佳, 八幡環, 石田裕子, 野坂みずほ, 木村章彦, 馬淵泰士, 南佐和子, 向田直史, 近藤稔和, 井籠一彦. 腫瘍随伴マクロファージ (TAM) および腫瘍関連線維芽細胞 (CAF) の卵巣癌微小環境内動員におけるケモカインシステムの促進的役割. 第 14 回 日本婦人科がん分子標的研究会学術集会、2015 年 7 月 長野県

谷崎優子, 小林彩, 溝口美佳, 城道久, 太田菜美, 馬淵泰士, 八木重孝, 南佐和子, 井籠一彦. CX3CL1-CX3CR システムは腫瘍随伴マクロファージの動員を介して卵巣癌腹膜播種を促進する. 第 67 回 日本産婦人科学会、2015 年 4 月、神奈川県

谷崎優子, 小林彩, 東嶋左緒里, 石田裕子, 野坂みずほ, 木村章彦, 中村靖司, 南佐和子, 向田直史, 近藤稔和, 井籠一彦. CX3CL1-CX3CR1 システムは腫瘍随伴マクロファージを誘導し卵巣癌腹膜播種を促進する. WAMT 和歌山腫瘍研究会、2014 年 12 月 和歌山県

谷崎優子, 小林彩, 東嶋左緒里, 溝口美佳, 八幡環, 城道久, 馬淵泰士, 八木重孝, 南佐和子, 井籠一彦. 卵巣癌腹膜播種におけるフラクタルカインシステムの分子病理学的役割の解明. 第 56 回 日本婦人科腫瘍学会、2014 年 7 月 栃木県

谷崎優子, 小林彩, 東嶋左緒里, 石田裕子, 木村章彦, 野坂みずほ, 向田直史, 近藤稔和, 井籠一彦. マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおけるフラクタルカインシステムの分子病理学的役割の検討. 第 23 回 がん転移学会学術集会、2014 年 7 月、石川

Yuko Tanizaki, Aya Kobayashi, Saori Toujima, Yumi Kuninaka, Mizuho Nosaka, Yuko Ishida, Akihiko Kimura, Naofumi Mukaida, Kazuhiko Ino, Toshikazu Kondo. Essential involvement of CX3CL1-CX3CR1 system in ovarian cancer progression. 第 22 回 マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム、2014 年 6 月、東京都

谷崎優子, 小林彩, 八幡環, 山本円, 城道久, 太田菜美, 馬淵泰士, 八木重孝, 南佐和子, 井籠一彦. 卵巣癌進展における CX3CL1-CX3CR1 システムの分子病理学的役割の解析. 第 66 回 日本産婦人科学会、2014 年 4 月、東京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

堀内 優子 (HORIUCHI Yuko)

(旧姓: 谷崎 (TANIZAKI))

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60596972