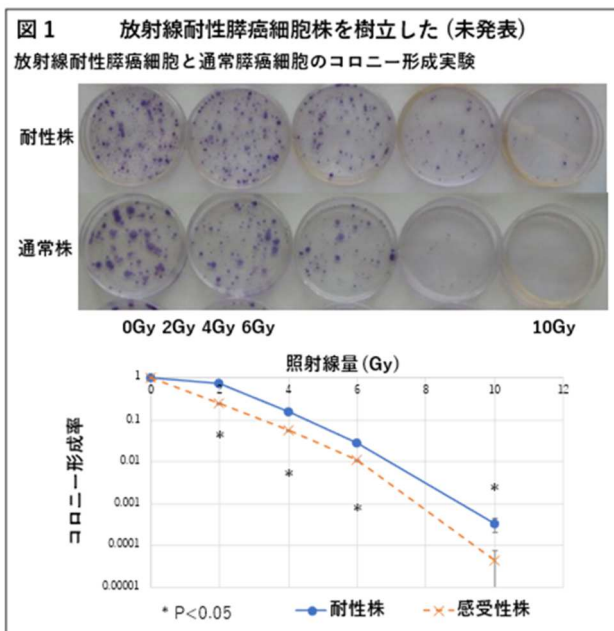


臨床応用を目指した放射線耐性膵癌における CXCR4 の機能解析

名古屋市立大学 消化器外科
今藤 裕之

1. 諸言

膵癌の予後は極めて悪く、既存の治療法の効果は限定的であり難病といえる。膵癌に対する最も有効な治療は根治的な外科切除である。しかしながら、診断時には切除が困難な症例が多く、たとえ手術ができたとしてもすぐに再発する。これらに対し、切除可能な症例には再発率の低減を目的として、切除不能な症例には conversion surgery を目標に術前化学放射線療法が行われるがその効果は十分とはいえない。局所制御を強力に行いつつ、遠隔転移病巣の出現を予防し、膵癌患者の生命予後を向上させるためには、放射線治療と併用する有効な治療薬の開発が不可欠である。一方、われわれは膵癌の放射線耐性化のメカニズムを解明し新たな分子標的薬剤を発見することを目的に、放射線耐性膵癌細胞株を樹立することに成功した(図 1)。さらに、耐性株の解析から、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。これまでにわれわれは、CXCL12/CXCR4 シグナルが膵癌の増殖、浸潤、血管新生に重要な役割を持つこと、CXCR4 阻害剤が抗腫瘍効果を持つことを報告してきた¹⁾⁻³⁾。本研究では、放射線耐性化に伴って CXCR4 発現が増強した膵癌に対し、CXCL12/CXCR4 シグナルを制御することによる抗腫瘍効果を検討することを目的とした。



2. 方法

2.1 放射線耐性化に伴う膵癌細胞株の CXCR4 発現増加の検討

2.1.1 CXCR4 mRNA 発現の比較検討

放射線感受性株、耐性株に対して RT-PCR を行い、CXCR4 mRNA の発現を比較した。

2.1.2 タンパクレベルでの CXCR4 発現の比較検討

膜タンパクを抽出し、CXCR4 ELISA でタンパク発現を比較した。

2.1.3 細胞膜上での CXCR4 発現の比較検討

免疫細胞染色を行い、細胞膜上での CXCR4 の発現を比較した。

2.2 放射線耐性に伴う膵癌における生物学的特徴の変化の解明

2.2.1 細胞増殖能の比較検討

増殖試験（WST-1 assay）により感受性株と耐性株の細胞増殖能の変化を比較した。

2.2.2 浸潤能の比較検討

浸潤実験（Matrigel invasion assay）を行い、両群の細胞浸潤能を比較した。CXCR4 のリガンドである CXCL12 を用いて CXCL12/CXCR4 シグナルを介した浸潤能の変化および放射線耐性化に伴う変化を比較した。CXCL12 は線維芽細胞が分泌することが報告されている。膵癌細胞（放射線感受性株および放射線耐性株）と線維芽細胞との共培養を行い、浸潤能の変化を検討した。

2.3. CXCR4 阻害薬の有効性の検討

2.2.2 で行った浸潤実験に CXCR4 阻害薬を用いることで、CXCL12/CXCR4 シグナルの抑制が浸潤能に及ぼす影響を検討した。

3.結果

3.1 放射線耐性化に伴う膵癌細胞株の CXCR4 発現増加の検討

3.1.1 CXCR4 mRNA 発現の比較検討

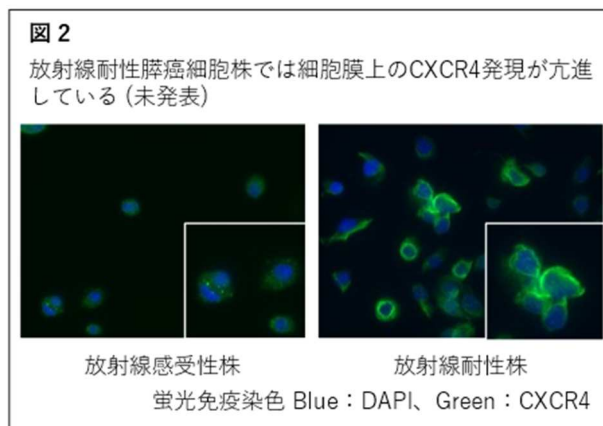
放射線感受性株に比較して、耐性株で CXCR4 mRNA の発現亢進を認めた。

3.1.2 タンパクレベルでの CXCR4 発現の比較検討

感受性株に比較して、耐性株で細胞膜タンパク内の CXCR4 発現は亢進していた。

3.1.3 細胞膜上での CXCR4 発現の比較検討

感受性株と比較して耐性株では、細胞膜上で CXCR4 の発現が亢進していることを確認した(図 2)。



3.2 放射線耐性に伴う膵癌における生物学的特徴の変化の解明

3.2.1 細胞増殖能の比較検討

感受性株と耐性株の増殖能に有意差を認めなかった。

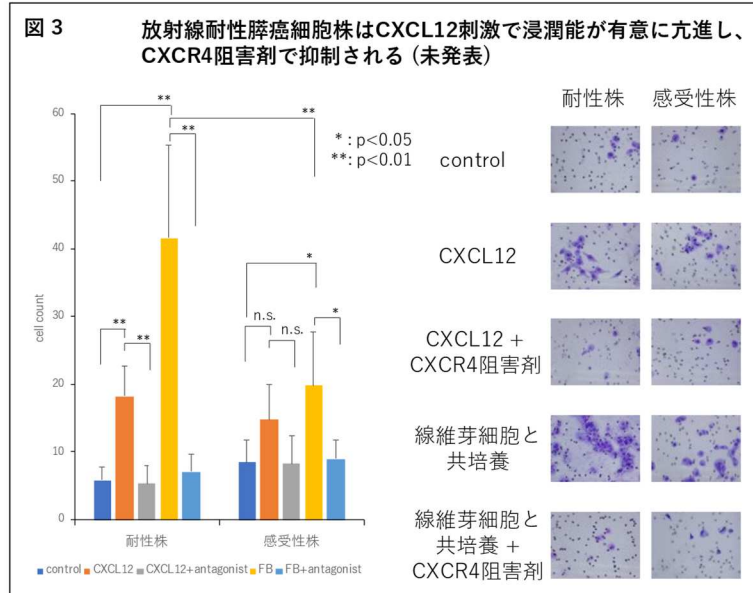
3.2.2 浸潤能の比較検討

CXCL12 を投与することで感受性株、耐性株共に浸潤能の亢進を認めた。線維芽細胞との共培養下に浸潤実験を行うと浸潤能は亢進し、この変化は感受性株に比較して耐性株でより顕著であった(図3)。

3.3 CXCR4 阻害薬の有効性の検討

浸潤実験において、CXCL12 の投与および線維芽細胞と

の共培養で亢進した浸潤能は CXCR4 阻害薬を投与することで有意に抑制された(図3)。



4.考察

CXCR4 は免疫細胞や癌細胞等に発現するケモカイン受容体であり、癌幹細胞マーカーのひとつでもある。リガンドである CXCL12 によって活性化され、CXCL12/CXCR4 シグナルが膵癌の増殖、浸潤、血管新生、転移に関わっていることが報告されてきた。われわれも、これまでに CXCL12/CXCR4 シグナルをはじめとするケモカインシグナルが膵癌において以下のような重要な役割を果たしていることを報告してきた¹⁾⁻³⁾。①CXCL12 は膵癌細胞の CXCR4 を介して、膵癌の増殖能、浸潤能、および CXCL8 分泌能を亢進する。②膵癌細胞との共培養により、線維芽細胞の CXCL12 分泌能は亢進する。③CXCL12 は血管内皮細胞の CXCR4 を介して、膵癌の血管新生能を亢進する。④CXCL12/CXCR4 シグナルの活性化により分泌が亢進した膵癌由来の CXCL8 は血管内皮細胞に作用して血管新生能を亢進する。

また、われわれが独自に樹立した Gemcitabine 耐性膵癌細胞株において CXCL12/CXCR4 シグナルの以下の働きも報告した⁴⁾。⑤Gem 耐性膵癌細胞株に Gem 刺激を行うと CXCR4 発現が亢進する。これに伴って耐性株の浸潤能が亢進する。⑥*in vivo* において、Gem 耐性株を移植したマウスを Gem で刺激すると腫瘍増殖が亢進し、この作用は、CXCR4 阻害剤によって抑制される。

今回、われわれは、独自に樹立した放射線耐性膵癌細胞株において CXCR4 の発現が亢進していること、放射線耐性株において CXCL12/CXCR4 シグナルが癌の浸潤能に関与しており、このシグナルを抑制することで浸潤能も抑制されることを明らかにした。CXCR4 阻害剤を用いて CXCL12/CXCR4 シグナルを抑制することが放射線に耐性化した膵癌に対して抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆されたが、臨床応用につなげるためには更なる機能解析が必要であると考えられる。

現在、CXCR4 阻害剤は多発性骨髄腫の治療薬として認可されている。また、膵癌に対しても海外で切除不能膵癌に対する臨床試験も行われるなど治療薬としても注目されている。良好な結果を得て臨床応用に至ることが期待される。

5.結語

今回われわれは、放射線耐性化した膵癌細胞において CXCR4 の発現が亢進していること、CXCL12/CXCR4 シグナルを抑制することで耐性株の浸潤能が有意に抑制されることを解明した。今後更なる解析を経て、CXCR4 阻害剤が臨床応用されることが期待される。

6.文献

- 1) Matsuo Y, Raimondo M, Woodward T A, Wallace, M B, Gill K R, Tong Z, et al. CXCL12/CXCR2 biological axis promotes angiogenesis in vitro and in vivo in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 2009;125: 1027-1037.
- 2) Matsuo Y, Ochi N, Sawai H, Yasuda A, Takahashi H, Funahashi H, et al. CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 α Co-operatively Promote Invasiveness and Angiogenesis in Pancreatic Cancer. *International Journal of Cancer*, 2009;124: 853-861.
- 3) Sung B, Jhurani S, Ahn KS, Matsuo Y, Yi T, Guha S, et al. Zerumbone down-regulates chemokine receptor CXCR4 expression leading to inhibition of CXCL12-induced invasion of breast and pancreatic tumor cells. *Cancer Res.* 2008; 68: 8938-44.
- 4) Morimoto M, Matsuo Y, Koide S, Tsuboi K, Shamoto T, Sato T, et al. Enhancement of the CXCL12/CXCR4 axis due to acquisition of gemcitabine resistance in pancreatic cancer: effect of CXCR4 antagonists. *BMC Cancer* 2016; 16: 305-318.