

Title	食道扁平上皮癌におけるケモカインレセプター発現と臓器特異性転移機構の解明
Sub Title	Chemokine receptor expression and organ : specific metastasis in esophageal squamous cell carcinoma
Author	入野, 誠之(Irino, Tomoyuki)
Publisher	
Publication year	2010
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2009.)
Abstract	食道扁平上皮癌におけるCCR7発現に関わる基礎的検討及び臨床的意義について検討した。当院で根治手術を行った術前未治療胸腹部食道扁平上皮癌患者105名(表在癌は61名)に対し、免疫組織化学的手法を用いて解析を行った。基礎的検討では、ヒト由来食道扁平上皮癌細胞株TE10種を用いて、real time RT-PCR、adhesion assay、リンパ節転移モデルマウスを用いた転移解析を行った。免疫組織化学ではCCR7陽性例は28例(26.7%)、うち23例(82.1%)が転移陽性(p=0.04)、OS及びRFSも有意な差を認めた(OS/RFS: p=0.02/p0.01。T1症例では、陽性例は17例(27.9%)、うち10例(58.9%)が転移陽性(p0.01)。OS・RFSにおいても有意な差を認めた(OS/RFS: p=0.04/p0.01)。RT-PCRでは、10種のTE全てに様々なレベルでの発現を認め、最も発現の少ないTE4及びTE4にCCR7を過剰発現させたTE4CCR7+を用いてadhesion assayを行ったところ、TE4CCR7+はTE4に比して内皮細胞に対する有意な接着能の亢進が認められた。また、リンパ節転移モデルマウスでは、TE4CCR7+はTE4に比してより早期に転移することが分かった。これらの結果から、CCR7は食道扁平上皮癌リンパ節転移における重要な役割を担っている可能性が示唆された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2008～2009 課題番号：20790970 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
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20790970seika

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790970
 研究課題名（和文） 食道扁平上皮癌におけるケモカインレセプター発現と臓器特異性転移機構の解明
 研究課題名（英文） Chemokine Receptor Expression and Organ-Specific Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma
 研究代表者
 入野 誠之（IRINO TOMOYUKI）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：20445216

研究成果の概要（和文）：食道扁平上皮癌における CCR7 発現に関わる基礎的検討及び臨床的意義について検討した。当院で根治手術を行った術前未治療胸腹部食道扁平上皮癌患者 105 名(表在癌は 61 名)に対し、免疫組織化学的手法を用いて解析を行った。基礎的検討では、ヒト由来食道扁平上皮癌細胞株 TE 10 種を用いて、real time RT-PCR、adhesion assay、リンパ節転移モデルマウスを用いた転移解析を行った。免疫組織化学では CCR7 陽性例は 28 例 (26.7%)、うち 23 例(82.1%)が転移陽性($p=0.04$)、OS 及び RFS も有意な差を認めた(OS/RFS: $p=0.02/p<0.01$)。T1 症例では、陽性例は 17 例(27.9%)、うち 10 例(58.9%)が転移陽性($p<0.01$)。OS・RFS においても有意な差を認めた(OS/RFS: $p=0.04/p<0.01$)。RT-PCR では、10 種の TE 全てに様々なレベルでの発現を認め、最も発現の少ない TE4 及び TE4 に CCR7 を過剰発現させた TE4^{CCR7+}を用いて adhesion assay を行ったところ、TE4^{CCR7+}は TE4 に比して内皮細胞に対する有意な接着能の亢進が認められた。また、リンパ節転移モデルマウスでは、TE4^{CCR7+}は TE4 に比してより早期に転移することが分かった。これらの結果から、CCR7 は食道扁平上皮癌リンパ節転移における重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of CCR7 in lymph node involvement in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) with *in vitro* assays and *in vivo* metastasis model. First, we performed cell adhesion assay to assess the adhesive ability of CCR7-expressing cells, using native TE4 and TE4^{CCR7+}, a CCR7-overexpressing cell line. Next, we examined how the CCR7-expressing cells behaved *in vivo* using newly-developed lymph node metastatic model mice. In a clinicopathological study, we analyzed 105 ESCC specimens with immunohistochemical staining. Cell adhesion assay revealed TE4^{CCR7+} had higher ability to attach to endothelial cells in the presence of the ligand ($p<0.01$). Furthermore, TE4^{CCR7+} cells showed earlier lymph node metastasis and proliferation in model mice. In the clinicopathological analysis, CCR7 expression was detected in 28 cases (27%), which was significantly associated with lymph node metastasis ($p=0.04$), 5-year RFS($p<0.01$) and OS ($p=0.02$). These results strongly suggest that CCR7, in part, plays a critical role in lymph node metastasis and subsequent poor prognosis in patients with ESCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：癌

1. 研究開始当初の背景

日本人における食道癌の罹患率は悪性新生物の中では第7位（2004年、男性）であり、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きたが、未だ術後5年生存率はStage II、IIIで30~50%前後に留まっているのが現状である。また、食道は解剖学的に漿膜を有さず、従って他の消化器癌に比べ高率に転移を来たすことが知られており、深達度が粘膜筋板(m₃)から粘膜下層(sm₁)に達した時点でそのリンパ節転移率は15%にも達するとされ、予後の悪化に寄与していることは想像に難くない。

癌治療のアプローチは現在手術、化学療法、放射線療法に大別され、特に化学療法に関してはここ数年で飛躍的な進歩を遂げているが、現在の5年生存率を著明に改善することを期待するには状況は厳しいと言わざるを得ない。癌が悪性たる所以は局所の浸潤傾向に加え他臓器やリンパ節に転移することであり、この転移を抑制することができれば、癌治療の新たな治療戦略として期待できるものである。

2001年、Mullerらが乳癌の臓器特異性転移にcytokineの一種であるchemokine及びそのchemokine receptor間の相互作用が深く関わっていることを報告した。chemokineはT細胞やB細胞のリンパ節・臓器への遊走及び各々の細胞分化に重要な役割を果たす分子として知られており、そのreceptorであるCCR7やCXCR4が血球系細胞のみならず同様に癌細胞に発現していることもわかっており、これらが*in vitro*, *in vivo*において癌細胞のリンパ節や特異的臓器への遊走に深くかかわっていることも示されている。

従って、本研究はこのchemokine/chemokine receptor axisに注目し、食道癌におけるリンパ節転移及び遠隔転移機構を解明することを目的とすると同時に、その抑制を試みることで新たな癌に対する治療戦略の基礎を築くことにある。現在、臨床医学における治療の2大コンセプトは個別化(individualization)及び縮小化・低侵襲(less invasive)であり、これらをどのように達成するかが今後の医療の重要な課題であることに異論はない。従って、食道癌における

chemokine/chemokine receptorの発現を明らかにすることで、chemokine receptor microarrayの確立による癌転移予測など、個々の癌患者に合わせた治療へのアプローチが可能となり、レセプターを発現しない癌に対するセンチネルリンパ節ナビゲーションサージェリーと組み合わせた縮小手術など非常に幅広い臨床応用が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は癌-宿主間のchemokineネットワークに着目し、消化器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する。特に食道扁平上皮癌における基礎的、臨床的検討により、chemokine、chemokine receptor発現と臓器特異性転移との関連を解析し、これらを標的とした新しい癌治療法、転移抑制剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 消化器癌、特に食道扁平上皮癌に着目し、CXCR4、CCR7などのchemokine receptor発現をreal time RT-PCR assay、Western blot、免疫染色法を用いてmRNA、蛋白レベルで解析する。またchemokine receptor発現を有する食道癌細胞株にそれぞれのligand(chemokine)を加え、細胞形態や遊走能、増殖能、浸潤能の変化を観察する。また、CCR7に関し低発現株(TE4)及び新たに作製した高発現株(TE4CCR7+)を用いて内皮細胞に対する接着能を検討した。

(2) リンパ節転移モデルマウスの作製法を確立し、chemokine receptor発現の有無がリンパ節転移に及ぼす影響の検討を行う。モデルマウスは、5週齢ヌードマウスの皮下に腫瘍を作製し、その腫瘍片を他のヌードマウスの両前腕に移植し、3,4,5週間後に腋窩リンパ節を摘出しDNAを抽出、Alu配列を用いてreal time PCRで腫瘍細胞の定量を行った。

(3) 切除された食道癌臨床検体約105例におけるこれらchemokine receptorの蛋白

発現を、免疫組織化学を用いて検討し、臨床病理学的因子（とくにリンパ節転移や他臓器転移）や予後との相関を解析する。

4. 研究成果

本研究においては、ケモカインレセプターの中でもリンパ節転移と関係の深い CCR7 に注目し解析を行った。

まず、胸部食道扁平上皮癌におけるケモカインレセプター CCR7 の発現とリンパ節転移及び予後との関連を検討した。対象は当院で根治術を施行した胸部食道扁平上皮癌患者 105 例であり、術前未治療の患者群である。これらに対し、抗 CCR7 抗体を用いた免疫組織化学的手法を用いて、その発現を検討した。評価は対象症例の臨床的背景を知らない医師 2 名により行い、その intensity (スコア 0 ~ 2) 及び proportion (スコア 0 ~ 3) を評価し、(intensity) × (proportion) ≠ 0 で CCR7 陽性と判定し、分類した。結果、CCR7 陽性例は 105 例中 28 例 (26.7%) に認められた。CCR7 陽性例は、リンパ節転移の頻度が有意に高く 28 例中 23 例 (82.1%) に転移を認めた ($p=0.04$)。また、予後に関しても 5 年全生存率 (OS) 及び無再発生存率 (DFS) に関して有意な差を認めた (OS/DFS: $p=0.02/p<0.01$)。T1 症例における検討では CCR7 陽性例は 61 例中 17 例 (27.9%)、リンパ節転移率は 17 例中 10 例 (58.9%) で ($p<0.01$)、OS、DFS においても同様に有意な差を認めた (OS/DFS: $p=0.04/p<0.01$)。食道扁平上皮癌における CCR7 発現は、リンパ節転移頻度及び再発生存期間に関して有意な相関を認めた。特に、T1 症例における検討では、EMR 後のリンパ節転移予測因子としても有用である可能性が示唆され、現在当院で試験的に行っている早期食道癌 EMR 症例におけるセンチネルリンパ節理論を用いた低侵襲治療と組み合わせたテーラード治療へ応用できる可能性が示唆された。

基礎的分野に関しては、食道癌細胞株 TE を用いて *in vitro* で実験を進めた。TE series において real time RT-PCR により細胞株全てにおいて程度の差はあるが、CCR7、CXCR4 の発現を認めた。Migration assay では、比較的 CCR7 が高発現している TE8 を選択し、リガンド (CCL21/SLC) の存在下と非存在下で、リアルタイムに動態を visualize できるデバイス (EZ-TAXIscan®) を用いてアッセイを行ったところ、リガンドの存在下において有意な遊走能の亢進が認められた ($p<0.05$)。これにより、細胞株に発現する CCR7 は何らかの機能を有することが確認された。続く Adhesion assay では、内皮細胞 (正常ヒト肺微小リンパ管内皮細胞) を敷き詰めた layer に細胞株を撒き、

CCL21/SLC を加えてその接着能を検討した。TE4^{CCR7+} は、TE4 と比較して有意に内皮細胞に対する接着能が亢進していたが ($p<0.01$)、他方内皮細胞が存在しない条件下においては、TE4^{CCR7+} と TE4 の間に接着能に差は認められなかった。これから、CCR7 は内皮細胞への接着のステップに関わっていることが示唆された。

リンパ節転移モデルマウスでは、腫瘍量 (DNA レベル) は移植後 5 週ではほぼ同等であったものの、3 週において TE4 と TE4^{CCR7+} の間に顕著な差が認められた。個体数を増やして再度検討を行ったところ、TE4^{CCR7+} を移植したマウスは、TE4 を移植したマウスに比して有意に多くの転移癌細胞が認められた。ただし、TE4 と TE4^{CCR7+} では、増殖能に差は認められていない。

これらの結果から、CCR7 はリンパ節転移に関わる因子の一つであることが強く示唆され、また、それは転移の初期の段階に関わるのではないかと考えられる。

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 5 件)

入野 誠之、他：食道扁平上皮癌における Chemokine Receptor CCR7 発現の基礎的検討とその臨床的意義、第 110 回日本外科学会学術総会、名古屋、2010.4.10

Irino T, et al., Involvement of Chemokine Receptor CCR7 in Lymph Node Metastasis and Poor Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma.、101st Annual Meeting 2010 American Association of Cancer Research、Washington D.C., USA, 2010.4.20

入野 誠之、他：食道扁平上皮癌におけるケモカインレセプター CCR7 の役割、第 47 回 日本癌治療学会学術集会、横浜、2009.10.23

入野 誠之、他：食道扁平上皮癌における転移及び予後予測因子としてのケモカインレセプター CCR7 の意義、第 64 回日本消化器外科学会総会、大阪、2009.7.16

入野 誠之、他：食道扁平上皮癌におけるケモカインレセプター CCR7 の意義、第 41 回 癌転移学会学術総会、旭川、2009.07.23

6 . 研究組織

(1)研究代表者

入野 誠之 (IRINO TOMOYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20445216

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし