



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1548号
学位記番号	第1105号
氏名	森本 守
授与年月日	平成 28年 9月 20日
学位論文の題名	<p>Enhancement of the CXCL12/CXCR4 axis due to acquisition of gemcitabine resistance in pancreatic cancer. effect of CXCR4 antagonists. (膵癌における Gemcitabine 耐性化に伴う CXCL12/CXCR4 シグナルの活性化と CXCR4 拮抗薬の有効性)</p> <p>BMC Cancer. 2016:16;305</p>
論文審査担当者	主査： 城 卓志 副査： 高橋 智, 竹山 廣光

論文内容の要旨

【目的】

進行または切除不能膵癌に対する化学療法として Gemcitabine (GEM)が広く使われてきたが、その効果は十分に満足できるものではない。その理由として膵癌の GEM に対する耐性化が考えられるが、そのメカニズムについてはまだ十分に解明されていない。また近年、癌の転移や浸潤にケモカインが重要な役割を果たしていることが報告されてきた。このうちケモカイン受容体 CXCR4 は多くの癌細胞に過剰発現していることが明らかになってきた。また、そのリガンドである CXCL12 と CXCR4 のシグナル伝達系が癌の転移・浸潤に重要な役割を果たすことが報告されている。我々も今までに、CXCL12/CXCR4 シグナルが CXCL8/CXCR2 シグナルと協調して作用することにより、膵癌の増殖・浸潤に作用していることを報告してきた。今回我々は、膵癌の GEM 耐性化に伴う CXCL12-CXCR4 シグナルの活性化の変化を検討し、耐性後の腫瘍増殖との関連性を検討した。さらに GEM 耐性膵癌における CXCR4 antagonist の抗腫瘍効果を検討した。

【方法】

膵癌細胞株 MIA PaCa-2 および AsPC-1 を用いて GEM 耐性株を樹立した。CXCR4 antagonist には AMD11070 および KRH3955 を使用した。(1) GEM 耐性株と感受性株の CXCR4 発現の差異を RT-PCR、ELISA および蛍光免疫染色で検討し、さらに GEM 刺激下での CXCR4 発現の変化を検討した。(2) 線維芽細胞(Fibroblast; FB)と GEM 耐性株または GEM 感受性株を double chamber 法を用いて共培養し、FB 由来の CXCL12 の発現の変化を RT-PCR および ELISA で検討した。さらに GEM 刺激の有無による FB の CXCL12 分泌能の変化を検討した。(3) GEM 耐性株または GEM 感受性株を CXCL12 刺激下で浸潤実験を行い、GEM 耐性に伴う浸潤能の変化を検討した。さらに GEM 耐性化によって亢進した浸潤能に対する CXCR4 antagonist (AMD11070 および KRH3955)の効果を検討した。(4) GEM 耐性株と GEM 感受性株の浸潤能の差異を、FB との共培養による invasion assay 検討し、同時に CXCR4 antagonist による抑制効果について検討した。(5) ノードマウスに GEM 耐性株または GEM 感受性株を皮下移植し腫瘍の増殖能を比較検討した。同時に GEM 刺激の有無または CXCR4 antagonist (AMD11070 および KRH3955)の有無での増殖能の変化を比較検討した。

【結果】

(1)RT-PCR、ELISA および蛍光免疫染色より、GEM の耐性化に伴い CXCR4 の発現が亢進することを確認した。また、GEM 耐性株の CXCR4 発現は GEM 刺激によりさらに亢進した。(2) GEM 耐性株との共培養により FB からの CXCL12 の分泌は有意に亢進した。GEM 処理を行った GEM 耐性株との共培養により、FB からの CXCL12 の分泌はさらに亢進した。(3) CXCL12 刺激により、GEM 耐性株の浸潤能は有意に亢進し、これは GEM 処理によりさらに亢進した。CXCL12 による GEM 耐性株の浸潤能の亢進は、CXCR4 antagonist (AMD11070 および KRH3955)により有意に抑制された。(4) FB との共培養により GEM 耐性株の浸潤能は有意に亢進し、それは CXCR4 antagonist により有意に抑制された。(5) ノードマウス皮下移植モデルにおいて、GEM 耐性株は GEM 投与により腫瘍増殖能が亢進し、GEM と CXCR4 antagonist の併用治療により最も増殖が抑制された。

【結論】

膵癌の GEM 耐性化は CXCL12-CXCR4 シグナルの活性化と強い関連性を持つことが確認できた。さらにこのシグナル活性による浸潤能や腫瘍増殖能の亢進を CXCR4 antagonist が抑制することが確認できた。以上より CXCL12-CXCR4 シグナルの制御は GEM 耐性膵癌に対する新規治療のターゲットとなりうることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

進行または切除不能膵癌に対する化学療法としては Gemcitabine (GEM)が広く使われてきたがその効果は十分に満足できるものではない。その理由として膵癌の GEM に対する耐性化が考えられるが、そのメカニズムについてはまだ十分に解明されていない。近年の報告では癌の転移や浸潤にケモカインが重要な役割を果たしていることが分かってきている。このうちケモカイン受容体 CXCR4 は多くの癌細胞に過剰発現していることが明らかになってきた。また、そのリガンドである CXCL12 と CXCR4 のシグナル伝達系が癌の転移・浸潤に重要な役割を果たすという報告もされている。本研究の目的は、①膵癌の GEM 耐性化と CXCL12-CXCR4 シグナルの活性化の関連性 ②耐性獲得後の腫瘍増殖との関連性 ③GEM 耐性膵癌における CXCR4 antagonist の抗腫瘍効果 を明らかにすることである。

まず膵癌細胞株 MIA PaCa-2 および AsPC-1 を用いて GEM 耐性株を樹立した。CXCR4 antagonist には AMD11070 および KRH3955 を使用した。(1) GEM 耐性株と感受性株の CXCR4 発現の差異を RT-PCR, ELISA および蛍光免疫染色で検討し、さらに GEM 刺激下での CXCR4 発現の変化を検討した。(2) 線維芽細胞(Fibroblast; FB)と GEM 耐性株または GEM 感受性株を double chamber 法を用いて共培養し、FB 由来の CXCL12 の発現の変化を RT-PCR および ELISA で検討した。さらに GEM 刺激の有無による FB の CXCL12 分泌能の変化を検討した。(3) GEM 耐性株または GEM 感受性株を CXCL12 刺激下で浸潤実験を行い、GEM 耐性に伴う浸潤能の変化を検討した。さらに GEM 耐性化によって亢進した浸潤能に対する CXCR4 antagonist (AMD11070 および KRH3955)の効果を検討した。(4) GEM 耐性株と GEM 感受性株の浸潤能の差異を FB との共培養による invasion assay 検討し、同時に CXCR4 antagonist による抑制効果について検討した。(5) ノードマウスに GEM 耐性株または GEM 感受性株を皮下移植し腫瘍の増殖能を比較検討した。同時に GEM 刺激の有無または CXCR4 antagonist (AMD11070 および KRH3955)の有無での増殖能の変化を比較検討した。

結果は、(1) RT-PCR, ELISA および蛍光免疫染色より、GEM の耐性化に伴い CXCR4 の発現が亢進することが確認できた。また GEM 耐性株の CXCR4 発現は GEM 刺激によりさらに亢進していた。(2) GEM 耐性株との共培養により FB からの CXCL12 の分泌は有意に亢進していた。GEM 処理を行った GEM 耐性株との共培養により、FB からの CXCL12 の分泌はさらに亢進していた。(3) CXCL12 刺激により GEM 耐性株の浸潤能は有意に亢進し、これは GEM 処理によりさらに亢進していた。CXCL12 による GEM 耐性株の浸潤能の亢進は、CXCR4 antagonist (AMD11070 および KRH3955)により有意に抑制されていた。(4) FB との共培養により GEM 耐性株の浸潤能は有意に亢進し、それは CXCR4 antagonist により有意に抑制されていた。(5) ノードマウス皮下移植モデルにおいて、GEM 耐性株は GEM 投与により腫瘍増殖能が亢進し、GEM と CXCR4 antagonist の併用治療により最も増殖が抑制されていた。

以上より、膵癌の GEM 耐性化により CXCL12-CXCR4 signaling axis が活性化していることが確認できた。このシグナル活性に伴う浸潤能や腫瘍増殖能の亢進を CXCR4 antagonist が抑制したことにより CXCL12-CXCR4 signaling axis が GEM 耐性膵癌に対する新規治療のターゲットになりうると考えられ、AMD11070 や KRH3955 による二次治療の可能性が示唆された。

主査からは GEM 耐性化の機序は何か、また耐性株の CXCL12-CXCR4 シグナルに注目した理由など7項目、副査（高橋）からは、GEM耐性株の性質について、GEM 耐性株との共培養により FB からの CXCL12 の分泌は有意に亢進するメカニズムは何かなど 13 項目の質問がなされた。副査（竹山）からは専門領域の質問として、border line resectable 膵癌の治療について、また肝胆膵手術への腹腔鏡下手術の今後の展望についての質問があった。一部返答に窮するところもありましたがおおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は薬剤耐性膵癌の新たな治療法を示唆しており意義のある研究といえる。従って本論文の筆者は博士（医学）の称号を与えるに相応しいと判断した。