

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	片山 昭公
-------	-----	-----	-------

学 位 論 文 題 目

Expression of CXCR4 and its down-regulation by interferon gamma in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines: A possible role for tumor invasion and proliferation.

(邦題：頭頸部扁平上皮癌細胞における CXCR4 発現とインターフェロンガンマによる CXCR4 発現低下：細胞浸潤と細胞増殖に与える影響について)

共 著 者 名

荻野 武

坂東 伸幸

野中 聡

原渕 保明

(未 公 表)

I. 研究目的

ケモカインは免疫、炎症反応時において白血球の遊走を惹起するのみならず細胞増殖やアポトーシス、血管新生にも関与している(1)。近年、乳癌をはじめとする悪性腫瘍細胞においてケモカインスーパーファミリーの中で最も強力な化学誘引物質である SDF-1 の特異的レセプター CXCR4 が発現し、SDF-1/CXCR4 システムにより腫瘍細胞の遊走、浸潤と転移を促進することが報告されている(2-4)。一方、白血球において IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β などのサイトカイン刺激が CXCR4 発現に影響を与えることが報告されているが(5)、悪性腫瘍細胞における報告は散見するのみでありその作用は明かにされていない。そこで本研究では、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 細胞株を用い CXCR4 の発現解析を行い、さらに SDF-1/CXCR4 システムが細胞浸潤、細胞増殖、シグナル伝達経路へ与える影響について検討した。つづいてサイトカイン刺激による HNSCC 細胞株の CXCR4 発現変化も検討し、細胞浸潤、細胞増殖に与える影響についても検討した。最後に 56 名の HNSCC 患者から得た組織標本を用い、免疫組織学的に解析し CXCR4 発現と臨床因子、予後との関係を検

討した。

II. 材料・方法

1. HNSCC 細胞株

SAS (舌癌)、Ho-1-u-1(口腔底癌)、CA9-22、HSQ-89 (上顎歯肉癌)、IMC-3、Nakamura (上顎癌) の HNSCC 細胞 6 株を用いた。CXCR4 発現陽性細胞として T 細胞株 Jurkat を使用した。

2. HNSCC 組織

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学で治療を行った 56 症例の HNSCC 組織を用いて免疫組織学的解析を行なった。SDF-1 遺伝子発現陽性対象として頸部リンパ節組織を用いた。研究使用にあたっては患者よりインフォームドコンセントを得た。

3. RT-PCR 法による CXCR4、SDF-1 遺伝子発現解析

HNSCC 細胞 6 株を用い RT-PCR 法にて遺伝子発現解析を行なった。使用した CXCR4、SDF-1、 β -actin オリゴプライマーは独自に設計合成した。CXCR4 遺伝子発現陽性対象として Jurkat 細胞、SDF-1 遺伝子発現陽性対象として頸部リンパ節組織を用いた。サイトカイン刺激試験においては RNA 抽出に先立ち、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 刺激下で細胞を培養した。

3. フローサイトメトリーによる CXCR4 蛋白発現解析

HNSCC 細胞 6 株を用いフローサイトメトリーによる CXCR4 蛋白発現解析を行なった。抗 CXCR4 抗体で 60 分 室温、PE 標識抗マウス IgM ノグロブリン抗体で 30 分室温にてインキュベートした。解析には EPICS ELIETE flow cytometer を用いた。CXCR4 発現陽性対象として Jurkat 細胞を用いた。サイトカイン刺激試験においては、細胞を IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β で刺激し経時的に CXCR4 発現変化を観察した。

4. SDF-1 指向性細胞浸潤の検討 (Migration Assay)

HNSCC 細胞 6 株を対象とし、24 穴プレートと 8 μ m 多孔カルチャーインサートを用いた Migration Assay を行なった。上層はカルチャーインサートの多孔メンブレン上面にマトリゲルで薄層を作成し、 5×10^4 個細胞を、下層の 24 穴プレートには SDF-1 添加または無添加のメディウムを注入した。37°C 24 時間培養後のカルチャーインサートメンブレン下面へ浸潤した細胞数を測定した。CXCR4 抑制試験では上層に CXCR4 中和抗体を添加、IFN- γ 刺激試験では上層に IFN- γ を添加し培養した。

5. SDF-1 依存性細胞増殖の検討 (MTT Assay)

CXCR4 発現 HNSCC 細胞株 HSQ-89、IMC-3 細胞と、CXCR4 非発現 SAS 細胞を実験対象とし、96 穴プレートに 2×10^3 個細胞を SDF-1 刺激、非刺激下で培養し、methylthiazoletetrazolium を加え 2 時間インキュベートした後、ELISA プレートリーダーにて波長 490 nm の吸光度を測定した。CXCR4 抑制試験ではメディウムに CXCR4 中和抗体を加え、IFN- γ 刺激試験では IFN- γ を加え培養した。

6. SDF-1/CXCR4 によるシグナル伝達の解析 (Western blot 法)

CXCR4 発現 HNSCC 細胞株 HSQ-89、IMC-3 細胞を無血清メディアウムで一晩培養した後、SDF-1 刺激し経時的にそれぞれ細胞を融解、蛋白抽出し、SDS-PAGE ゲルにて分離した後、PVDF 膜へ転写した。抗リン酸化 p44/42 抗体、p44/42 抗体、リン酸化 Akt 抗体、Akt 抗体をそれぞれ一次抗体とし、2 次抗体は HRP 標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を用いた。シグナルは ECL 法で検出した。

7. 免疫組織学的解析

56 症例の未治療 HNSCC 組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を材料とした。脱パラフィン後、抗原賦活処理、内因性ペルオキシターゼのブロッキングを行なった。抗 CXCR4 抗体、抗 SDF-1 抗体でそれぞれ 4°C で一晩反応させた。ペルオキシターゼ標識ポリマー試薬で反応させ、DAB で発色した。CXCR4 の染色強度の評価は組織浸潤単核球細胞の染色強度と比較し以下の 4 段階にスコア化し、さらに 2 群に分類した。強い染色：スコア 3、同等の染色：スコア 2、弱い染色：スコア 1、染色性なし：スコア 0、スコア 1-3：CXCR4 発現、スコア 0：CXCR4 非発現。

8. 統計解析

2 因子間の検定には Mann-Whitney U 検定を用いた。疾患特異的生存率について Kaplan-Meyer 法による解析を行なった。いずれも $p < 0.05$ を有意とした。

III. 成績

1. HNSCC 細胞株における CXCR4 遺伝子、蛋白発現

HNSCC 細胞 6 株中、HSQ-89、IMC-3 と Nakamura 細胞で CXCR4 遺伝子発現と蛋白発現を認めた。SAS、Ho-1-u-1、CA9-22 細胞では CXCR4 は発現していなかった。

2. CXCR4 発現陽性細胞株における SDF-1 指向性細胞浸潤

CXCR4 発現 IMC-3 細胞は SDF-1 濃度依存的に細胞浸潤が有意に増加した(それぞれの濃度において $p < 0.01$)。CXCR4 発現陽性 HSQ-89 と Nakamura 細胞においても同様に細胞浸潤が有意に増加し(それぞれ $p < 0.01$)、CXCR4 中和抗体添加で細胞浸潤が有意に抑制された(それぞれ $p < 0.01$, $p = 0.0150$)。CXCR4 非発現 SAS、Ho-1-u-1、CA9-22 細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

3. CXCR4 発現陽性細胞株における SDF-1 依存性細胞増殖

CXCR4 発現細胞株 IMC-3 は SDF-1 刺激濃度依存的、時間依存的に細胞増殖が有意に増加した(それぞれの濃度において $p < 0.01$)。HSQ-89 細胞においても同様に細胞増殖が有意に増加し($p < 0.01$)、CXCR4 中和抗体にて有意に抑制された($p < 0.01$)。CXCR4 非発現 SAS 細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

4. SDF-1/CXCR4 による p44/42 MAPK と Akt pathways の活性化

CXCR4 発現細胞株 HSQ-89 と IMC-3 を 50ng/ml SDF-1 で刺激し、p44/42 MAPK と Akt のリン酸化を解析した結果、どちらの細胞においても、SDF-1 刺激後 5 分から観察を終了した 60 分まで、明かな p44/42 MAPK

と AKT のリン酸化上昇を確認した。

6. IFN- γ による CXCR4 発現抑制

IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β の 3 種のサイトカインにおいて、TNF- α と IL-1 β 刺激はどの HNSCC 細胞株に対しても CXCR4 の発現に影響を与えなかった。IFN- γ は刺激濃度依存的に CXCR4 発現 IMC-3 と Nakamura 細胞の CXCR4 遺伝子発現を抑制した。また IFN- γ 刺激下で IMC-3 と Nakamura 細胞では経時的に CXCR4 蛋白発現が減少した。CXCR4 非発現 SAS, Ho-1-u-1, CA9-22 細胞と CXCR4 発現 HSQ-89 細胞において CXCR4 発現は IFN- γ の影響を受けなかった。

7. IFN- γ による SDF-1 依存的細胞浸潤と細胞増殖の抑制

IFN- γ 刺激下で CXCR4 発現 IMC-3 と Nakamura 細胞で SDF-1 指向性細胞浸潤が有意に低下した ($p < 0.01$, $p = 0.025$)。CXCR4 非発現 SAS, Ho-1-u-1, CA9-22 細胞と CXCR4 発現 HSQ-89 細胞では SDF-1 指向性細胞浸潤は IFN- γ の影響を受けなかった。また IFN- γ 刺激により IMC-3 細胞で有意に SDF-1 依存性細胞増殖が低下 ($p < 0.05$) した。CXCR4 非発現 SAS 細胞と CXCR4 発現 HSQ-89 細胞の細胞増殖は IFN- γ の影響を受けなかった。

8. HNSCC 組織における CXCR4 と SDF-1 の発現

HNSCC 原発部位 56 例中、CXCR4 の発現を 16 例 (28.6%) に認めた。診断時頸部リンパ節転移が N2 以上の症例は、N1 以下の症例に対し (1.333 ± 1.336 vs. 0.380 ± 0.753 , $p = 0.0131$) また、遠隔転移を生じた症例は、遠隔転移を生じなかった症例に対し (1.000 ± 1.279 vs. 0.341 ± 0.680 , $p = 0.0458$) CXCR4 発現スコアが有意に高い結果が得られた。CXCR4 発現陽性群は CXCR4 発現陰性群に対し疾患特異的生存率が有意に低い結果が得られた ($p = 0.0380$)。SDF-1 の発現は癌原発部位の間質組織では発現微弱であったが、転移リンパ節での CXCR4 陽性癌組織周囲間質では比較的強発現していた。

IV. 考案

本研究では HNSCC 細胞株において初めて CXCR4 発現を確認し、SDF-1 により p44/42 MAPK と Akt pathway の活性化が起り、細胞浸潤と細胞増殖が促進されることを示した。また、HNSCC 56 症例の免疫組織学的検討において、頸部リンパ節転移が進行している症例、経過中に遠隔転移を生じた症例において CXCR4 発現が高く、さらに CXCR4 発現が疾患特異的生存率を低下させることを示した。SDF-1 は原発部位の間質では発現は微弱であったのに対し、転移リンパ節の癌組織周囲間質では比較的強く発現していた。これらの結果は SDF-1/CXCR4 作用が CXCR4 発現 HNSCC 細胞の浸潤と細胞増殖を促進し、SDF-1 が豊富に存在する組織への転移を促進し生命予後を悪化させることを示唆するものであった。これまで血球系細胞において IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β などをはじめとするサイトカイン刺激が CXCR4 発現を増加、抑制する報告 (5) は存在するが、サイトカイン刺激による悪性腫瘍細胞の CXCR4 発現変化を検討した論文は散見するのみ

であり、その詳細は依然として不明であった。しかし、本研究において、IFN- γ 刺激により CXCR4 発現 HNSCC 細胞株の CXCR4 発現を低下させ、さらにそれらの細胞に対し IFN- γ 刺激が CXCR4 の発現低下を介し細胞浸潤と細胞増殖を抑制することを示した。今回我々の研究結果は IFN- γ が直接 HNSCC 細胞に作用し CXCR4 の発現低下を介した細胞浸潤と細胞増殖の抑制が可能であることを示しており、IFN- γ は CXCR4 を発現している HNSCC 症例に対する治療において有効な薬剤である可能性が示唆された。

V. 結論

1. HNSCC 細胞株にて CXCR4 遺伝子発現と蛋白発現を認めた。
2. CXCR4 発現 HNSCC 細胞株は SDF-1 により細胞浸潤、細胞増殖が促進された。
3. IFN- γ 刺激により CXCR4 発現 HNSCC 細胞株の CXCR4 遺伝子発現、蛋白発現が抑制された。
4. IFN- γ 刺激による CXCR4 発現低下を介して、CXCR4 発現 HNSCC 細胞株の SDF-1 により引き起こされる細胞浸潤と細胞増殖は抑制された。
5. HNSCC 56 症例の免疫組織学的検討において、頸部リンパ節転移が進行している症例、経過中に遠隔転移を生じた症例において CXCR4 発現が有意に高く、CXCR4 発現症例では疾患特異的生存率が低下していた。

以上の結果より、頭頸部扁平上皮癌治療における IFN- γ の有用性と新たな薬剤開発の可能性が考えられた。

VI. 参考文献

1. Wang, J. M., Deng, X., Gong, W., and Su, S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods*, 220: 1-17, 1998.
2. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410: 50-56, 2001.
3. Hwang, J. H., Chung, H. K., Kim, D. W., Hwang, E. S., Suh, J. M., Kim, H., You, K. H., Kwon, O. Y., Ro, H. K., Jo, D. Y., and Shong, M. CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 408-416, 2003.
4. Phillips, R. J., Burdick, M. D., Lutz, M., Belperio, J. A., Keane, M. P., and Strieter, R. M. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 1676-1686, 2003.
5. Nagase, H., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Imanishi, M., Tsuno, N. H., Matsushima, K., Yamamoto, K., Morita, Y., and Hirai, K. Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J Leukoc*

Biol, 71: 711-717, 2002.

VI. 参考文献

1. Katayama, A., Bando, N., Kishibe, K., Takahara, M., Ogino, T., Nonaka, S., and Harabuchi, Y. Expressions of matrix metalloproteinases in early stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. Clin Cancer Res, (accepted for publication in the January 15, 2004 issue: in press).
2. Katayama, A., Nonaka, S., Bando, N., Imada, M., Hayashi, T., and Harabuchi, Y. [Evaluation of preoperative simultaneous radiochemotherapy combined with carboplatin and tegafur/uracil]. Gan To Kagaku Ryoho, 29: 873-879, 2002.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	片山 昭公
審査委員長 奥村利勝  審査委員 小川勝洋  審査委員 原渕保明 			
学 位 論 文 題 目 Expression of CXCR4 and its down-regulation by interferon gamma in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines: A possible role for tumor invasion and proliferation. (邦題：頭頸部扁平上皮癌細胞における CXCR4 発現とインターフェロンガンマによる CXCR4 発現低下：細胞浸潤と細胞増殖に与える影響について)			
ケモカインは免疫、炎症反応のみならず細胞増殖やアポトーシス、血管新生にも関与している。近年、乳癌をはじめとする悪性腫瘍細胞においてケモカインスーパーファミリーの中で最も強力な化学誘引物質である SDF-1 の特異的レセプター CXCR4 が発現し、SDF-1/CXCR4 システムと腫瘍細胞の遊走、浸潤と転移との関連が報告されている。しかし頭頸部扁平上皮癌での検討はなく、本研究は頭頸部扁平上皮癌の細胞株と当該患者から得た組織を用いて、頭頸部扁平上皮癌における CXCR4 の役割を解明することを目的にした。実験結果は大きく以下の3点に要約できる 1 調べた頭頸部扁平上皮癌細胞 6 株中 3 株で CXCR4 遺伝子と蛋白発現を認めたが残りの 3 株では CXCR4 は発現していなかった。この CXCR4 発現陽性の 3 細胞株では、CXCR4 のリガンドである SDF-1 は細胞の浸潤と増殖を増加させたが、発現陰性細胞 3 株ではこれらの現象は認められなかった。CXCR4 中和抗体で SDF-1 による細胞浸潤と細胞増殖増加がブロックされ、細胞浸潤や増殖は CXCR4 を介していることが示唆された。CXCR4 発現細胞株では SDF-1 により、p44/42 MAPK と Akt のリ			

ン酸化を促進させたことより、これらの分子が SDF-1/CXCR4 活性化による細胞浸潤や増殖刺激のシグナル伝達に関与することが示唆された。

2 3種のサイトカインのうち、TNF- α と IL-1 β はどの頭頸部扁平上皮癌細胞株に対しても CXCR4 の発現に影響を与えなかったが、IFN- γ は CXCR4 発現を抑制した。IFN- γ は CXCR4 発現細胞でのみ SDF-1 による細胞浸潤と増殖を抑制したことから IFN- γ は CXCR4 の発現低下を介して腫瘍細胞の浸潤や増殖を抑制することが示唆された。

3 CXCR4 の免疫染色による臨床病理学的検討では、頸部リンパ節転移例および遠隔転移を生じた例で CXCR4 発現が有意に高いこと、CXCR4 陽性例では生存率が低下していることが示され、実際の臨床例でも CXCR4 の発現が腫瘍細胞の悪性度を規定する分子である可能性が明らかになった。

以上の結果より、頭頸部扁平上皮癌細胞での CXCR4 の発現とその発現調節としての IFN- γ の有用性が示唆され、臨床的にも極めて重要な知見が得られた。査問時対応も適切で関連領域の知識も充分であり学位論文に値すると判断した。