

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591565

研究課題名（和文） CXCR4/CXCL12 と HB-EGF を標的とした胃癌標的治療法の開発

研究課題名（英文） Development of molecular target therapy for gastric cancer targeted for the CXCR4/CXCL12 axis and HB-EGF

研究代表者 安本 和生 (YASUMOTO KAZUO)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：90262592

研究成果の概要（和文）：これまでのわれわれの検討から胃癌癌性腹膜炎発症進展における CXCR4/CXCL12 axis の関与が明らかとなった。そこで本研究では、癌性腹水中に存在する癌細胞増殖因子、とくに EGFR ligand axis に着目した。本研究結果から、癌性腹水中には EGFR リガンド中で amphiregulin、HB-EGF が多量に存在し、CXCR4 発現胃癌細胞（EGFR 高発現）に対して強力な細胞増殖作用を有すること、すなわち EGFR/EGFR ligand axis (amphiregulin, HB-EGF) が、胃癌性腹膜炎形成に重要な役割を果たし、CXCR4/CXCL12 axis との相互促進作用を介して、本病態の発症進展に深く関与することを初めて明らかにした (Clin Cancer Res 2011 in press)。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed that the EGFR ligands, amphiregulin and HB-EGF, are abundant in malignant ascites. Amphiregulin strongly enhanced the proliferation of CXCR4-expressing human gastric cancer NUGC4 cells, whereas HB-EGF markedly induced migration of fibroblasts. Moreover, HB-EGF and CXCL12 together enhanced TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE)-dependent amphiregulin shedding from functional CXCR4-expressing NUGC4 cells. Cetuximab, an anti-EGFR monoclonal antibody, effectively reduced tumor growth and ascites formation, and therefore dramatically prolonged survival in nude mice inoculated with NUGC4 cells. Our findings provide a novel insight into treatments that target tumor cells and their microenvironments during the development of peritoneal carcinomatosis from gastric cancer (Clin Cancer Res 2011 in press).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

キーワード：胃十二指腸外科学

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌腹膜播種は、再発症例の半数以上を占める最も予後不良な難治性の病態である (Duarte I, et al. Human Pathol

1981;12:237-42)。日本人のがん死亡の中で胃癌はいまだ上位を占め、本病態成立機序も明らかにされていない。早期診断が非常に困難なため病態が完成して初めて治療が開始

されるのが実状である。現在、新たな試みとして腹腔内薬物投与などが試みられているが、治療効果において限界がある。本病態成立に本質的に関わる因子の同定とその制御に基づく新規治療法の開発は、急務の重要課題である。腹膜播種指向性胃癌細胞が特異的に発現する分子種の中で、いかなる分子が責任分子として作用し、宿主側の微小環境との相互作用の上で本病態を形成するのかは全く不明である。

我々は、ケモカインが、炎症時のみならず癌の病態形成（遊走・浸潤・増殖）にも深く関与することを報告してきた (Yasumoto K, et al. J Biol Chem 1992; 267:22506-511, Yasumoto K, et al. Cancer Res 1995; 55:921-7)。近年、乳癌の臓器選択的な転移にケモカインが深く関与することが実験的に初めて報告された (Muller A, et al. Nature 2001; 410:50-6)。我々は、平成 16 年から科学研究助成金・基盤 (C)「ヒト胃癌腹膜播種形成におけるケモカインとそのレセプター発現の臨床的意義」において CXCR4/CXCL12 パスウェイが本病態成立に重要な役割を果たすことを臨床的にも動物モデルを用いた治療実験においても明らかにした (Yasumoto K, et al. Cancer Res 2006; 66:2181-7)。

本報告の中で、①腹膜播種指向性ヒト胃癌細胞はもともと生物活性を有する CXCR4 レセプターを高発現しており、転移臓器である腹膜に豊富に発現するリガンド CXCL12 に（肝臓やリンパ節にはほとんど発現がない）選択的に遊走を起しその場で強力に増殖が誘導されること ②臨床検体を用いた検討においても胃癌原発巣における CXCR4 発現と腹膜播種形成に有意な相関があること ③ CXCR4 高発現ヒト胃癌細胞を腹腔内移植するマウス xenograft 腹膜播種モデルを用いた治療実験で、CXCR4 阻害剤 AMD3100 による腹膜播種発症の有意な抑制を立証した。これら知見は、胃癌が腹膜に転移する臓器選択性を説明する分子を初めて明らかにしたことで有意義が大きい。

がん性腹水中には癌細胞の増殖を促し本病態を進展悪化させる増殖因子が豊富に存在する (Mills GB, et al. Cancer Res 1988; 48:1066-71)。EGFファミリーは、強力ながん細胞増殖因子として知られている。実際、腫瘍組織におけるEGFレセプターの過剰発現と予後不良は有意に相関することが胃癌、卵巣癌、肺癌などで報告されている (Armando GD, et al. Modern Pathology 2004; 17:579-87, Scambia G, et al. J Clin Oncol 1992; 10:529-35)。最近我々もCXCL12以外の増殖因子に着目し検討を行った。興味深いことに、がん性腹水中には、EGFファミリーの中で中心的存在である EGF は検出されず、なかで

も HB-EGF が、50~2000 pg/ml (平均 190 pg/ml) と高濃度に存在することが判明した。CXCR4高発現胃癌細胞は、*in vitro*においてHB-EGFの刺激により濃度依存的に10pg/mlから増殖を示し、さらにCXCL12とのコンビネーションによる刺激で、相乗的な高い増殖促進が観察された (未発表データ)。さらにヒト胃癌細胞株の中でHB-EGF mRNAを発現し、かつHB-EGF蛋白を産生する細胞株は、全例マウス*i.p.* 移植後一定期間後にがん性腹水を伴う腹膜播種を形成した。腹膜播種形成と癌細胞からのHB-EGF蛋白産生能 (sheddingによる活性化機構の有無も関与) との間には非常に高い関連性があることが判明した。HB-EGFの産生誘導活性化機序ならびにCXCR4/CXCL12パスウェイとの相互作用を解明することは、腹膜播種形成をコントロールする重要な鍵となる標的を明らかにし、新たながん標的治療法の開発を可能にする。

## 2. 研究の目的

胃癌診療の中で、その予後を最も左右する癌性腹膜炎（腹膜播種）には、いまなお効果的な治療法がない。我々は、ケモカインレセプターCXCR4とその唯一のリガンドCXCL12の相互作用 (CXCR4/CXCL12 パスウェイ) が、本病態の発症進展に重要な役割を果たすことを見出した。本研究では、腹膜播種指向性胃癌細胞に選択的に高発現するCXCR4レセプターならびに強力な増殖促進作用を誘導するリガンドCXCL12の産生誘導機序を分子生物学的に解明する。次に、CXCL12とともにがん性腹水中に豊富に存在し、強力な胃癌細胞増殖能を有する増殖因子 Heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF) の産生誘導活性化機序の解明ならびにCXCL12との相乗的で非常に強力ながん細胞増殖作用に着目し、その分子メカニズムの解明から新たな分子標的薬の開発を行う。さらに、CXCR4/CXCL12とHB-EGF/EGFRを標的とした胃癌標的治療法の確立のために、新規に開発され高い阻害活性をもつ特異的CXCR4阻害剤、HB-EGFの競合的拮抗阻害剤; CRM197 (中和活性を有するジフテリア毒素のミュータントで大阪大学目加田教授より供与) ならびにEGFRに対するヒト型モノクローナル抗体; Panitumumab によるがん抑制効果について、臨床病態をよく反映するマウス xenograft 腹膜播種モデル (下記参照) を用いて検証する。

## 3. 研究の方法

我々は、これまでに腹膜播種の発症と進展にCXCR4/CXCL12パスウェイが深く関与することを明らかにした (Yasumoto K, et al. Cancer Res 2006)。しかしながら、CXCR4レセプターや唯一のリガンドCXCL12の発現調節機序はいまだ十分に明らかにされてい

い。さらに、がん性腹水は腹膜播種を悪化させる増殖因子の宝庫と考えられている。腹水中の CXCL12 以外の胃癌細胞増殖因子を明らかにし、とくに CXCL12 との相互作用において腹膜播種増悪を促すメカニズムについて分子生物学的な解明を試みる。CXCR4/CXCL12 パスウェイと HB-EGF との CXCR4 発現胃癌細胞の相乗的増殖促進作用は、これまでに報告のない新たなメカニズムである。がん性腹水中に豊富に存在することや生理的濃度での強力な増殖誘導能は、本病態発症進展の鍵となる可能性が高い。本研究では、臨床病態をよく反映するマウス xenograft 腹膜播種モデルを用いて、両経路を標的とした新たながん標的治療法の開発を目指した。

①あらかじめ同意の得られた進行胃癌患者の中で癌性腹水を発症した症例の腹水を一部採取し、遠心後上清は $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し測定に備えた。CXCL12をはじめ basic FGF, VEGF, TGF  $\beta$ , EGF ファミリー (EGF, HB-EGF, TGF  $\alpha$ , Amphiregulin), Lysophosphatidic acid (LPA; EGF ファミリーをはじめ増殖因子の活性化から癌細胞の増殖に関与することが知られ、がん性腹水中に存在することが報告された。) (Miyamoto S, et al. Cancer Res 2004;64:5720-7) などの増殖因子の有無について ELISA 法を用いて測定を試みた。がん性腹水中に存在が確認された増殖因子 (EGFR ligands, amphiregulin, HB-EGF) によるヒト胃癌細胞の増殖促進作用について *in vitro* にて検討した (WST-8 法)。EGF および TGF  $\alpha$  は測定感度以下であった。高濃度に存在したこれら2つの増殖因子と CXCL12 とのコンビネーションによる相加・相乗細胞増殖効果についても検討を行った。

②癌性腹膜炎を発症したヒト胃癌原発巣を用いて、本病態発症に深く関与する CXCR4 および EGFR の発現の有無を免疫組織学的に検討した。発現の頻度と癌病態の進行・予後との相関についても検討した。

③腹水中に存在が確認された増殖因子 (EGFR ligands, amphiregulin, HB-EGF) について、その産生誘導機序を胃癌細胞株ならびに癌性腹膜炎発症の微小環境を形成する線維芽細胞・腹膜中皮細胞についても発現を検討した。これら EGFR ligands amphiregulin, HB-EGF は、細胞膜に proto タイプとして存在し、shedding され活性化することが知られているがその機序についても検討を加えた。

④腹膜播種 (癌性腹膜炎) 発症には、胃癌細胞上に発現するケモカイン CXCR4 が関与することが先の我々の研究で明らかとなったが、これら腹水中に存在が確認され胃癌細胞に対する強力な増殖活性が明らかとなった増殖因子 EGFR ligands (amphiregulin, HB-EGF) ならびに CXCL12 (CXCR4 の唯一のリガンド) 刺激による CXCR4 発現増強の有無を検

討した。

⑤癌病態成立に癌の微小環境の関与の理解は、欠かせない。線維芽細胞は、癌間質細胞の主となる細胞群である。腹水中に存在が確認されたこれら2つの増殖因子 (EGFR ligands, amphiregulin, HB-EGF) による遊走・増殖活性についても検討した。

⑥上記の検討から、腹膜播種発症進展に EGFR ligands, amphiregulin, HB-EGF が深く関与することが推察されたため、マウス xenograft 癌性腹膜炎発症モデルを用いて EGFR モノクローナル抗体 cetuximab により癌性腹膜炎の発症が抑制され、生存期間の延長が得られるかについて検討した。

#### 4. 研究成果

われわれは、癌性腹水中に存在する癌細胞増殖因子 (Mills GB, et al. Cancer Res 1988; 48:1066-71) に着目し、EGFR/EGFR ligand axis が本病態形成に深く関与することを初めて明らかにした。①癌性腹水中には EGFR リガンド中で amphiregulin, HB-EGF が多量に存在し、CXCR4 発現胃癌細胞 (EGFR 高発現) に対して強力な細胞増殖作用を有する。とくに、amphiregulin が HB-EGF に比して強力であった。②癌性腹膜炎を発症したヒト胃癌原発巣では、CXCR4 および EGFR が高頻度 (76%) に発現し、癌病態の進行・予後と EGFR 発現が相関する。③amphiregulin は胃癌細胞から自ら産生誘導される (shedding) が、HB-EGF の自己産生誘導はない。Amphiregulin の産生誘導は、これら HB-EGF ならびに CXCL12 の両刺激により相乗的に促進する。本分泌機序には TACE (ADAM17) が深く関与する。④ amphiregulin, HB-EGF はともに、CXCR4 発現胃癌細胞上の CXCR4 発現を増強する。⑤一方、HB-EGF には、ヒト線維芽細胞 (amphiregulin を自己産生) の増殖・運動能を亢進する。⑥ EGFR のモノクローナル抗体 (中和) cetuximab は、マウス xenograft 癌性腹膜炎発症モデルでの本症の発症を有意に抑制し、大幅に予後を改善した。以上の検討結果から、EGFR/EGFR ligand axis は胃癌性腹膜炎発症に重要な役割を果たし、CXCR4/CXCL12 axis とも相互促進作用して、本病態の発症進展に深く関与することを初めて明らかにした (Clin Cancer Res 2011 in press)。

今後、高度な間質増生を伴うスキルス胃癌が高頻度に癌性腹膜炎を発症するという重要な臨床知見を踏まえ、癌の微小環境の新たな視点に基づく解析 (癌間質誘導性 Hepatocyte Growth Factor (HGF) を主な標的として上記2つの機序との相互促進作用の詳細な検討) から、真の胃癌標的治療法の確立を目指したい。

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 28 件)

1. Yasumoto K, Yano S, et al. 11 名中 1 番目 EGFR ligands, Amphiregulin and Heparin-binding EGF-like Growth Factor Promote Peritoneal Carcinomatosis in CXCR4-expressing Gastric Cancer. **Clin Cancer Res** 2011. (in press) (査読有)
2. Donev IS, Yano S, et al. 10 名中 10 番目 Transient PI3K Inhibition Induces Apoptosis and Overcomes HGF-Mediated Resistance to EGFR-TKIs in EGFR Mutant Lung Cancer. **Clin Cancer Res** 15: 2260-9, 2011. (査読有)
3. Yano S, et al. 10 名中 1 番目 Antiangiogenic therapies for malignant pleural mesothelioma. **Front Biosci** 16:740-8, 2011. (査読無)
4. Yano S, et al. 8 名中 1 番目 HGF-MET in resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. Hepatocyte growth factor and its receptor signaling and the therapeutic implications. **Curr Signal Transd T** 2011. (in press) (査読無)
5. Yasumoto K, Yano S. The molecular mechanisms of gastric cancer metastasis: Role of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 in peritoneal carcinomatosis. **Transworld Research Network** 37;103-13, 2010. (査読無)
6. Yamada T, Yasumoto K, Yano S, et al. 10 名中 7 番目 Metastatic renal cell carcinoma complicated with diffuse alveolar hemorrhage: a rare adverse effect of sunitinib. **Int J Clin Oncol** 15:638-41, 2010. (査読有)
7. Yamada T, Yano S, et al. 8 名中 8 番目 Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M lung cancer. **Clin Cancer Res** 16:174-83, 2010. (査読有)
8. Yamada T, Yasumoto K, Yano S. 9 名中 8 番目 Combined chemotherapy with carboplatin plus irinotecan showed favorable efficacy in a patient with relapsed small cell carcinoma of the prostate complicated with meningeal carcinomatosis. **Int J Clin Oncol** 14:468-72, 2009. (査読有)
9. Ohtsubo K, Yasumoto K. 10 名中 9 番目 Cancer of unknown primary site in which tumor marker-oriented chemotherapy was effective and pancreatic cancer was finally confirmed at autopsy. **Intern Med** 48:1651-6, 2009. (査読有)
10. Ikuta K, Yano S, 15 名中 2 番目 E7080, a multi-tyrosine kinase inhibitor, suppresses the progression of malignant pleural mesothelioma with different proangiogenic cytokine production profiles. **Clin Cancer Res** 15:7229-37, 2009. (査読有)
11. Wang W, Yano S, et al. 11 名中 3 番目 Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. **Clin Cancer Res** 15:6630-8, 2009. (査読有)
12. 安本 和生, 高橋 豊, et al. 4 名中 1 番目 胃癌 —基礎・臨床研究のアップデート— IV. 進展・浸潤・転移機構—最新研究— 胃癌腹膜播種発症への CXCR4 の関与 **日本臨床** 66:127-30, 2008. (査読無)
13. Ogino H, Yano S, et al. 9 名中 2 番目 Follistatin suppresses the production of experimental multiple-organ metastasis by small cell lung cancer cells in NK cell-depleted SCID mice. **Clin Cancer Res** 14:660-7, 2008. (査読有)
14. Ogino H, Yano S, et al. 10 名中 2 番目 Novel dual targeting strategy with vandetanib induces tumor cell apoptosis and inhibits angiogenesis in malignant pleural mesothelioma cells expressing RET oncogenic rearrangement. **Cancer Letter** 265:55-66, 2008. (査読有)
15. Yamada T, Yano S, et al. 9 名中 2 番目 Lysophosphatidic acid stimulates the proliferation and motility of malignant pleural mesothelioma cells through lysophosphatidic acid receptors, LPA1 and LPA2. **Cancer Sci** 99:1603-10, 2008. (査読有)
16. Yano S, Wang W, et al. 14 名中 1 番目 Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma cells with EGF receptor mutations. **Cancer Res** 66:9479-87, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 63 件)

1. 安本和生 胃癌性腹膜炎形成における EGFR リガンドの役割, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 24 日, 大阪国際会議場, リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府)
2. 矢野聖二 EGFR 肺がんのチロシンキナーゼ阻害薬耐性と治療戦略, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 23 日, 大阪国際会議場, リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府)
3. 安本和生 胃癌性腹膜炎成立への

- EGFR リガンド, amphiregulin と HB-EGF の関与, 2010 年 6 月 17 日, 金沢市文化ホール (石川県)
4. 矢野 聖二 HGF-MET 経路による EGFR-TKI 耐性誘導の分子機構とその克服に向けた戦略, 第 50 回日本肺癌学会総会, 2009 年 11 月 12 日, 京王プラザホテル (東京都)
  5. 安本和生 癌性腹水中増殖因子の検討から見た胃癌性腹膜炎治療標的分子の同定, 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
  6. 矢野聖二 Hepatocyte growth factor as an inducer of EGFR-TKI resistance in lung cancer harboring EGFR activating mutations. 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 1 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
  7. 安本和生 Role of CXCR4/CXCL12 axis and EGFR ligands in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. 第 67 回日本癌学会総会, 2008 年 10 月 30 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安本 和生 (YASUMOTO KAZUO)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号 : 90262592

### (2) 連携研究者

矢野 聖二 (YANO SEIJI)

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号 : 30294672

源 利成 (MINAMOTO TOSHINARI)

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号 : 50239323