

169. 腹膜播種・悪性腹水に対する画期的な治療法の開発研究

杉山 雅彦

*国立病院機構 九州医療センター 臨床研究センター

Key words : 腹膜播種, スフェロイド, Sp1, CXCR4, CXCL12

緒言

癌性腹膜炎は消化器癌や卵巣癌が進行し、難治化した病態の1つである¹⁾。腹膜播種は化学療法など既存の標準治療に高い抵抗性を示し、致死率も高く、その形成メカニズムの解明が望まれている。

原発巣から侵出した癌細胞は腹水中に単独あるいはクラスターとなって存在すると考えられている。早期の腹膜播種において、癌細胞や癌細胞クラスターは腹膜中皮層に接着し、ランダムに播種結節を形成すると考えられている²⁾。メカニズム解明の糸口として、Yasumoto らの報告が挙げられる²⁾。彼らは胃癌細胞株を用い、播種形成には CXCR4/CXCL12 が重要で、CXCR4 のアンタゴニストである AMD3100 が播種と腹水貯留を抑制することを示している。しかし、彼らの報告にはさらなる疑問が生じる。それは、1) CXCL12 のもう1つの特異的レセプターである CXCR7 の関与について、2) CXCR4 陰性癌の播種に CXCR4/CXCL12 は必須ではないのか、3) milky spot 仮説と彼らの研究で観察されている腹膜中皮細胞の豊富な CXCL12 発現との矛盾について、である。

以上のような既存研究の矛盾点を背景に、本研究では癌性腹膜炎の難治性病態を理解するために、腹膜播種のより正確な分子・細胞メカニズムを解明することを目的とした。

方法

Milky spot 同定並びに腹膜播種と SCF⁺/CXCL12⁺ニッチの関連性に関する実験では、CT26GFP 細胞 2×10^6 個を腹腔内に接種し作製したマウス腹膜播種モデルを使用し各種抗体で免疫組織学的染色後、BZ-9000 オールインワン顕微鏡にて観察した。

スフェロイド形成に関する実験では上記腹膜播種モデル、*in vitro* 実験では CT26GFP 細胞を前処理、CFSE を標識させた後、経時的に細胞を回収し FACSCalibur、CellQuest、FlowJo を用いて解析した。RNA 発現レベルの測定には RT-PCR は Step One Plus real time PCR system で TaqMan Fast Universal PCR Master Mix を使用して行った。すべて3回ずつ試行し、データは Step One Software ver. 2.1 (Life Technologies) で解析した。RNA 発現レベルの標準化は β -actin を用いた。

スフェロイド形成と CXCR4・CXCL12 発現に関する実験では CT26GFP を 24-well プレートで培養し、PBS (陰性対照) および AMD3100 (1.25 mg/ml)、抗 CXCR4 抗体を加え 24 時間後に細胞接着アッセイを行った。また、AMD3100、抗 CXCR4 抗体が CT26GFP の細胞クラスター形成に与える影響を観察するために、MPC トリートメントプレートを用いて浮遊培養し、同様に化合物を添加し観察した。

フローサイトメトリー解析として細胞は後述の抗体によって染色した。FITC-、PE-、PE-Cy5-、APC-標識モノクローナル抗体: CXCR4、CXCR7 (Biolegends, CA、サンディエゴ)。陰性対照として同アイソタイプの未感作 IgG を使用した。細胞は FACSCalibur、CellQuest 及び FlowJo を用いて解析した。タンパク発現解析として ELISA は培養培地と細胞ライセートをサンプルとし、IV 型コラーゲン、細胞性フィブロネクチン (cFN) および血漿性フィブロネクチン (pFN) のタンパク量を ELISA キットを用い3回の独立試行で定量した。siRNA によるサイレッシングとして CT26 細胞への siRNA 導入は Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Life Technologies) を用いて行った。Sp1 の siRNA は Mm_Sp1_5223_s/_as (Sigma-Aldrich)、陰性対照 siRNA は sc-37007 (Santa Cruz) を使用した。

*現所属: 九州大学病院 消化器・総合外科

スフェロイド形成抑制と抗癌剤感受性の関連に関する実験では、CT26 腹膜播種モデルの化学療法感受性試験として 75~300 単位/ml のコラゲナーゼ L を腫瘍接種時とその 6 時間後に腹腔内投与した。CT26 細胞の抗癌剤感受性を、*in vitro* で 5-FU およびオキサリプラチン (L-OHP) を用いて、単層培養とスフェロイド形成時(浮遊培養)について検討した。*In vivo* の実験系を図 5b に示し、CT26 細胞はそれぞれの濃度の薬剤と同時投与した。

ヒト腸間膜検体での実験は九州大学医学部倫理審査委員会の承認のもと行った (承認番号 25-3141)。組織培養と CAR (CXCL12- abundant reticular) ニッチ様細胞の同定を行った。

ヒト腸間膜およびスフェロイド生着実験 ヤギ抗ヒト CXCL12 抗体、ウサギ抗ヒト SCF 抗体を使用し、ヒト腸間膜上の CAR 細胞の同定を試みた。

統計学的解析として全ての数値は平均値±標準誤差で記述した。数値は Dunnett 検定、Scheffe's 補正の ANOVA 検定にて統計解析を行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。統計解析は Stat View 統計ソフトを用いた。

結果

1. Milky spot は播種に必須ではない

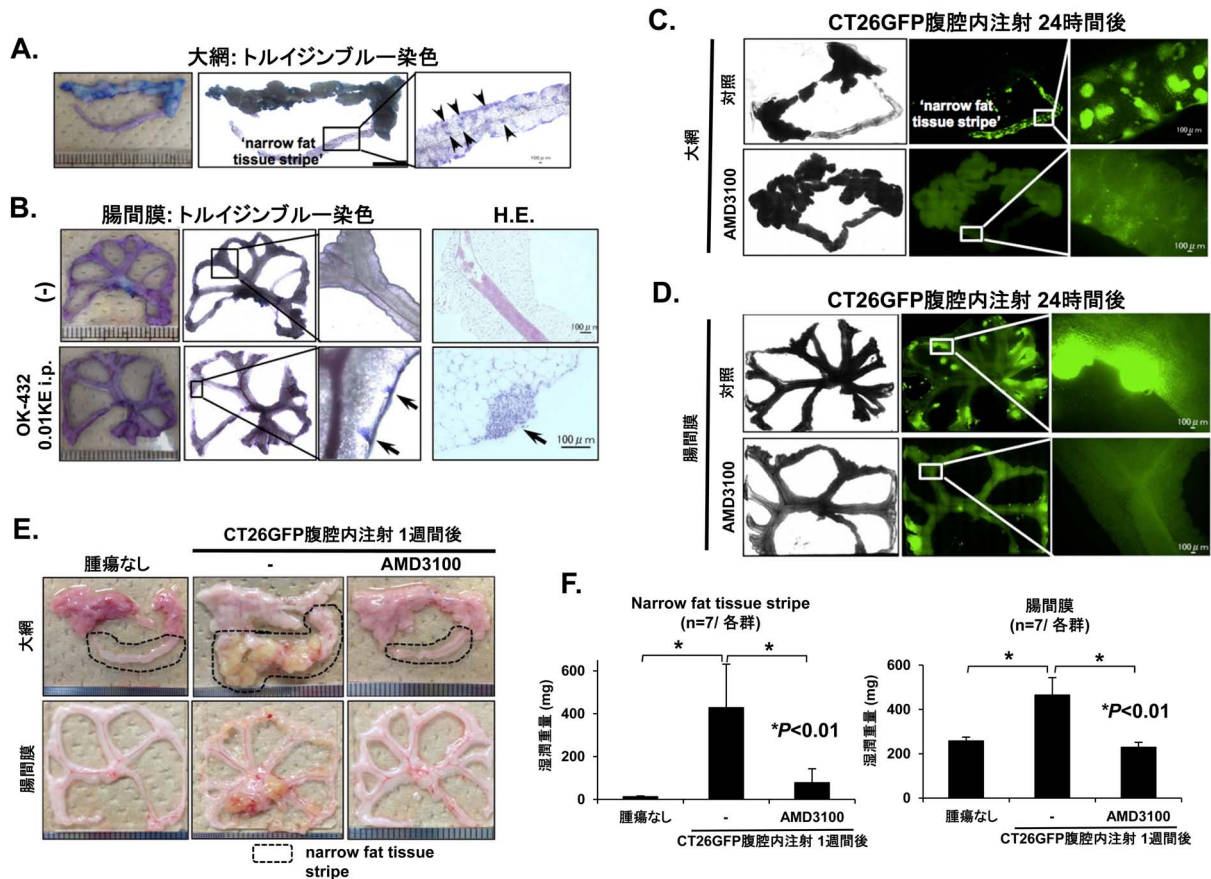


図 1. Milky spot は播種に必須ではない

各実験は 3 回以上実施し、全て同様の結果であった。

Milky spot と呼ばれる構造物と癌の腹膜播種との関係を確認するため、Balb/c および C57/BL6j マウスの大網、腸間膜で milky spot の同定を行った (図 1A)。過去の報告通り³⁾、トルイジンブルー染色によって大網の narrow fat tissue stripe と呼ばれる細い脂肪織に細胞凝集像を認めたが (図 1A、矢印)、腸間膜には認められなかった (図 B、上段)。また、脂肪織リンパ濾胞 (FALCs) と呼ばれる、病原菌より隔離されたマウスの腸間膜に存在し、milky spot とは異なるリンパ組織と考えられている構造物も認められなかった。一方で、連鎖球菌凍結乾燥物である OK-432 を腹腔内注射したマウス腸間膜には FALC 様構造が確認出来たことから (図 1B、下段)、炎症反応によって FALC が形成さ

れると推測された。次に、GFP 標識マウス大腸癌細胞株 CT26 を使用し、マウスの播種結節の評価を大網と腸間膜について行った。CT26GFP を 2.0×10^6 個腹腔内接種し、24 時間後に大網と腸間膜を蛍光顕微鏡で観察した (図 1C、D)。同様に、CXCR4 の特異的阻害剤である AMD3100 を同時投与した個体も観察した。予想通り、GFP 陽性の播種結節は大網の narrow fat tissue stripe に確認され (図 1C、上段)、播種は AMD3100 で強力に抑制された (図 1C、下段) ことから、milky spot は CXCR4/CXCL12 依存的に播種を起こす部位であると考えられた。しかしながら、milky spot が存在しないにも関わらず、AMD3100 に感受性を持つ GFP 陽性播種結節が、腸間膜にも同様に観察された (図 1D)。このことは、CT26GFP 接種後 1 週間後の narrow fat tissue stripes と腸間膜の湿潤および乾燥重量からも確認された (図 1E、F)。この 2 つの結果から、大網の narrow fat tissue stripes と腸間膜は CXCR4 依存的に播種形成が起こる部位と考えられたが、一方で腸間膜での観察結果から、milky spot は播種に必須ではないことが示された。

2. CXCR4 依存的な腸間膜への播種は CXCL12 発現ニッチ様細胞に起因する

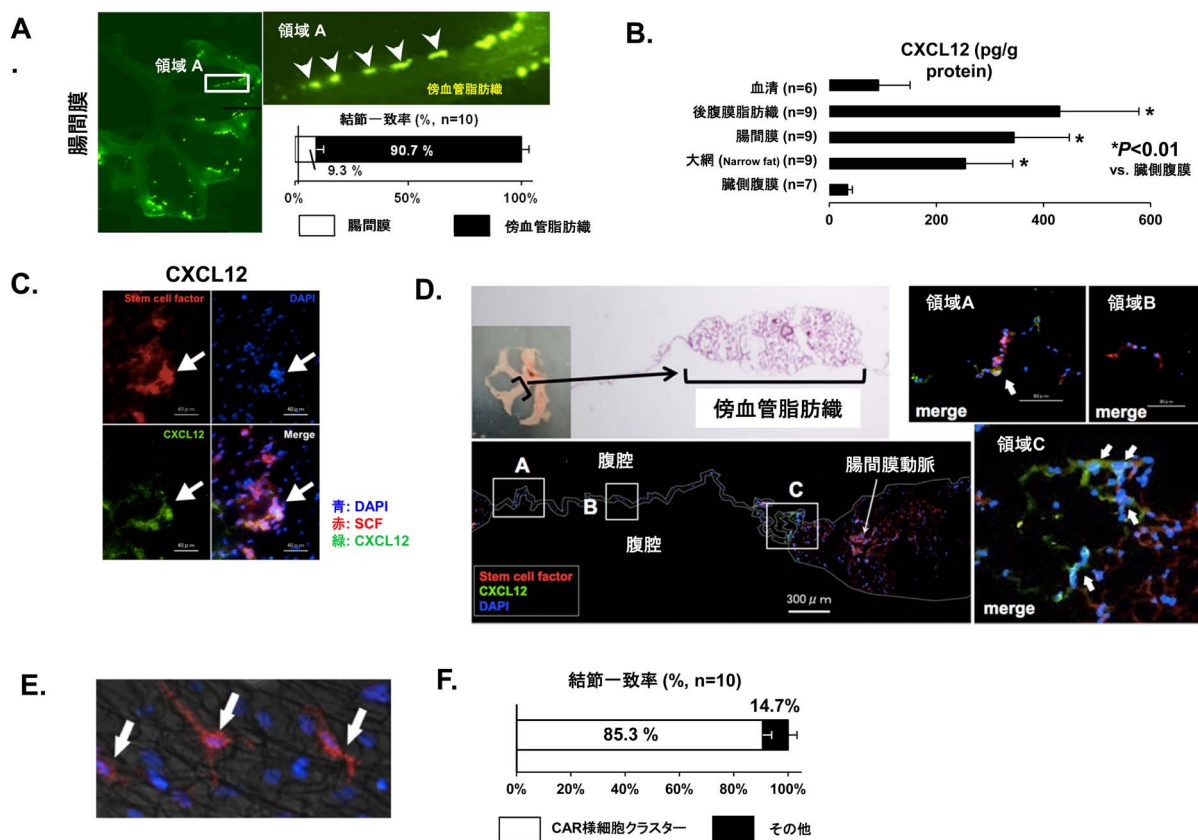


図 2. 腹膜播種は SCF⁺/CXCL12⁺ ニッチ様細胞に特異的に起こる
各実験は 3 回以上実施し、全て同様の結果であった。

過去の研究で、腹膜細胞は豊富に CXCL12 を発現し、播種はランダムに形成されると報告されているが²⁾、図 1 で示したように腸間膜に関しては、早期の播種は傍血管脂肪織辺縁に特異的に形成されることが明らかとなった (図 2A、矢印)。実際、腹腔内への癌細胞散布後 24 時間目の播種結節で、直径 $30 \mu\text{m}$ 以上のものの 90 % 以上は傍血管脂肪織に認められた (図 2A、表)。過去の報告と異なり²⁾、腹壁を含む臓側腹膜の CXCL12 含有量は、後腹膜脂肪織、腸間膜、大網の narrow fat tissue stripes よりはるかに少なく (図 2B)、臓側腹膜は播種に重要なものではないと推測された。

次に、CXCL12 発現細胞の局在を確認するため、腸間膜を en face 像で観察、stem cell factor (SCF) についても同様に観察した。CXCL12/CXCR4 はニッチ関連蛋白としてよく知られており、造血や癌転移への関与が示唆されている⁴⁾。腹膜中皮細胞あるいは傍血管脂肪織細胞と同等と考えられる腸間膜上の細胞は、SCF を豊富に発現しており、そ

の細胞はしばしば CXCL12 を共発現していた (図 2C)。さらに、SCF⁺/CXCL12⁺細胞のほとんどが傍血管脂肪織辺縁に存在し、腸間膜上にはほとんど見られなかったが (図 2D、矢印)、SCF⁺細胞はしばしば観察された。SCF⁺/CXCL12⁺細胞は CAR “CXCL12-abundant reticular” 細胞⁵⁾ と呼ばれるものと考えられ、これらの細胞は CAR 細胞に特徴的な網状の形態をとっていることから、それが示唆された (図 2E、矢印)。CT26GFP 腹膜播種モデルの腸間膜 10 サンプルを用い、免疫組織学的染色を行ったところ、直径 30 μ m 以上の播種結節のおよそ 85 %が SCF 陽性細胞と一致した (図 2F)。これらの結果から、CXCR4 依存的な腸間膜への播種は、ランダムではなく CXCL12⁺ニッチ様細胞に部位特異的に起こることが示された。

3. PCLF 中のスフェロイド形成亢進は IV 型コラーゲンと血漿性フィブロネクチンの共作用によって誘導される

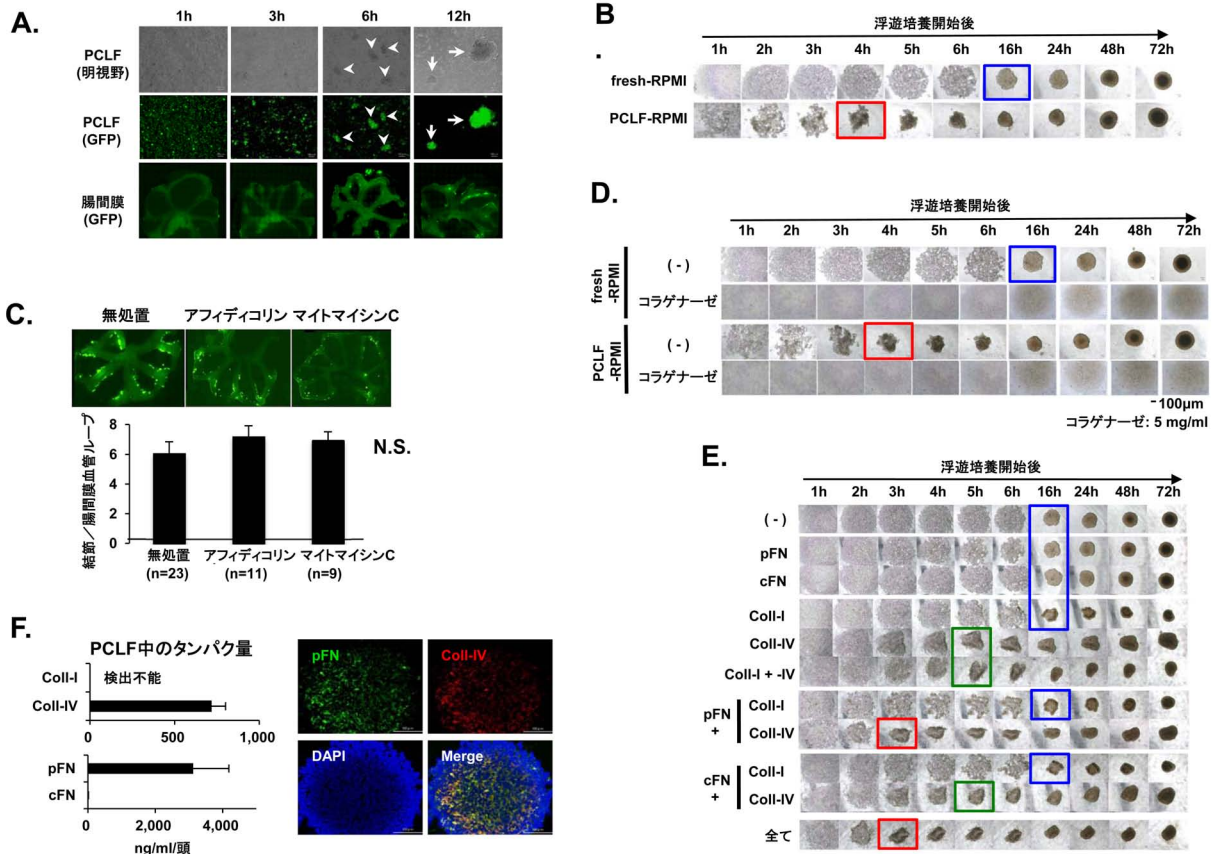


図 3. 腹腔内での癌細胞スフェロイド形成促進は IV 型コラーゲン (Coll-IV) と血漿性フィブロネクチン (pFN) によって引き起こされる

各実験は 3 回以上実施し、全て同様の結果であった。

腸間膜播種形成過程を詳細に検討するために、CT26GFP を腹腔内注射後の腹腔洗浄液 (PCLF) と腸間膜を経時的に採取し観察、図 3A に示した。PCLF においては、単細胞だけでなく細胞クラスターが、癌細胞の散布後わずか 1 ~ 3 時間で観察された。さらに 6 時間後には、可視可能なスフェロイドだけでなく腸間膜上の播種結節を認め、12 時間後にはスフェロイドは劇的に増大 (図 3A、矢印)、単細胞はほぼ認められなくなっていた。In vivo での経時的スフェロイド形成過程は格段に早く、腹腔内には CT26 細胞のスフェロイド形成を促進する可溶性因子が含まれていると考えた。これを確認するため、通常の RPMI 培地 (fresh-RPMI) とマウス腹腔内洗浄 RPMI 培地 (PCLF-RPMI) とで CT26 細胞の浮遊培養を行った。驚くべきことに、スフェロイド形成は fresh-RPMI に比べ (図 3B、青)、PCLF-RPMI で劇的に促進され (図 3B、赤)、腹腔内の可溶性物質がスフェロイド形成を加速させることが示された。次に、癌細胞接種後 24 時間足らずで播種結節を認めることから、細胞分裂がこの過程に関与するかどうかを確認したが細胞周期停止はスフェロイドの直径に一切の影響を与えず (図 3C)、細胞分裂は播種形成過程に重要ではないことが分かった。スフ

エロイド形成を加速させるのに必要なタンパクを同定するため、*in vitro*でスフェロイド形成抑制実験を行った。スフェロイド形成はコラゲナーゼにて完全に抑制出来たが(図3D)、ヒアルロニダーゼや抗インテグリン中和抗体は効果がなく、これらは4種類のヒト大腸癌細胞株でも同様の結果であった。さらにコラゲナーゼ感受性がある各種タンパク成分存在下でスフェロイド形成実験を行うと、IV型コラーゲン(Coll-IV)でスフェロイド形成促進が見られ、Coll-Iや血漿性/細胞性フィブロネクチン(pFN/cFN)は無関係であった(図3E、緑)。一方、Coll-IVとpFNを共に加えた場合に最大の形成促進効果を認めたことから(図3D、赤)、Coll-IVはスフェロイド形成に必須であり、pFNはそれを促進すると考えられた。実際、Coll-IVと血漿性フィブロネクチンはマウスPCLF中に多く存在するだけでなく(図3F)、これらの細胞外マトリックスは腹腔から回収したスフェロイドにも多く含まれていた(図3F)。これらの知見は、患者腹水におけるColl-IVの濃度について報告された結果に類似していた⁶⁾。

4. CXCR4発現におけるスフェロイド形成の役割と Sp1 活性

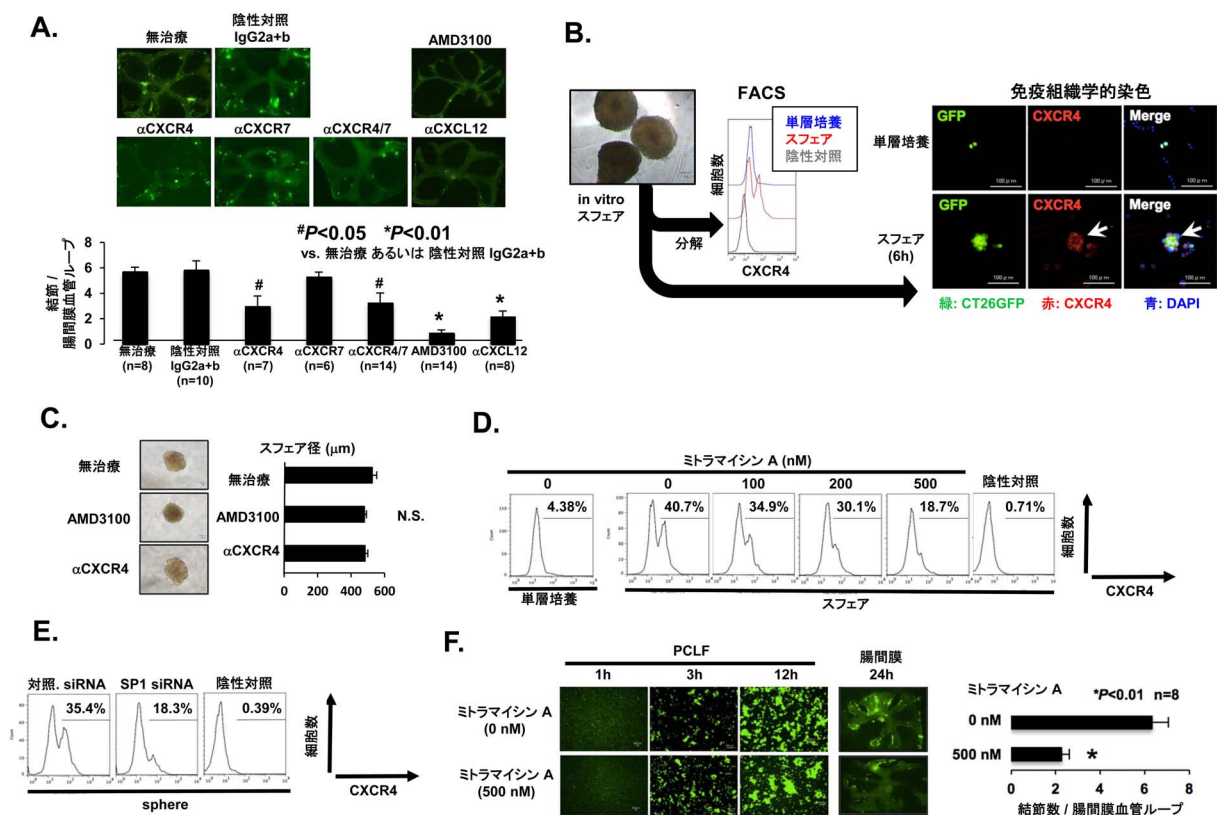


図4. スフェロイド形成による CXCR4 発現は転写因子 Sp1 依存적である
各実験は3回以上実施し、全て同様の結果であった。

次に、腸間膜播種における CXCR4/CXCL12 の役割について検討した。そのために、CXCR4 と、CXCL12 のもう1つの特異的レセプターである CXCR7 を含めて、マウス CT26GFP 腹膜播種モデルを用いて評価した。CT26 の CXCR4 発現は非常に低いにも関わらず、CXCR4 の中和抗体である αCXCR4 単独、あるいは αCXCR7 との併用、AMD3100、CXCL12 中和抗体は有意に腸管膜播種を抑制し、対照 IgG や αCXCR7 単独投与では全く抑制効果がなかった(図4A)ことから、CXCR7 は播種形成に重要ではないことが明らかとなった。そこで、スフェロイド形成が CXCR4 発現を亢進させるのではないかと予想し、FACS と免疫組織学的染色でそれを証明した(図4B)。しかし、AMD3100、αCXCR4 はともにスフェロイド形成そのものには影響がなく(図4C)、スフェロイド形成自身が CXCR4 発現亢進に重要なプロセスであることが示唆された。次に、癌細胞間の接着に関わる諸因子が CXCR4 発現に影響する可能性を考え GC-box を標的とする転写因子 Sp1 に注目した⁷⁾。図4D および E に示す通り、スフェロイド形成によ

る CXCR4 発現亢進は、Sp1 を特異的に抑制するミトラマイシン A によって濃度依存的に抑制され、Sp1 の siRNA によっても同様に抑制された。さらに、CT26GFP 細胞の腸間膜播種はミトラマイシン A による前処置によって有意に抑制されたが、*in vivo*でのスフェロイド形成には一切影響しなかった (図 4F)。このことから、Sp1 活性化に起因する CXCR4 発現亢進が腹膜播種形成に必須であることが明らかとなった。

5. Sp1、CXCR4 およびスフェロイド形成抑制が抗癌剤感受性に与える影響

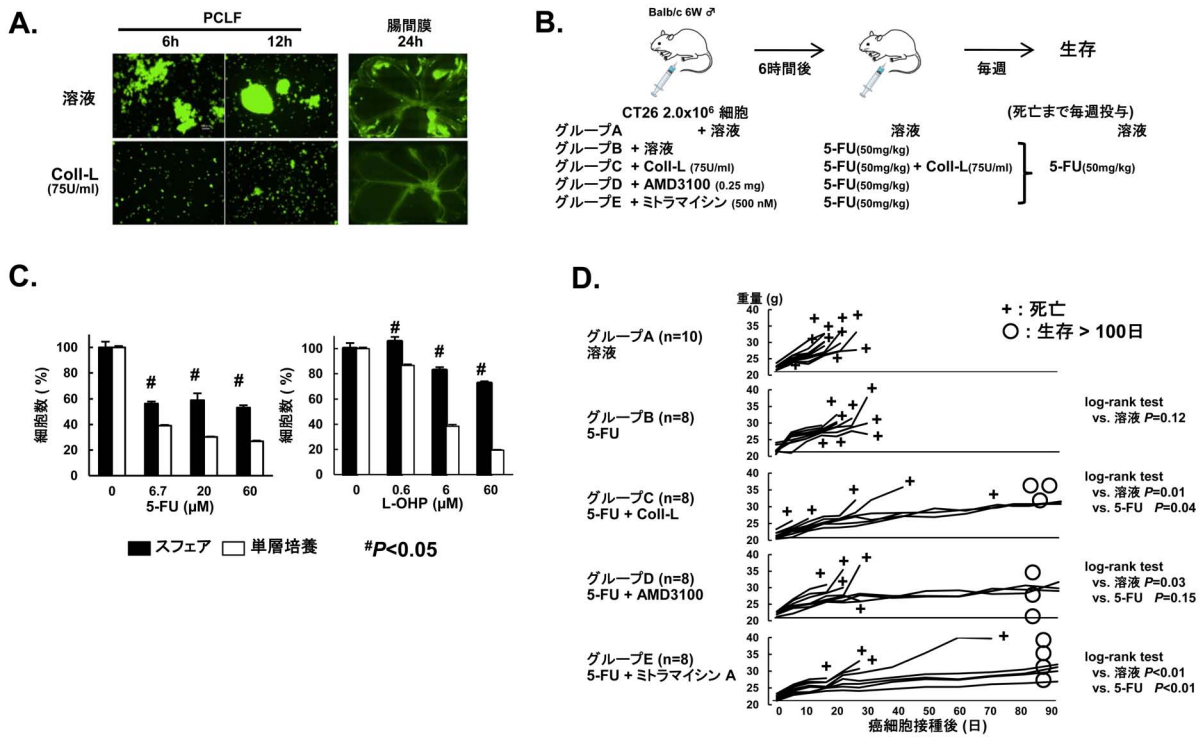


図 5. CXCR4 系の抑制はマウス腹膜播種モデルにおける化学療法感受性を亢進させる
各実験は 3 回以上実施し、全て同様の結果であった。

以上の知見から、*in vivo*の腹膜播種モデルにおいて CXCR4/CXCL12 の抑制とスフェロイド形成抑制が抗癌剤感受性に影響するか否かを明らかとすることとした。ここでは、コラゲナーゼ L (Coll-L) の投与濃度を、*in vivo*で CT26GFP のスフェロイド形成抑制が可能な 75 U/ml と設定した (図 5A)。大腸癌で広く用いられる抗癌剤である 5-FU と L-OHP の 2 つの抗癌剤について感受性試験を *in vitro*で行った (図 5B)。スフェロイド形成によって、どちらの抗癌剤に対しても、単層培養に比べて有意に感受性が低下することが明らかとなった (図 5C、 $P < 0.05$)。L-OHP に比べ、5-FU がより低濃度で効果を発揮するため、5-FU を次の動物実験に用いることとした (図 5D)。対照群として溶液を注射したもの (A 群) は 32 日以内に全例が腫瘍死し、5-FU 単独治療群 (B 群) は生存期間の有意な延長を認めなかった ($P=0.12$)。対照的に、Coll-L によってスフェロイド形成を早期に抑制した群 (C 群) だけでなく、AMD3100 投与群 (D 群)、ミトラマイシン A 前処置群 (E 群) では、8 頭中それぞれ 3 頭 (C、D 群)、4 頭 (E 群) が 100 日以上長期生存を認める結果となった。これらの結果は、腹腔内でのスフェロイド形成および特異的な播種を抑制することにより、播種癌細胞の抗癌剤感受性の向上に繋がるのではないかと考えられた。

6. ヒト細胞・組織における CAR 様細胞の同定、スフェロイド形成亢進および播種指向性

最後に、以上のマウスで得られた知見がヒト細胞・組織においても妥当性があるか否か、について検討した。手術で切除したヒト腸間膜の一部においてマウスと同様、SCF/CXCL12 共陽性となる細胞を傍血管脂肪織に認めた。さらに、手術によって切除された腸間膜組織を 6 well プレートに広げ、GFP 標識 LoVo と CFSE 標識 HCT116 のスフェロ

イドを培地に加えて共培養し、2日後にこの組織をスライドガラスに載せ、en bloc で SCF の免疫組織学的染色を行った。en face 像の観察によって、GFP 標識 LoVo だけでなく、CFSE 標識 HCT116 において、スフェロイド（緑）は SCF 陽性細胞の存在する領域（赤）に一致して存在していた。さらに播種転移頻度の高い卵巣癌でも同様の現象が生じることを確認した。以上の結果から、腹腔内で癌細胞のスフェロイド形成能が亢進し、CAR 様細胞へ特異的に播種することは、少なくとも消化器癌と卵巣癌においては普遍的なメカニズムであると考えられた。

考 察

本研究は Coll-IV と pFN 依存的なスフェロイド形成が癌細胞接種後わずか数時間で起こり、この過程は CXCR4/CXCL12 依存的な播種に必須であり、癌細胞本来の CXCR4 発現に関係しないことを示した初めての報告である。本研究で重要な発見の1つは、早期の一時的なスフェロイド形成、ならびに CXCR4 の抑制が、腹腔内の癌細胞の抗癌剤感受性を著しく向上させることである。これらの結果は、スフェロイド形成過程だけでなく CXCR4 依存性腹膜播種を抑制することで、抗癌剤感受性を高められることを示唆する。

本研究では、癌細胞は CXCR4 依存的に腸間膜上の CAR 様細胞ニッチと結合するだけでなく、播種結節となる以前に腹腔内で速やかにスフェロイドを形成し、その過程が腹膜播種に重要であることを示した。我々は引き続きこの原理をもととした技術を発展させ、腹膜播種患者の新規治療に応用させる研究を行う。

共同研究者

本研究の共同研究者は九州大学大学院医学研究院消化器・総合外科の笠木勇太、諸富洋介、沖英次、佐伯浩司、大垣吉平、前原喜彦、九州大学大学院薬学研究院革新的バイオ医薬創生学の前田結、吉田久美、齊藤智、中外製薬の岩井俊樹、九州大学大学院病理学の鬼丸満穂である。

文 献

- 1) Chung M, Kozuch P. Treatment of malignant ascites. *Curr Treat Options Oncol*. 2008 Jun;9(2-3):215-33. doi: 10.1007/s11864-008-0068-y. Epub 2008 Sep 6. PMID: 18777213.
- 2) Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, Minami T, Nakayama T, Sakurai H, Takahashi Y, Yoshie O, Saiki I. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res*. 2006 Feb 15;66(4):2181-7. PMID: 16489019. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3393.
- 3) Mebius RE. Lymphoid organs for peritoneal cavity immune response: milky spots. *Immunity*. 2009 May; 30(5):670-2. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.005. PMID: 19464991.
- 4) Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006 Dec;25(6):977-88. PMID: 17174120. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.
- 5) Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2006 Feb;6(2):107-16. PMID: 16491135. DOI: 10.1038/nri1780.
- 6) Korenaga D, Funahashi S, Yano K, Maekawa S, Ikeda T, Sugimachi K. Relationship between peritoneal collagen type IV concentrations and the presence of disseminated metastases in gastric cancer. *Arch Surg*. 1995 Jul;130(7):769-73. PMID: 7611868.
- 7) Wierstra I. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jul 18;372(1):1-13. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.074. Epub 2008 Mar 24. PMID: 18364237.