

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591572

研究課題名 (和文) 食道癌におけるラミニン-332 の発現意義と分子標的治療法の開発

研究課題名 (英文) Clinical significance of Laminin-332 and its potential as a therapeutic target

研究代表者

宮成 信友 (MIYANARI NOBUTOMO)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療講師

研究者番号：90336230

研究成果の概要 (和文) : laminin-332 blocking 抗体を食道癌細胞株に添付すると、Akt 活性が抑制され、細胞株の浸潤能が低下した。逆に、精製 laminin-332 を添付すると、Akt 活性が上昇し、浸潤能が増加した。このことにより、laminin-332 が Akt 経路を介して食道癌の悪性度に寄与することが示された。Akt 経路の中で、mTOR は極めて重要な molecule であり、分子標的治療の target として注目されている。よって、我々は mTOR に着目して、研究を進めることとした。mTOR 活性食道癌は、非活性食道癌に比べて有意に予後が不良であり、食道癌においても mTOR が治療の標的になりえることが示唆された。現在、我々は RAD001 (mTOR 阻害剤) を用いた assay を進めており、近々発表予定である。

研究成果の概要 (英文) : Inactivation of the AKT pathway by laminin-332 blocking antibody suppressed the invasiveness of esophageal cancer cell line. The addition of the purified laminin-332 activated the AKT pathway and increased the invasiveness of cell line. These results indicate that Laminin-332 could contribute to the malignant behavior of esophageal cancer through AKT pathway. mTOR is a key molecule in the AKT pathway and is increasingly important as a potential target for anticancer therapy. Thus, we focused on revealing clinical usefulness of mTOR inhibitor in esophageal cancer. p-mTOR overexpression was independently associated with poor prognosis in ESCC, supporting the potential for mTOR as a therapeutic target for ESCC. We are currently performing further in vitro and in vivo study to clarify the antitumor effect of RAD001 (mTOR inhibitor) on ESCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道外科学、mTOR、RAD001、ラミニン-332

### 1. 研究開始当初の背景

ラミニン-332 は、腫瘍細胞増殖、癌浸潤、癌転移において重要な役割を果たすと考えられ、近年注目を集めている基底膜関連蛋白で、様々な癌種において高発現し、高発現症例は予後不良であることが報告されている。我々は、これまでの研究で食道扁平上皮癌においても高発現例は予後不良であることを明らかにした。しかし、ラミニン-332 が食道扁平上皮癌の悪性度に関与する機序に関しては、細胞内シグナルを含め明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラミニン-332 が食道扁平上皮癌の悪性度に関与する機序を解明し、新たな分子標的治療法のターゲットを検索することである。

### 3. 研究の方法

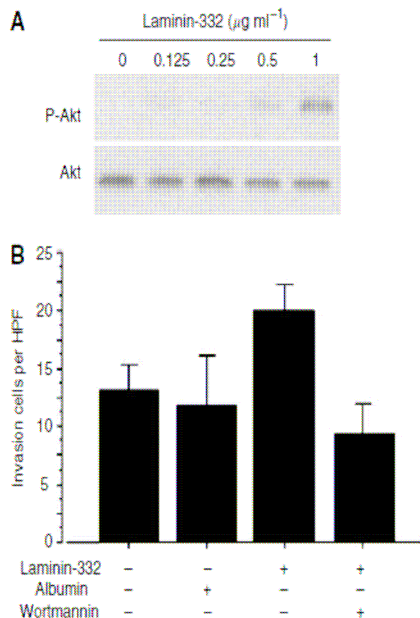
食道癌細胞株に、In vitro で精製ラミニン-332 およびラミニン-332 blocking antibody を添加することにより細胞の浸潤能、増殖能などが変化するかを評価した。また、その際の細胞内シグナルを主に western blotting により評価し、具体的に PI3K pathway のどの分子が関与しているのかを検討した。そのシグナル分子の中から mTOR に着目し、食道癌組織において実際に活性化しているのかを免疫染色により評価し、臨床病理学的因子との関係を検討した。

### 4. 研究成果

① In vitro assay によって、laminin-332 が AKT pathway を活性化することにより、癌の浸潤に関与することを明らかにした。

a) 食道癌細胞株に laminin-332 抗体を添加すると、Akt のリン酸化が抑制され、浸潤能が低下した。

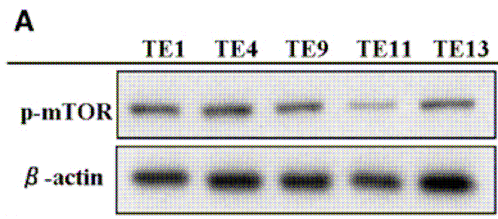
b) 逆に精製 laminin-332 を添加すると、Akt の活性化が上昇し、浸潤能が増加した。



このことより、laminin-332 は Akt 経路を介して食道癌の悪性度に寄与することが示唆された。以上の内容を、**Br J Cancer. 2008, 11;98:974-80 (Baba Y et al.)** に報告した。

② mTOR は Akt 経路の key molecule であり、mTOR 阻害剤は癌治療薬として現在注目を集めている。そこで、我々は Akt 経路の中で特に mTOR に関して重点的に研究を進めることとした。mTOR 阻害剤の中でも RAD001 は経口薬であり特に注目を集めている。

a) まず、食道癌において mTOR が活性化されていることを細胞株を用いて評価した。

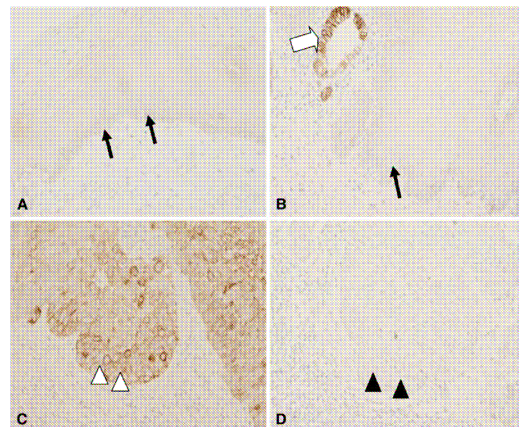


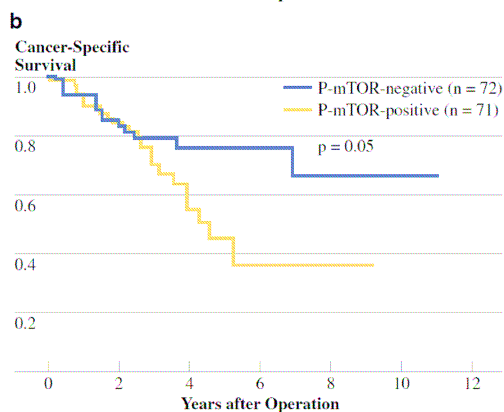
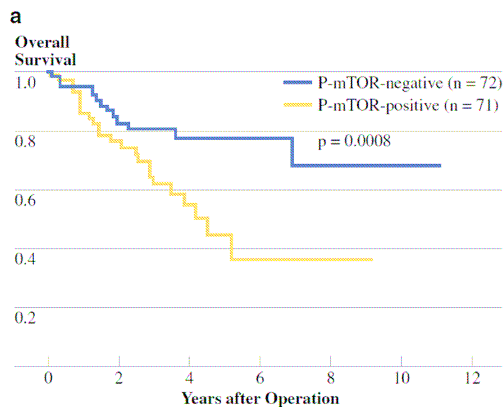
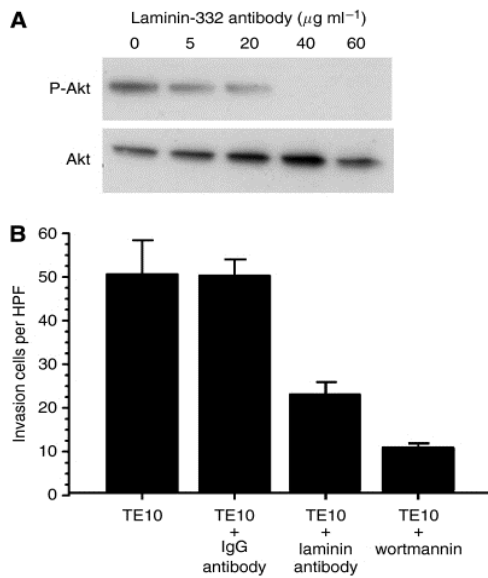
程度に差はあるが、全ての細胞株で mTOR は活性化していた。

b) 次に免疫染色を用いて、p-mTOR 発現 (mTOR 活性化) の臨床的意義を検討した。

A; 正常食道上皮、B; 胃腺管上皮では陽性、C; 陽性例、D; 陰性例

そして、p-mTOR 陽性食道癌症例は、陰性例に比して有意に予後が不良であった。





このことから、mTOR が食道癌の悪性度に関与し、分子標的治療の target として有用である可能性が示唆された。以上の内容を、Ann Surg Oncol. 2010 17 ; :2486-93 (Hirashima K et al.) に発表した。

## 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 9 件)

1. Nagai Y, Watanabe M, Ishikawa S, Karashima R, Kurashige J, Iwagami S, Iwatsuki M, Baba Y, Imamura Y, Hayashi N, Baba H. Clinical Significance of Wnt-induced Secreted Protein-1 (WISP-1/CCN4) in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res. 31(3):991-7, 2011. 査読有
2. Watanabe M, Nagai Y, Kinoshita K, Saito S, Kurashige J, Karashima R, Hirashima K, Sato N, Imamura Y, Hiyoshi Y, Baba Y, Iwagami S, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Hayashi N, Baba H. Induction chemotherapy with docetaxel/cisplatin/5-fluorouracil for patients with node-positive esophageal cancer. Digestion. 83(3):146-52, 2011 査読有
3. Imamura Y, Hayashi N, Sato N, Kinoshita K, Kurashige J, Saito S, Hirashima K, Karashima R, Hiyoshi Y, Nagai Y, Watanabe M, Baba H. Extensive lymphatic spread of cancer cells in patients with thoracic esophageal squamous cell carcinoma: detection of CEA-mRNA in the three-field lymph nodes. J Surg Oncol. 102(5):509-15, 2010. 査読有
4. Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Hiyoshi Y, Nagai Y, Hayashi N, Iyama K, Baba H. Phosphorylated mTOR expression is associated with poor prognosis for patients with esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol. 17(9):2486-93, 2010 査読有
5. Hiyoshi Y, Watanabe M, Hirashima K, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Baba H. p12CDK2-AP1 is associated with tumor progression and a poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 22(1):35-9, 2009 査読有
6. Watanabe M, Yoshida N, Karashima R, Sato N, Hirashima K, Imamura Y, Hiyoshi Y, Nagai Y, Iwagami S, Toyama E, Hayashi N, Baba H. Transcervical superior mediastinal lymph node dissection combined with transhiatal lower esophageal dissection before transthoracic esophagectomy: a safe approach for salvage esophagectomy. J Am Coll Surg. 208(4):e7-9, 2009. 査読有

7. Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Watanabe M, Baba H. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 15(6):1915-22, 2009 査読有
8. Hiyoshi Y, Watanabe M, Imamura Y, Nagai Y, Baba Y, Yoshida N, Toyama E, Hayashi N, Baba H. The relationship between the glucose transporter type 1 expression and F-fluorodeoxyglucose uptake in esophageal squamous cell carcinoma. Oncology. 76(4): 286-92, 2009. 査読有
9. Ikeda O, Toh Y, Aoki Y, Harimoto N, Taomoto J, Masuda T, Ohga T, Adachi E, Sakaguchi Y, Okamura T, Hirahashi M, Nishiyama K, Baba H. Multiple and metachronous esophageal intramural metastases from a gastric adenocarcinoma. Gastric Cancer. 11(2): 119-22, 2008 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, Sato N, Karashima R, Kurashige J, Imamura Y, Iwatsuki M, Hayashi N, Iyama K, Baba H. Phosphorylated mTOR activation and therapeutic effects of everolimus (RAD001) in esophageal squamous cell carcinoma. 7<sup>th</sup> International symposium on cancer research and therapy (ISCRT) 2010年11月26日~27日、東京 東京会館
2. 平島浩太郎、渡邊雅之、齊藤誠哉、藏重淳二、木下浩一、佐藤伸隆、辛島龍一、今村 裕、林 尚子、馬場秀夫. 食道扁平上皮癌における mTOR 阻害薬 (RAD001) の可能性の検討. 第 65 回日本消化器外科学会総会 2010年7月14日、下関 下関グランドホテル
3. Ida S, Ohmuraya M, Hirota M, Nakahara O, Furuhashi S, Abe S, Tanaka H, Horino K, Takamori H, Beppu T, Baba H. Cerulein induced acute pancreatitis suppress the mTOR activity. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010. 2010年7月11日~13日、福岡 福岡国際会議場
4. Hirashima K, Baba Y, Saito S, Kinoshita K, Satou N, Kurashige J, Karashima R, Imamura Y, Ikeda O, Hayashi N, Watanabe M, Iyama K, Baba

H. Prognostic value of mTOR activation and therapeutic effects of everolimus in esophageal squamous cell carcinoma. AACR 101<sup>st</sup> Annual Meeting 2010年4月17日~19日、アメリカワシントン Walter E. Washington Convention Center

5. 平島浩太郎、渡邊雅之、辛島龍一、佐藤伸隆、日吉幸晴、今村 裕、長井洋平、外山栄一郎、林 尚子、馬場秀夫. 食道扁平上皮癌における mTOR 発現の意義. 第 64 回日本消化器外科学会総会 2009年7月16日、大阪 リーガロイヤルホテル
6. Baba Y, Hayashi N, Miyanari N, Iyama K, Baba H. Tumor Biology Laminin -332 promotes the invasion of esophageal squamous cell carcinoma via the PI3K activation. AACR Annual Meeting 2008 2008年4月12~16日、アメリカ サンディエゴ San Diego Convention Center

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮成 信友 (MIYANARI NOBUTOMO )

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療講師  
研究者番号：90336230

##### (2) 研究分担者

林 尚子 (HAYASHI NAOKO )

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：20452899

馬場 秀夫 (BABA HIDEO )

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：20240905

吉田 直矢 (YOSHIDA NAOYA )

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：60467983