

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19525

研究課題名（和文）臓器嗜好性に焦点をあてた食道癌転移の分子機序解明からの創薬研究

研究課題名（英文）Drug discovery based on elucidation of molecular mechanisms of esophageal cancer metastasis

研究代表者

小寺 泰弘（KODERA, Yasuhiro）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10345879

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では食道癌血行性転移の責任分子を同定し、食道癌転移の分子生物学的機序の解明、新規分子標的治療薬開発、コンパニオン診断法開発の基盤となるデータを得ることを目的とした。候補分子の中から、機能解析データにもとづいてNECAB2に焦点を当てた。NECAB2のノックダウンにより食道癌細胞株の細胞周期調節とアポトーシス誘導を介して細胞増殖能が抑制された。さらに、NECAB2のshRNAを用いた安定的ノックダウンにより細胞浸潤能、血管内皮への接着力、遊走能、マウス皮下腫瘍モデルでの造腫瘍能が低下した。組織中NECAB2高発現症例は有意に生存期間が短縮し、累積血行性転移率が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

診療現場のアンメットニーズを投影した本研究の成果により、現在の標準治療ではいまだ制御困難な食道癌血行性転移に対する新しいバイオマーカーならびに治療標的分子が提案された。これに基づいた治療薬創製と診断キットの開発へとつなげることで、「発現を評価し、高発現症例に対して適した阻害薬による治療を行う」形でのPrecision medicineが実現できる。NECAB2阻害薬は、主に増殖因子やそのレセプターを標的とした既存の消化器癌分子標的治療薬とは異なる、全く新しいジャンルの治療薬となる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify the molecules responsible for hematogenous metastasis of esophageal cancer and to obtain data that will provide a basis for elucidating the molecular biological mechanisms of esophageal cancer metastasis, developing novel molecular targeted therapeutics, and developing companion diagnostics. Among the candidate molecules, we focused on NECAB2 based on functional analysis data. Knockdown of NECAB2 suppressed cell proliferative capacity via cell cycle regulation and induction of apoptosis in esophageal cancer cell lines. Furthermore, stable knockdown of NECAB2 using shRNA reduced cell invasiveness, adhesion to vascular endothelium, migration, and tumorigenesis in mouse subcutaneous xenograft models. Patients with high tissue NECAB2 expression had significantly shorter survival times and higher cumulative hematogenous metastasis rates.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 血行性転移 リンパ節転移 Transcriptome解析 コンパニオン診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道癌の予後を左右する再発転移形式として、血行性転移とリンパ節転移という全く性質が異なるが、いずれも重要な2つの転移経路が存在する。申請者らはこの2種の転移が発生時期も予後も異なる病態であることを臨床的観察から明らかにしてきた(Kanda M, Kodera Y, *et al.* Ann Surg Oncol. 2020)。しかしこれまで多くの基礎研究や治療開発においては、遠隔転移を有する食道癌は「切除不能・転移性食道癌」として一括して扱われており、転移経路に特異的な診断マーカーや分子標的治療薬は存在しない。原発巣から生じた遊離癌細胞が生着・増殖して転移巣を形成するには多段階の過程と免疫排除機構からの逃避が必要であり、接着分子、蛋白分解酵素、増殖因子、血管新生因子、ケモカインなど多くの分子が関与しているとされるが、その中には転移経路に特異的な分子が存在するとの考え方がある(De Mattos-Arruda L, *et al.* Mol Oncol 2013)。我々は「切除不能・転移性食道癌」をひとくくりで治療開発してきた従来の研究方針には限界があると考え、転移経路ごとに特異的な関連分子を同定してこれを阻害する戦略に転じた。その柱として行った転移経路特異的な Transcriptome 解析により血行性転移を伴う腫瘍組織、リンパ行性転移を伴う腫瘍組織のそれぞれに特異的に高発現している分子群が特定された。

2. 研究の目的

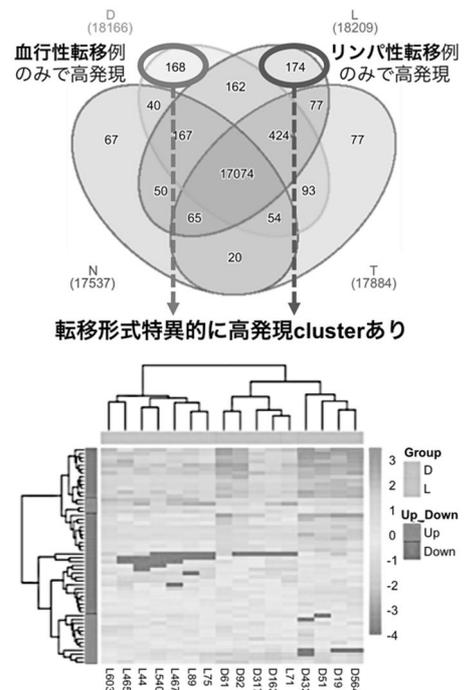
食道癌は多様な進展経路を持つ予後不良な疾患であり、転移を制御できない限り治療成績の大幅な改善を得ることは不可能である。長きにわたり新規治療法開発が望まれているが、わが国で食道癌に対して保険承認された分子標的治療薬は現在のところ免疫チェックポイント阻害剤2剤にとどまっており、個別化治療時代の到来とは言い難い状況にある。食道癌の予後を左右する主な転移再発形式として血行性転移とリンパ節転移が存在する。我々はこの2つの転移の経路やメカニズムは全く性質が異なるものであることを臨床研究の視点から明らかにしてきた。したがって、多くの分子が関与し多段階の過程を経て成立するとされる転移においても、転移経路ごとに特異的な分子、あるいは分子クラスターが存在するものと考えた。各転移形式に特有の責任分子について解析を深めていくことにより食道癌の転移を制御する分子生物学的病態解明を進めるとともに、既存の概念では発見しえない分子を標的とした治療薬開発につなげることができると考え、着想した。本研究の目的はこれらの食道癌転移形式別関連分子の機能解析、発現解析を行うことで食道癌転移の分子生物学的機序の解明を通じ、食道癌予後を劇的に改善する分子標的治療薬と、その奏効度を事前に予測しうるコンパニオン診断法開発の基盤となるデータを得ることである。

3. 研究の方法

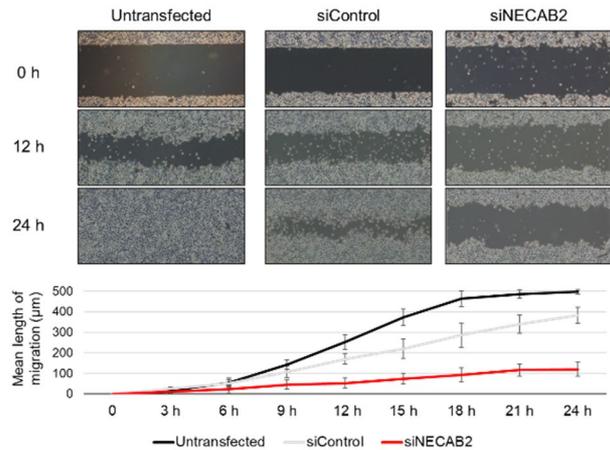
- (1) **標的分子の同定**：食道非癌部組織、非転移性食道癌原発巣組織、血行性転移を有する食道癌原発巣組織、リンパ節転移を有する食道癌原発巣組織を用いて網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行い、転移性食道癌原発巣組織で特異的に高発現する分子群を抽出した。さらに、候補分子を発現解析、機能解析の結果に基づいて厳選した。
- (2) **発現調節による癌細胞機能の評価**：標的分子が高発現している食道扁平上皮癌細胞株に対して siRNA を用いた標的分子のノックダウンを行った。細胞増殖能、アポトーシス細胞比率、Caspase 活性を解析した。ついで、癌転移に重要な細胞機能として浸潤能、遊走能について比較解析した。shRNA による標的分子の安定的ノックダウン癌細胞株を樹立し、これを用いて再現性を確認した。さらに、安定的ノックダウン株では、マウス皮下腫瘍モデルでの造腫瘍能、細胞周期、血管内皮細胞への接着能についても解析した。レスキュー実験として低発現細胞株への標的分子強制発現によって細胞機能 (増殖能) の変化を調べた。
- (3) **シグナル解析**：標的分子のノックダウンによる癌関連細胞内シグナル系のリン酸化、発現について調査し、標的分子が干渉する癌転移に重要なシグナルを同定した。
- (4) **転移臓器嗜好性のメカニズム解明**：血行性転移形成には、血管内皮細胞への接着が重要なステップとなる。標的分子のノックダウンによる、ヒト血管内皮細胞への接着能の変化を調べた。
- (5) **in vivo 腫瘍形成能の比較**：親株と安定的ノックダウン癌細胞株を用いて、マウス異種移植モデルを作成し、造腫瘍能を比較した。
- (6) **発現解析**：標的分子の組織中発現度を 200 例の食道癌切除検体を対象に調べ、網羅的遺伝子発現解析結果の再現性を確認するとともに、コンパニオン診断法に資するかどうかを評価した。

4. 研究成果

(1) 標的分子の同定：食道癌転移経路特異的 Transcriptome 解析により、申請者らの仮説に一致して血行性転移群とリンパ行性転移で発現パターンが明瞭に異なるクラスターがあることが示され（右図）血行性転移を伴う腫瘍組織、リンパ行性転移を伴う腫瘍組織のそれぞれに特異的に高発現している分子群が特定された。このうちより悪性度の高い血行性転移関連分子を重視しつつ、The Cancer Genome Atlas (TCGA)などの外部公開データで validation されること 配列情報（mRNA、アミノ酸）が検索可能 将来の知財確保を見据え、癌における既報がないこと 生理的機能喪失が致死性と想定されないこと 阻害薬の安全性を担保すべく、肝/肺/腎/脳/心での高発現が認められないこと 120 例の pilot cohort で網羅的遺伝子発現解析結果の再現性が得られたこと、の全てを満たす標的候補として、血行性転移関連 5 分子（VWA5B2、CFAP47、NECAB2、SYCE3、RPL3L）を選定した。これら候補分子について、並行して発現解析と人為的発現調節による食道癌細胞株の悪性形質がどのように変化するかについて実験を行った。初年度に NECAB2 が癌転移に重要な細胞機能である浸潤能、遊走能、接着能に関連するデータを得た。また、その発現レベルが血行性再発頻度に相関することが示された。同時に NECAB2 に匹敵しうる有望な食道癌転移関連分子を検索したところ、siRNA による発現抑制が高度の細胞増殖抑制を引き起こす分子は同定されなかった。そのため、NECAB2 についてさらに深く検討する方針とした。



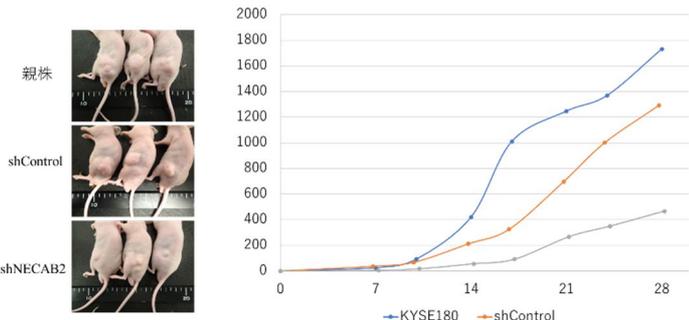
(2) 発現調節による癌細胞機能の評価：siRNA を用いたノックダウンにより、癌転移に重要な細胞機能である浸潤能、遊走能（右図）接着能が抑制された。shRNA による安定的ノックダウン株を樹立し、同様に細胞機能を調査したところ、再現性のある結果が得られた。発現ベクターにより NECAB2 を強制発現すると、食道癌細胞株の増殖能が増強した。NECAB2 の人工的発現抑制により、caspase3/7 活性の亢進、細胞周期 G0/G1 期の増加を認めた。これらは細胞増殖能阻害活性の機序を説明しうるものとなる。NECAB2 を発現ベクターで強制発現することにより、癌細胞増殖能が亢進した。



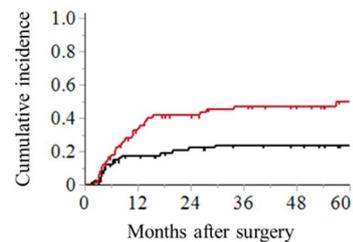
(3) シグナル解析：Western blotting 法による細胞内シグナルの解析では、NECAB2 を抑制することにより細胞周期調節因子の cyclin D1, CDK2 のリン酸化が低下することを発見した。

(4) 転移臓器嗜好性のメカニズム解明：NECAB2 抑制により食道癌細胞の血管内皮への接着能が低下することを見出した。これは、NECAB2 が血行性転移に特異的に作用することの機序解明として重要なデータとなる。

(5) in vivo 腫瘍形成能の比較：shRNA を用いた NECAB2 安定的ノックダウンにより、マウス皮下腫瘍モデルでの造腫瘍能が低下した（右図）。



(6) **発現解析:**多施設共同研究体制による独立した2つの食道扁平上皮癌コホートにおいて NECAB2 の mRNA およびタンパク発現レベルを調査したところ、いずれにおいても NECAB2 高発現症例群で有意に予後不良であり累積血行性再発発生率(右図)も高かった。



【得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望】

これまで多くの基礎研究や治療開発においては、遠隔転移を有する食道癌は「切除不能・転移性食道癌」として一括して扱われており、転移経路に特異的な診断マーカーや分子標的治療薬は存在しない。食道癌は生物学的に多様性が大きく、集団一括解析から見出された分子標的の制御では有効な治療になりにくいのが実情であるが、研究の成果は食道癌血行性転移特異的な分子機序解明に貢献し、将来の治療開発の基盤となりうる。NECAB2 は主に増殖因子やそのレセプターを標的とした既存の消化器癌分子標的治療薬とは異なるターゲットであり、その阻害薬は全く新しいジャンルの治療薬となる可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 笹原正寛, 神田光郎, 佐藤雄亮, 清水 大, 猪川祥邦, 高見秀樹, 服部憲史, 林 真路, 田中千恵, 中山吾郎, 藤原道隆, 小寺泰弘 |
| 2. 発表標題 食道癌におけるNECAB2遺伝子の機能および組織中発現の検討 |
| 3. 学会等名 第61回日本癌治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神田光郎, 清水 大, 田中千恵, 高見秀樹, 猪川祥邦, 服部憲史, 林 真路, 中山吾郎, 藤原道隆, 小寺泰弘 |
| 2. 発表標題 転移臓器嗜好性に焦点をあてた食道癌バイオマーカー開発 |
| 3. 学会等名 第76回日本食道学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 神田 光郎 (KANDA Mitsuro) (00644668) | 名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901) | |
| 研究分担者 | 田中 千恵 (TANAKA Chie) (50589786) | 名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 清水 大 (SHIMIZU Dai) (50723037) | 名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |