

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590939

研究課題名(和文) 消化器癌におけるインスリン様増殖因子活性化機構の解明と中和抗体による治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of activation mechanism of insulin-like growth factor and development of therapy using neutralizing antibody in the gastrointestinal cancers

研究代表者

宮本 心一 (Miyamoto, Shin'ichi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90378761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：がんの転移が成立するにはがんが周囲の微小環境にうまく適応する必要がある。大腸がんは肝臓に高率に転移し、肝転移の制御は大腸がんの治療において最も大きな課題である。われわれはがん細胞自身が分泌する酵素により活性化された肝由来のインスリン様増殖因子(IGF)が肝転移形成に重要な役割を果たし、中和抗体による治療標的となりうることを明らかにした。さらに活性化されたIGFを血中で評価する系を確立し、マウスモデルにおいて転移の形成とともに活性化IGFが上昇することを証明し、中和抗体治療におけるバイオマーカーとなりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is necessary for the cancer cells to adapt to the tissue microenvironment for the metastasis formation in other organs. Colon cancer cells highly metastasize to the liver and control of liver metastasis is most important issue in the therapeutic strategy of colon cancer. We clarified that liver-derived insulin-like growth factors (IGFs) activated by cancer-producing protease play an important role for the liver metastasis formation and could be a therapeutic target using neutralizing antibody. Furthermore, we developed the measurement system of activated (bioactive) IGF in the blood and demonstrated that bioactive IGF was increased with progression of liver metastasis and could be a biomarker of IGF neutralizing strategy in the mouse model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：がん シグナル伝達 分子標的薬 インスリン様増殖因子

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでにインスリン様増殖因子(IGF)に対する中和抗体を用いて、前立腺がん・多発性骨髄腫の骨転移、大腸がん肝転移、家族性大腸腺腫症のモデル動物を用いて IGF の治療標的としての有用性を証明してきた。われわれが使用した中和抗体は IGF 結合タンパクから遊離した、活性型 IGF のみを中和し、IGF 結合タンパクと結合した非活性型の IGF は中和できない。この特性により本抗体治療は全身的な副作用の軽減と腫瘍特異的なドラッグデリバリーを両立させる理想的な治療法といえる。しかしながら動物実験において目立った副作用を認めず、また低濃度のほうが腫瘍抑制効果が高い傾向が見られ、投与量の設定法に課題を残した。これらの背景から抗体の標的そのものである活性型 IGF を血中で測定できれば、投与量の設定、治療効果・副作用予測のための直接的なバイオマーカーになりうると期待された。

2. 研究の目的

- (1) 生体内(血中)での活性型 IGF の測定系を確立すること
- (2) 活性型 IGF の IGF 中和抗体治療におけるバイオマーカー(投与量の設定因子、治療効果・副作用予測因子)としての有用性を検討すること。

3. 研究の方法

ヒトにおいては活性型 IGF を測定する ELISA kit が市販されているが、IGF 結合タンパク質の影響を受けやすく、十分に検証された測定系とはいえない。そこでわれわれは血中の活性型 IGF を評価するため、IGF 受容体過剰発現細胞を血液検体で刺激し抗リン酸化 IGF 受容体抗体用いたウエスタンブロット法にて IGF 受容体のリン酸化レベルを検出し、活性型 IGF を評価する機能的アッセイ法(Kinase Receptor Activation Assay:KIRA 法)の開発を試みた。次に免疫不全マウスの門脈にヒト大腸がん細胞株(HT29)を注入することにより肝転移を作成し、KIRA 法を用いて、経時的に活性型 IGF を測定する。次に抗 IGF 中和抗体を脾臓経由で門脈内投与し肝転移抑制効果および、活性型 IGF のバイオマーカーとしての有用性を検討する。

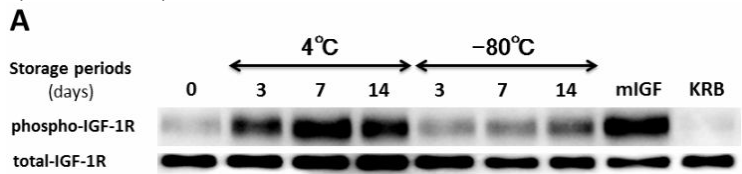
4. 研究成果

(1) KIRA 法の開発

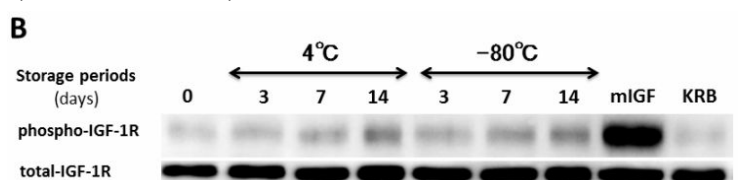
上記方法にて、血液中の活性型 IGF の検出に成功した。この系の確立に当たってサンプルの採取状況、保存状態が測定結果に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。すなわちマウスの活性型 IGF の測定には血清は不適であり、長期保存を避けることが望ましい(図上段 AB)。一方、ヒト活性型 IGF の測定は血清でも可能であるが、長期保存により高値に

なる傾向が見られた(図下段 AB)。いずれにせよ活性型 IGF の測定には EDTA 血漿が必須であり、保存温度にかかわらず、長期保存を避けたほうがよいとの結論が得られた。

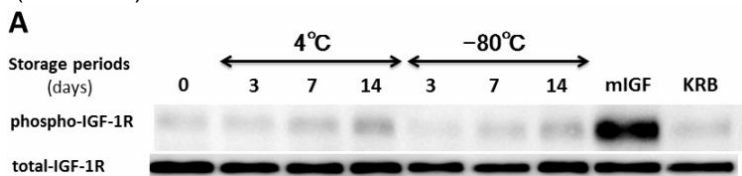
(マウス血清)



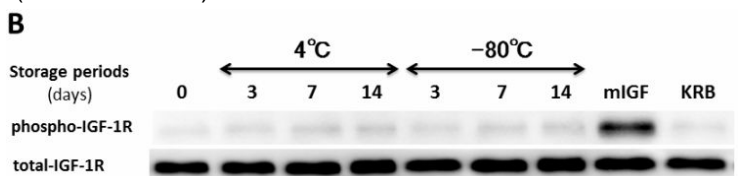
(マウス EDTA 血漿)



(ヒト血清)



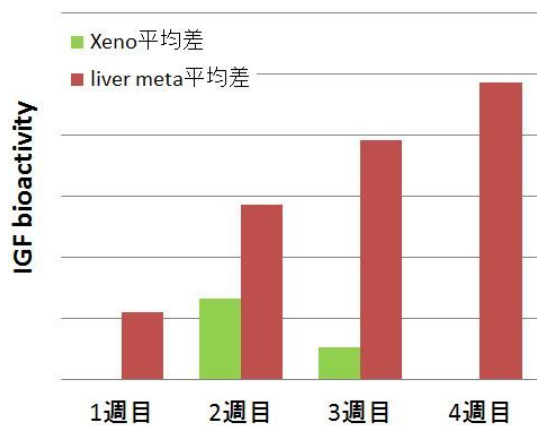
(ヒト EDTA 血漿)



これらの結果を踏まえ、われわれは KIRA のサンプルはすべて EDTA 血漿で採取し、採血当日に測定することで、採血条件による誤差をなくし、サンプル間の比較が可能になるものと考えられた。

(2) 肝転移モデルにおける血中活性型 IGF の評価

上記測定系をもちいて、免疫不全マウスの門脈にヒト大腸がん細胞株(HT29)を注入することにより肝転移を作成し、KIRA 法を用いて、経時的に活性型 IGF を測定した。肝転移の形成が進むにつれ、活性型 IGF の値は上昇し、一方で皮下に腫瘍細胞を移植した群においては、活性型 IGF の上昇はわずかであった(下図)。このことは肝転移の形成過程において、肝由来の IGF を腫瘍が活性化し、肝臓の微小環境に適応するために利用していることが強く示唆された。次にわれわれは抗 IGF 中和抗体を脾臓経由で門脈内投与(もしくは腹腔内投与)し、経時的に活性型 IGF 値を測定し、抗体の至適投与量を決定する。さらに活性型 IGF のバイオマーカーとしての有用性を肝転移抑制効果や副作用を指標に検討する予定である。



しかしながら HT29 は IGF-2 を発現しているため、中和抗体を用いた治療実験を行う際には抗マウス IGF-1 抗体と抗ヒト IGF-2 の両者の投与が必要である(マウスの肝における IGF-2 の発現はほとんどない)。さらにシンプルな系で肝転移に対する IGF 中和療法の有効性を証明するため、われわれは MMP-7 の発現のないマウス大腸がん細胞 Colon26, CT26(IGF-2 の発現もなし)に MMP-7 を強制発現させた細胞株を作成し、肝転移を作成し、そのモデルにおいてマウス IGF-1 抗体のみを投与する実験系の確立を目指している。

5. 主な発表論文等

Setoyama T, Miyamoto S, Horimatsu T, Morita S, Ezoe Y, Muto M, Watanabe G, Tanaka E, Chiba T. Multimodal endoscopic treatment for delayed severe esophageal stricture caused by incomplete stent removal. *Dis Esophagus*. (査読有) 2014;2:7112-115. doi: 10.1111/dote.12041

Hori K, Miyamoto S, Yukawa Y, Muto M, Chiba T, Matsuda T. Stability of acetaldehyde-derived DNA adduct in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. (査読有)2012;423(4):642-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.158.

Watanabe T, Miyamoto S, Kitagori K, Horimatsu T, Morita S, Mashimo Y, Ezoe

Y, Muto M, Chiba T. A case of long-term survival of metastatic desmoplastic small round cell tumor treated with multimodal therapy. (査読有) *Oncol Lett*. 2012;3(1):30-34.

doi: 10.3892/ol.2011.457

Setoyama T, Miyamoto S, Fukuda K. Hemosuccus pancreaticus diagnosed with concurrent endoscopic retrograde pancreatography and selective angiography. *Clin Gastroenterol Hepatol*. (査読有) 2012;10(4):A28. doi:10.1016/j.cgh.2011.10.024.

Horimatsu T, Miyamoto S, Ezoe Y, Muto M, Yoshizawa A, Sakai Y. Education and gastrointestinal imaging: case of early-stage squamous cell carcinoma of the anal canal diagnosed using narrow-band imaging system with magnification. *J Gastroenterol Hepatol*. (査読有)2012;27(8):1406.

doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07182.x

Miyamoto S, Mashimo Y, Horimatsu T, Ezoe Y, Morita S, Muto M, Chiba T. Cerebral air embolism caused by chemoradiotherapy for esophageal cancer. (査読有) *J Clin Oncol* 2012;30(25):e237-8.

doi: 10.1200/JCO.2012.41.6156.

Miyamoto S, Konda Y, Matsui M, Sawada K, Ikeda K, Watanabe N, Kawanami C, Chiba T. Acute airway obstruction in

a patient with achalasia. Intern Med.
(査読有) 2011;50(20):2333-6.

doi:10.2169/internalmedicine.50.5603

Nakanishi Y, Miyamoto S, Ishizu S, Seno H, Muto M, Chiba T. An unusual cause of dysphagia after endoscopic resection of an early esophageal cancer. Endoscopy. (査読有) 2011;43 Suppl 2:E156-7.

doi: 10.1055/s-0030-1256260

Horimatsu T, Miyamoto S, Morita S, Mashimo Y, Ezoe Y, Muto M, Chiba T. Pharmacokinetics of oxaliplatin in a hemodialytic patient treated with modified FOLFOX-6 plus bevacizumab therapy. Cancer Chemother Pharmacol. (査読有)2011;68(1):263-6.

doi: 10.1007/s00280-011-1633-9

Mashimo Y, Horimatsu T, Miyamoto S. Umbilical Metastasis (Sister Mary Joseph's Nodule) From Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Clin Gastroenterol Hepatol. (査読有) 2011;9(8):A20.

doi: 10.1016/j.cgh.2011.02.023

Akitake R, Miyamoto S, Nakamura F, Horimatsu T, Ezoe Y, Muto M, Chiba T. Early detection of 5-FU-induced acute leukoencephalopathy on diffusion-weighted MRI. (査読有) Jpn J Clin Oncol. 2011;41(1):121-4.

doi: 10.1093/jjco/hyq157

〔学会発表〕(計1件)

宮本 心一。

ワークショップ 7-2 大腸がんに対するインスリン様増殖因子の治療標的としての有用性 -発がんから肝転移まで- 第7回日本消化管学会総会学術集会、2011年2月18日、京都。

〔図書〕(計1件)

Miyamoto S, Morita S, Muto M. Multiple early-stage malignant melanoma of the esophagus with a long follow-up period after endoscopic treatment: report of a case and a literature review.

Esophageal Cancer - Cell and Molecular Biology, Biomarkers, Nutrition and Treatment Croatia: INTECH 2012;227-238

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~gastro/muto/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 心一 (MIYAMOTO SHIN'ICHI)

研究者番号: 90378761

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし