

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23791551

研究課題名（和文）

mTOR は食道扁平上皮癌において分子標的療法の target になりうるか？

研究課題名（英文）

Can mTOR become target of the molecular target therapy in esophagus squamous cell carcinoma?

研究代表者

平島 浩太郎 (HIRASHIMA KOTARO)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：10594468

研究成果の概要（和文）：mTOR は PI3K/Akt 経路の下流に位置し、cell growth の制御やアポトーシス抑制に関与する。癌細胞において mTOR は高発現し、浸潤・転移に関与する。また、mTOR 阻害剤は様々な癌腫に対して抗腫瘍効果を示しているが、食道癌において重要性は明らかになっていない。食道癌において mTOR 発現の意義を解明し、分子標的治療の target となりうるかを検討することが本研究の目的である。

研究成果の概要（英文）：The mammalian target of rapamycin (mTOR) plays central roles in the regulation of cell growth and proliferation. The aberrant activation of mTOR in relation to clinical outcome has been reported in several types of cancers. mTOR is increasingly important as a potential target for anticancer therapy. Nonetheless, a prognostic feature of mTOR activation in esophageal squamous cell carcinoma remains uncertain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：mTOR、RAD001、食道扁平上皮癌、PI3K/Akt、cell cycle、cell growth、apoptosis

1. 研究開始当初の背景

mTOR は約 290kDa の巨大な serine/threonine タンパク質リン酸化酵素である。PI3K/Akt 経路の下流に位置し、mTOR の effector 分子である p70S6 kinase と翻訳開始因子 eIF4E-binding protein (4E-BP1) を介し、タンパク質翻訳制御を行うことで主に細胞増殖に関与する。mTOR 阻害剤 (everolimus、商品名：RAD001) の開発が進み、欧米では進行性腎細胞癌の治療薬として既に承認され [Motzer RJ et al. Lancet. 2008]、国内でも本年 1 月に承認を得た。その他乳癌やの様々な癌種においても Phase II/III の臨床試験が進行中である。食道扁平上皮癌は悪性

度が高く、手術と化学放射線療法による治療成績は未だ不十分であるため、更なる治療成績向上を目指し、食道癌においても mTOR の発現が癌治療や癌化学予防の target として有望であるかどうかを検討することが必要である。

2. 研究の目的

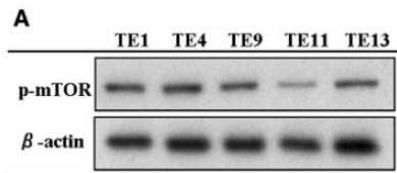
食道扁平上皮癌は、最も悪性度の高い癌種の一つであり、手術や化学療法、放射線療法、化学放射線療法などを含む集学的治療の発達にも関わらず、その予後は未だに不良である。そのため、基礎研究及び臨床研究により、分子標的療法など新しい治療法の開発が模

索されている。前述したように、mTOR 阻害剤は多くの癌腫の target として非常に有望である。さらに予後と関連する mTOR シグナルの変化を基礎研究で同定することは、リスクに応じた治療方針決定に役立ち、またその変化を標的とした治療法が開発された際には、対象患者選別の有意なマーカーとして用いられることが期待される。食道扁平上皮癌における mTOR の臨床病理学的意義は殆ど明らかにされていない。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色

食道癌細胞株 (TE series) 5 種を用いて p-mTOR 発現レベルを Western blot にて確認したところ、p-mTOR の高発現株 (TE4)、低発現株 (TE11) を認めた (Figure. 1A)。



その 2 種の TE4、TE11 両細胞株の免疫染色を施行したところ、Western blot と同様の結果が得られた (Figure. 1B)。

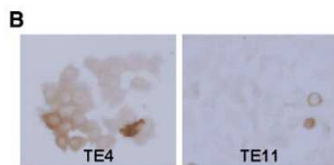
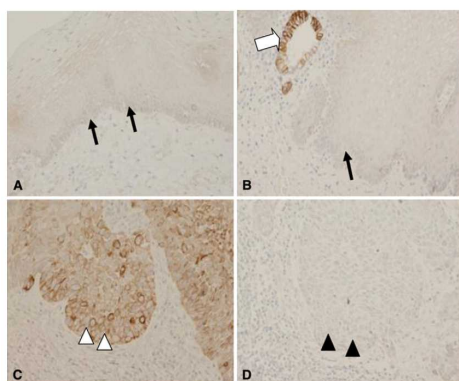


Figure. 2 p-mTOR 免疫染色

- A : 食道扁平上皮 (正常部 : p-mTOR 陰性)
- B : 胃噴門腺 (正常部 : p-mTOR 陽性)
- C : 食道扁平上皮癌 (p-mTOR 陽性)
- D : 食道扁平上皮癌 (p-mTOR 陰性)

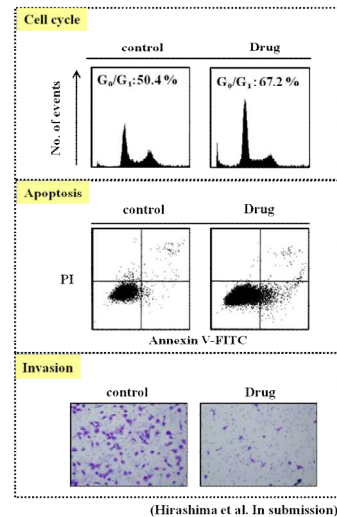


(2) 食道扁平上皮癌細胞株を用いた in vitro assay

高 p-mTOR 発現株 (TE4) と低 p-mTOR 発現株 (TE11) に対して、mTOR 阻害剤 (RAD001) の投与

により細胞増殖能の抑制 (proliferation assay)、細胞周期静止能 (cell cycle assay)、細胞浸潤能の抑制 (invasion assay)、アポトーシス能の促進 (apoptosis assay) などについて両株に差があるかを検討する。

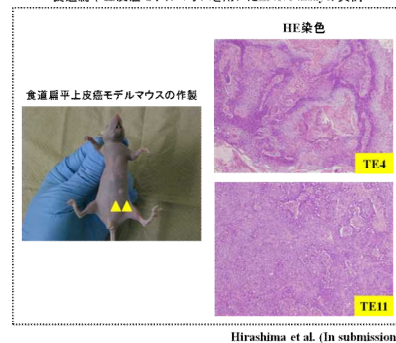
食道扁平上皮癌細胞株を用いた各 in vitro assay の事例



(3) 食道扁平上皮癌モデルマウスの作製、mTOR 阻害剤 (RAD001) による抗腫瘍効果の検討

in vitro で確認した p-mTOR 発現細胞株 (高発現 : TE4、低発現 : TE11) を用いて、皮下注モデルマウスを作製する。皮下注は腹部に行い、約 2 週間後に腫瘍を形成し、HE 染色で扁平上皮癌の形成を確認する。

食道扁平上皮癌モデルマウスを用いた In vivo assay の事例



4. 研究成果

(1) 免疫染色

術前治療の無い食道扁平上皮癌 (n=167) においては、陽性率は 116 例 / 167 例 (69.5%) であった。以前に我々は術前治療のない食道扁平上皮癌 (n=143) において、p-mTOR 陽性例は陰性例と比べ有意に予後不良であったことを報告した (Figure. 3) [Hirashima K et al. Ann Surg Oncol. 2010]。

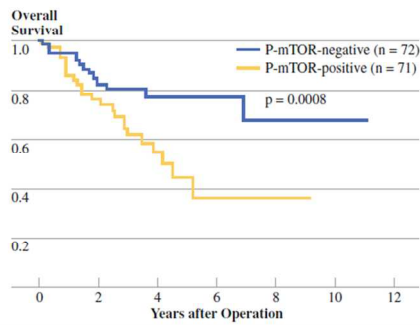
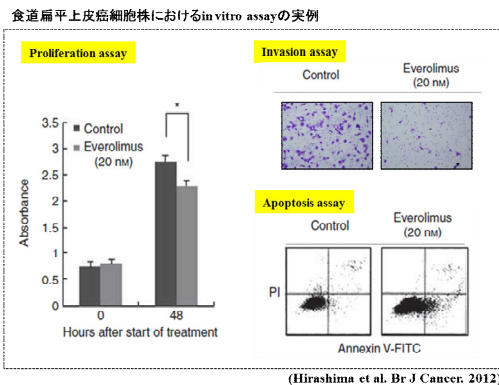


Figure.3 p-mTOR発現別における生存率

(2) 食道扁平上皮癌細胞株を用いた in vitro assay

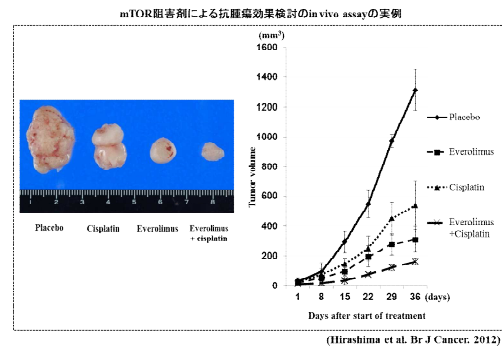
高 p-mTOR 発現株(TE4)と低 p-mTOR 発現株(TE11)に対して、mTOR 阻害剤(RAD001)の投与により細胞増殖能の抑制 (proliferation assay)、細胞周期静止能 (cell cycle assay)、細胞浸潤能の抑制 (invasion assay)、アポトーシス能の促進 (flow cytometry) 等について両株に差があるかを報告した [Hirashima K et al. Br J Cancer. 2012]。



(3) 食道扁平上皮癌モデルマウスの作製、mTOR 阻害剤 (RAD001) による抗腫瘍効果の検討

まず in vitro で確認した p-mTOR 発現細胞株 (高発現: TE4、低発現: TE11) を用いて、皮下注モデルマウスを作製した。腫瘍形成が確認出来たことは報告済みである [Hirashima K et al. Br J Cancer. 2012]。

① Placebo ② RAD001 ③ cisplatin ④ RAD001+cisplatin の 4 群に Randomization (各群 5 匹づつ) を行い、治療を開始し、抗腫瘍効果を検討した。5 週間検討を行い、4 群間で腫瘍体積の比較検討を行ったところ、RAD001 投与群で有意に腫瘍抑制効果を認められた。



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 6 件)

1. Hirashima K, Iyama KI, Baba Y, Honda Y, Sado Y, Ninomiya Y, Watanabe M, Takamori H, Beppu T, Baba H.

「Differential expression of basement membrane type IV collagen $\alpha 2$ and $\alpha 6$ chains as a prognostic factor in patients with extrahepatic bile duct carcinoma.」

J Surg Oncol. 2013;107:402-407. 査読有

DOI: 10.1002/jso.23225.

2. Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, Karashima RI, Sato N, Imamura Y, Nagai Y, Hayashi N, Iyama KI, Baba H.

「Aberrant activation of the mTOR pathway and anti-tumour effect of everolimus on oesophageal squamous cell carcinoma.」

Br J Cancer. 2012; 106: 876-82. 査読有

DOI: 1038/bjc.2012.36.

3. Imamura Y, Watanabe M, Nagai Y, Baba Y, Hirashima K, Karashima R, Iwatsuki M, Yoshida N, Kinoshita K, Kurashige J, Iyama K, Baba H.

「Lymphatic vessel invasion detected

- by the D2-40 monoclonal antibody is an independent prognostic factor in node-negative esophageal squamous cell carcinoma.」
J Surg Oncol. 2012; 105: 277-83. 査読有
DOI: 10.1002/jso.22079.
4. Sato N, Hayashi N, Imamura Y, Tanaka Y, Kinoshita K, Kurashige J, Saito S, Karashima R, Hirashima K, Nagai Y, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Baba Y, Watanabe M, Baba H.
「Usefulness of transcription-reverse transcription concerted reaction method for detecting circulating tumor cells in patients with colorectal cancer.」
Ann Surg Oncol. 2012; 19: 2060-5. 査読有
DOI:10.1245/s10434-011-1889-7.
5. 平島浩太郎、沖野哲也、田上弘文、木村有、小澄敬祐、松川哲也、八木泰志。
「膺頭部結核性リンパ節炎の1例」
日臨外会誌 2012; 73: 2353-2356. 査読有
6. 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. 2011; 83: 146-52. 査読有
DOI: 10.1159/000321797.
- [学会発表] (計2件)
1. 平島浩太郎、渡邊雅之、藏重淳二、木下浩一、斉藤誠哉、井田智、石本崇胤、長井洋平、岩槻政晃、岩上志朗、馬場祥史、宮本裕士、別府透、馬場秀夫
「高齢者胃癌における Glasgow Prognostic Score (GPS) の検討」
第112回日本外科学会定期学術総会
2012年4月12日 千葉県 幕張メッセ 国際展示場
2. 平島浩太郎、馬場祥史、渡邊雅之、
「食道扁平上皮癌における mTOR 阻害薬 (RAD001) の抗腫瘍効果の検討」
第111回日本外科学会定期学術総会
2011年5月26日～28日 (震災のため紙上開催)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
平島 浩太郎 (HIRASHIMA KOTARO)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号: 10594468
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
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
- 渡邊 雅之 (WATANABE MASAYUKI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 80254639

馬場 祥史 (BABA YOSHIFUMI)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20599708