

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590931

研究課題名(和文)小腸腺癌の分子生物学的解析と治療法の基礎的検討

研究課題名(英文)Characterization and drug screening of small intestinal adenocarcinoma

研究代表者

山田 篤生(Atsuo, Yamada)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80534932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小腸癌の発生機序と治療法を探索するために小腸癌細胞株を樹立した。小腸癌由来のSIAC1細胞では、CpGアイランドメチル化形質とミスマッチ修復遺伝子の発現低下、マイクロサテライトの不安定性、標的遺伝子の変異を認めた。 β -catenin遺伝子は部分欠失による安定型蛋白を産生し、Wntシグナルを活性化した。これらの異常は小腸癌の臨床検体でも確認された。

SIAC1細胞を用いた薬剤スクリーニングを行った。エリブリンはWntシグナルの減弱、c-Myc、サイクリンD1蛋白の発現低下を誘導し、変異型 β -cateninの分解を促進した。小腸腫瘍の異種移植マウスにエリブリンを投与し治療効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Small bowel adenocarcinoma (SBA) is rare malignancy with a poor prognosis and its pathogenesis remains unclear. The aims of this study were to investigate the molecular mechanisms and discover new treatments of SBA by establishing SIAC1 cells. SIAC1 cells showed small intestinal cell phenotype, decreased MMR proteins with CpG methylator phenotype and frame-shift mutations of target genes. SIAC1 cells had a β -catenin deletion, which results in a stable β -catenin protein with enhanced Wnt signaling. Clinical SBA samples also showed β -catenin deletion, aberrant MMR proteins expression and frame-shift mutations of MSI target genes. Screening assay using 140 compounds showed that eribulin significantly inhibited SIAC1 cell growth by inhibition of Wnt signaling through β -catenin protein degradation. This drug also showed efficacy in nude mice with SIAC1 cell xenograft, Eribulin, which showed anti-cancer effect both in vitro and in vivo, might be a good candidate for SBA treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小腸癌 遺伝子変異 抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

小腸は全消化管の約 75%の長さと同約 90%の表面積を占めているが、腫瘍の発生頻度は全消化管の 5%以下といわれている。小腸腫瘍に特異的な症状はなく、また、従来の内視鏡検査では早期発見や術前診断が困難な部位であった。しかし、近年カプセル内視鏡が登場して小腸全域が観察できるようになり、さらにダブルバルーン内視鏡検査により全小腸の観察に加え生検による病理診断や内視鏡治療も可能となってきた。

我々の施設でも 2011 年 9 月までに原因不明の消化管出血など小腸疾患が疑われる症例 203 人 326 検査を施行し 31 例の小腸腫瘍を診断した。その中には小腸腺癌 7 例、GIST10 例、悪性リンパ腫 10 例を認めている。今後も小腸腫瘍が見つかる機会が増えるものと予想される。

小腸腫瘍のうち GIST および悪性リンパ腫は、化学療法や放射線治療などが奏功し、比較的良好な 5 年生存率が得られている。特に GIST でみつかった c-kit 遺伝子の異常という分子生物学的特徴から、c-kit に対する分子標的治療が導入され、その予後が大いに改善された。一方小腸腺癌においては、未だに発癌メカニズムが明らかになっておらず、5 年生存率も 20%前後と低く、抗癌剤治療も確立していない。症例数が不十分であり、遺伝子異常に関して大部分不明である。このように小腸癌の研究が立ち遅れていた一つの原因として、基礎的研究に有用な小腸細胞株の欠如があげられる。現在までに小腸癌の細胞株の報告がなく、癌細胞としての分子生物学的特徴の検討や効果的な薬剤のスクリーニング、治療法の検討が困難であったため、大腸癌や胃癌などほかの消化器癌に比して治療法の開発が遅れている。

2. 研究の目的

小腸腺癌細胞株を樹立し、小腸癌の分子生物学的異常を明らかにし、新規薬剤治療について探索する。

3. 研究の方法

(1)我々が新規に樹立した小腸癌細胞株と代表的な大腸癌細胞株の遺伝子発現、遺伝子変異、細胞内シグナル、リン酸化たんぱく質の活性化などを網羅的に検討し、小腸癌細胞株の特性を明らかにする。また多数の抗癌剤の効果をスクリーニングし、小腸癌に治療効果のある新規薬剤を探索する。

(2)上記研究で明らかになった小腸癌の分子生物学的異常について、同意の得られた当院の小腸癌の手術検体を用いて確かめ、臨床的な頻度を検討する。さらに進行度、発癌部位などと相関があるか調べる。

(3)また前述の研究で探索した小腸癌にたいする抗癌剤の効果を明らかにするために、小腸癌の動物モデルを作成し治療効果を調べる。小腸癌細胞株をヌードマウスに接種して

小腸癌の異種移植腫瘍を作成し、細胞株を用いたスクリーニングで効果を認めた抗癌剤を投与し腫瘍の大きさや病理所見の変化を測定する。

4. 研究成果

(1) 小腸癌細胞株 SIAC1 細胞を樹立し、その分子生物学的特徴を、免疫染色、イムノプロットによる蛋白発現変化や qPCR 法による遺伝子発現量に注目して検索した。この細胞は小腸上皮細胞のマーカーである CK19 や CDX2 を高発現しており (図 1) 試験管内で敷石状に分裂して増殖した。また MLH1、MSH6 蛋白などのミスマッチ修復遺伝子の蛋白、遺伝子発現が減弱していたが、脱メチル化剤の添加によって MLH1 の遺伝子発現が回復した。これらの結果から小腸癌細胞株である SIAC1 細胞は、右側大腸癌でよくみられるミスマッチ修復遺伝子異常とプロモーターの CpG アイランドメチル化形質を有すると考えられた。

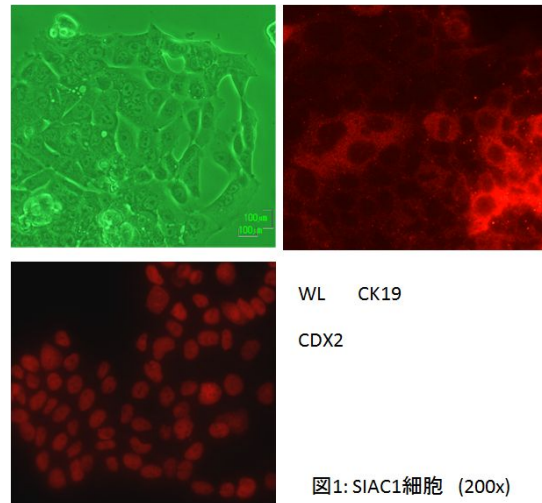


図1: SIAC1細胞 (200x)

(2) 次に SIAC1 細胞の遺伝子異常を検討した。ミスマッチ修復遺伝子に異常があったため、マイクロサテライトの不安定性を調べたところ MSI-H で ACVR2, TGFBR2, MSH3, MSH6, BAX, CASP5 など多数の標的遺伝子のフレームシフト変異がみられた (図 2)。また β -catenin 遺伝子にはリン酸化部位の欠失が見られた (図 3)。この変異型 β -catenin は、蛋白分解に抵抗性で野生型 β -catenin よりも強い Wnt シグナルの活性化を示した。また SIAC1 細胞のオルガノイド培養は正常

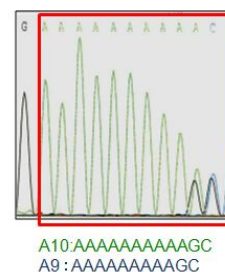


図2 TGFBR2遺伝子のフレームシフト変異

細胞と異なり Wnt の刺激剤である R-spondin を必要としないことが分かった。

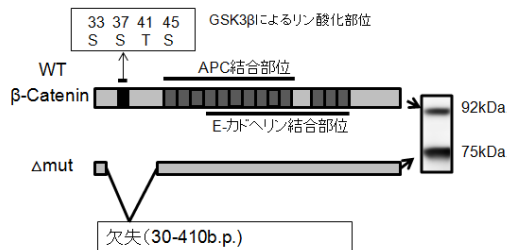


図3: SIAC1 細胞にみられたβ-Catenin 遺伝子異常

(3) SIAC1 細胞における細胞内シグナルについて検討した。細胞表面の受容体型チロシンキナーゼの活性を網羅的に解析するために蛋白アレイを行った。図4に示すようにSIAC1 細胞では EGFR1, EGFR2(HER2), EGFR3(HER3), VEGFR のリン酸化が亢進していると考えられた。また SIAC1 細胞ではとくに HER3 のリン酸化が亢進していることが分かった(図5)。

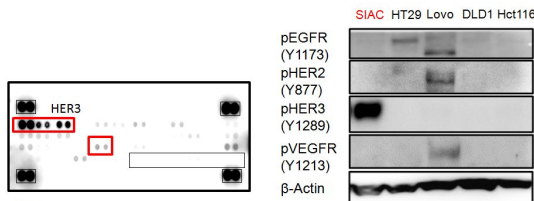


図4 受容体型チロシンキナーゼアレイ

図5 リン酸化蛋白の細胞間比較

(4) 臨床検体を用いた検討として、当院で手術を行い同意を得た11例の小腸癌について、ここまでの研究で明らかになった特徴について調べた。ミスマッチ修復蛋白発現の減弱 5/11 (45%)、 β -catenin の発現異常 4/11 (36%)、 β -catenin 遺伝子の欠失 3/11 (27%)、マイクロサテライト標的遺伝子の変異 ACVR2 (9%)、TGFB2 (100%)、MSH3 (18%)、MSH6 (36%)、BAX (36%)、CASP5 (100%)であった。すなわち本研究で樹立したSIAC1 細胞は多数の小腸癌の遺伝学的特徴を有することが分かった。

(5) 小腸癌細胞株を用いて140種の抗癌剤や分子標的薬の効果についてスクリーニング検査を行った(図6)。10 μ Mの濃度では25種類の薬剤で癌細胞の増殖抑制が得られたが、生体での使用濃度の目安となる0.01 μ Mでも効果があったのはボルテゾミブとエリブリンの二剤であった。SIAC1 細胞にエリブリンを投与すると Wnt シグナルの減弱、その標的遺伝子として知られる c-Myc やサイクリン D1 蛋白の発現低下がみられた。とくに

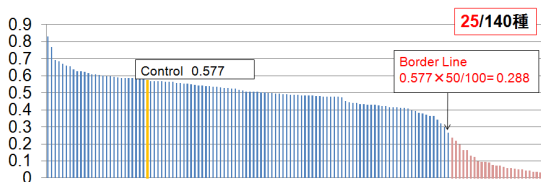


図6 薬剤感受性試験

SIAC1 細胞で安定化していた変異型 β -catenin 蛋白が影部エリブリンによって分解されていることが分かった。

最後に小腸腫瘍の異種移植マウスを用いてこれらの薬剤の効果を生体で検討した。エリブリンの投与によって腫瘍サイズの増大がほぼ完全に抑制され、治療効果が確認された(図7)。腫瘍部の検討によりエリブリンの投与によって β -catenin や細胞増殖マーカーの発現減弱がみられ、作用機序であると考えられた。

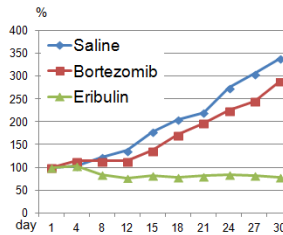


図7 薬剤投与下の移植腫瘍体積

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2件)

Suzuki H, Hirata Y, Suzuki N, Ihara S, Sakitani K, Kobayashi Y, Kinoshita H, Hayakawa Y, Yamada A, Watabe H, Tateishi K, Ikenoue T, Yamaji Y, Koike K. Characterization of a new small bowel adenocarcinoma cell line and screening of anti-cancer drug against small bowel adenocarcinoma. American Journal of Pathology, 査読有, Vol185, No.2, 2015, pp550-62.

DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.006.

山田篤生, 小腸癌-症状、診断から治療まで-, Modern Physician, 査読なし, 32巻, 2012, 886-889

〔学会発表〕(計2件)

Suzuki H, Hirata Y, Yamada A, Characterization of Small Bowel Adenocarcinoma Cell Line and Evaluation of Anti-Cancer Drug Efficacy Against Small Bowel Adenocarcinoma 米国消化器病学会週間 2013年05月21日、オーランド、アメリカ

鈴木裕史, 平田喜裕, 小池和彦, 小腸癌由来細胞株を用いた小腸癌の分子生物学的特徴の検討 第101回日本消化器病学会総会, 2015年4月23日、仙台

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 篤生 (YAMADA ATSUO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80534932

(2) 研究分担者

平田 喜裕 (HIRATA YOSHIHIRO)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：10529192

(3) 研究協力者

鈴木 裕史 (SUZUKI HIROBUMI)
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医