

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861204

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌におけるmTOR発現とヘッジホッグシグナル経路の相互作用の解明

研究課題名(英文)Elucidation of interaction between the expression of mTOR and the hedgehog pathway on esophageal 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌細胞株のp-mTORレベルを測定後に低発現株と高発現株に分類し、mTOR阻害剤処理により細胞浸潤能、増殖能、抗アポトーシス作用、抗癌剤感受性において両株の差を検討した。高発現株(TE4)と低発現株(TE11)において両株に有意差はなく、p-mTORの発現性が重要であった。また、食道扁平上皮癌モデルマウスを作製し、mTOR阻害剤投与による抗腫瘍効果を確認した。免疫染色ではmTOR発現と予後相関ではp-mTOR陽性例は有意に予後不良であることを確認した。Hedgehog経路においては、転写因子であるGli1の免疫染色を施行し、予後との評価を行ったが、有意な差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The mammalian target of rapamycin (mTOR) plays a crucial role in protein translation, cell growth, and proliferation. The aberrant activation of mTOR and its prognostic significance have been reported in several cancers, including esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). We investigated that the mTOR pathway was aberrantly activated in most ESCC tumors, mTOR inhibitor had a therapeutic effect on mTOR-activated ESCC cell both in vitro and in vivo. After having measured p-mTOR level of ESCC, we classified expression level. We examined both cell in invasion ability, growth ability, antiapoptosis, antitumor effect by mTOR inhibitor. We confirmed that expression of p-mTOR were important. Moreover, we made mice with ESCC and confirmed an antitumor effect with mTOR inhibitor. We identified that the p-mTOR positive case significantly was poor prognosis. In the Hedgehog signaling, we did not recognize the significance for the expression of Gli1.

研究分野：消化器外科学(上部消化管)

キーワード：mTOR 食道扁平上皮癌 mTOR阻害剤 抗癌剤感受性 Hedgehogシグナル

## 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 のエフェクター分子である 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参与する。mTOR 阻害剤 (everolimus、商品名 : RAD001) の開発が進み、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 月に承認を得ている。その他、日本では脳神経内分泌腫瘍でも承認を得ている。最近、欧米ではホルモン受容体 (HR) 陽性 / HER2 陰性進行性乳癌にも承認され [Baselga et al. N Engl J Med. 2012]、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、また検討することが必要である。さらに最近では、mTOR シグナル経路は、転写因子である Gli1 タンパク質の活性化を促進することが解明された [Yan Wang, et al. Cancer Cell. 2012]。Gli1 の本来の伝達経路である hedgehog シグナル経路は発生過程の細胞増殖と分化における重要な制御因子であり、細胞表面にある PTCH1 と smoothend ホモログを介して情報伝達を行っている。

我々は mTOR 阻害剤とヘッジホッグ阻害剤 (vismodegib、商品名 : GDC-0449) を用いて、二重にブロックすることで、さらなる治療効果を得ることが出来るかどうかを解明する必要がある。

## 2. 研究の目的

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参与する。癌細胞において mTOR は高発現し、癌細胞の浸潤・転移に参与する。また、mTOR 阻害剤は様々な癌腫に対して抗腫瘍効果を示し、多くの臨床試験も行われている。食道扁平上皮癌における mTOR の重要性は未だ不明瞭な部分が多く、我々は mTOR 発現の意義解明をテーマとし、mTOR が分子標的治療の target となりうるかを検討してきた。

最近では Gli1 タンパクを制御する hedgehog シグナル経路が mTOR シグナル経路と相互に作用することも分かってきており、食道癌における mTOR 発現レベルと hedgehog、Gli1 発現レベルを免疫染色で評価し、予後や臨床病理学的因子との関係を解析する。食道扁平上皮癌細胞株を用いた in vitro study を行い、次に食道癌モデルマウスを作成し、我々が行ってきた mTOR 阻害剤による腫瘍増殖抑制効果の検討に hedgehog シグナル阻害剤を組み合わせた検討を行う。

## 3. 研究の方法

まず我々は、1996 年から 2007 年まで、当科で外科切除を行った術前治療の無い食道扁平上皮癌切除検体 (167 例) を用いて、p-mTOR の免疫染色を施行した。次に食道癌細胞株 (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。

以上の結果より mTOR の activation が食道扁平上皮癌患者によって異なることが明らかとなった。 [Hirashima K et al. Br J Cancer. 2012]。

以下の実験を、上記実験によって確認された高発現株 (TE4)、低発現株 (TE11) を用いて進めた。細胞増殖能、浸潤能、抗アポトーシス作用、放射線感受性等につき実験を進めた。次に食道扁平上皮癌細胞株の p-mTOR 発現レベルを測定し、mTOR 阻害剤により in

vitro での癌細胞増殖能、浸潤能は抑制され、アポトーシスを促進する結果を報告した [Hirashima K et al. Br J Cancer.2012]。

この確立した研究内容に加えて hedgehog 阻害剤を用いて同様に抗腫瘍効果を、in vitro、in vivo の両方で単独・併用投与で検討する。

#### 4 . 研究成果

研究目的のうち in vitro における、「食道扁平上皮癌細胞株の p-mTOR レベルを測定した後に低発現株と高発現株に分類し、mTOR 阻害剤処理により細胞浸潤能 (invasion assay)、増殖能 (proliferation assay)、抗アポトーシス作用 (flow cytometry)、抗癌剤感受性などにおいて、両株に差があるかを検討する。」は概ね予定通り進行し、再現性を確認できた。しかし、高発現株 (TE4) と低発現株 (TE11) においては両株に有意な差はないこと、mTOR 阻害剤処理において p-mTOR が発現していることが重要であることが確認できた。in vivo では食道扁平上皮癌モデルマウスを作製し、mTOR 阻害剤投与による抗腫瘍効果を検討している。

「腫瘍における mTOR signaling の変化を解析し、さらに放射線増強作用、抗癌剤感受性増強作用の有無についても検討を行う。」に関しては、mTOR 阻害剤投与により抗腫瘍効果がすでに確認できており、実験系の確立を行った cisplatin の感受性増強作用も確認できたが、放射線増感作用に関してはまだ研究進行に難渋した。2010 年、2013 年に基本となる論文が publish されているため、全体的な研究計画の根幹は確立出来ていたと考える。

「食道扁平上皮癌 250 例以上」の免疫染色のうち、170 例ほどで m-TOR と予後との関連はすでに p-mTOR 陽性例は有意に予後不良であることが確認できた。Hedgehog 経路においては、転写因子である Gli1 の免疫染

色を施行し、予後との評価を行い、p-mTOR 陽性例との相関、長期予後を検討し、データベースをアップデートしつつ症例数増加を検討した。結果は Gli1 の免疫染色を施行し、予後との評価を行ったが、有意な差を認めなかった。

#### 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 7 件)

Sato Y, Kosugi SI, Aizawa N, Ishikawa T, Kano Y, Ichikawa H, Hanyu T, Hirashima K, Bamba T, Wakai T. Risk Factors and Clinical Outcomes of Recurrent Laryngeal Nerve Paralysis After Esophagectomy for Thoracic Esophageal Carcinoma. *World J Surg.* 2016 Jan;40(1):129-36.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464155>

Kano Y, Kosugi S, Ishikawa T, Otani T, Muneoka Y, Sato Y, Hanyu T, Hirashima K, Bamba T, Wakai T. Prognostic significance of peritoneal lavage cytology at three cavities in patients with gastric cancer. *Surgery.* 2015;158:1581-89  
doi: 10.1016/j.surg.2015.04.004.

Hirashima K, Watanabe M, Shigaki H, Imamura Y, Ida S, Iwatsuki M, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Baba H. Prognostic significance of the modified Glasgow Prognostic Score in elderly patients with gastric cancer. *J Gastroenterol.* 2014;49:1040-1046.  
doi: 10.1007/s00535-013-0855-5.

Nagai Y, Beppu T, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Hayashi H, Nitta H, Imai K, Masuda T, Okabe H, Hirashima K, Imamura Y, Baba Y, Chikamoto A, Baba H. Carcinoembryonic Antigen Half-life Is an Early Predictor of Therapeutic Effects in Induction Chemotherapy for Liver Metastases from Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2014;34:5529-5535.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275051>

Sawayama H, Ishimoto T, Watanabe M, Yoshida N, Sugihara H, Kurashige J, Hirashima K, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E,

Morita M, Shiose Y, Baba H. Small molecule agonists of PPAR- exert therapeutic effects in esophageal cancer. *Cancer Res*. 2014;74:575-585 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1836.

Wada T, Ishimoto T, Seishima R, Tsuchihashi K, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Masuko T, Wright NA, Furuhashi S, **Hirashima K**, Baba H, Kitagawa Y, Saya H, Nagano O. Functional role of CD44v-xCT system in the development of spasmodic polypeptide-expressing metaplasia. *Cancer Sci*. 2013;104:1323-1329. doi: 10.1111/cas.12236.

**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 2 and 6 chains as a prognostic factor in patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *J Surg Oncol*. 2013;107:402-407. doi: 10.1002/jso.23225.

〔学会発表〕(計 8 件)

**平島 浩太郎**, 小杉 伸一、石川 卓、田中 花菜、加納 陽介、市川 寛、羽入 隆晃、番場 竹生、日紫喜 万理子、永橋 昌幸、坂田 純、亀山 仁史、小林 隆、皆川 昌広、小山 諭、若井 俊文、「E-PASS scoring system による胃切除術についての検討」、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 18 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

日紫喜 万理子、小杉 伸一、市川 寛、中川 悟、石川 卓、番場 竹生、羽入 隆晃、**平島 浩太郎**、加納 陽介、田中 花菜、皆川 昌広、小林 隆、亀山 仁史、坂田 純、永橋 昌幸、小山 諭、若井 俊文、「NCD データによる食道切除術後死亡リスクモデルを用いた施設間比較：その実践と問題点」、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 18 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

市川 寛、小杉 伸一、石川 卓、番場 竹生、羽入 隆晃、**平島 浩太郎**、加納 陽介、田中 花菜、日紫喜 万理子、皆川 昌広、小林 隆、亀山 仁史、坂田 純、永橋 昌幸、小山 諭、若井 俊文、「食道癌術後の重篤な合併症は腫瘍学的予後不良因子である：Clavien-Dindo 分類による術後合併症重症度評価の臨床的意義」、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 18 日、名古屋国際会議場(愛

知県・名古屋市)

番場 竹生、小杉 伸一、石川 卓、羽入 隆晃、**平島 浩太郎**、市川 寛、加納 陽介、田中 花菜、日紫喜 万理子、永橋 昌幸、坂田 純、亀山 仁史、小林 隆、皆川 昌広、小山 諭、若井 俊文、「胸部食道癌 cT3sT4 症例の治療成績」、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 16 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

**平島 浩太郎**、小杉 伸一、石川 卓、亀山 仁史、坂田 純、加納 陽介、佐藤 優、羽入 隆晃、番場 竹生、若井 俊文、「高齢者に対する胃癌手術の安全性の検討」、第 70 回日本消化器外科学会、2015 年 7 月 15 日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

小杉 伸一、石川 卓、番場 竹生、羽入 隆晃、**平島 浩太郎**、市川 寛、小林 隆、亀山 仁史、坂田 純、若井 俊文、「食道癌切除再建術後の空腸瘻留置期間に関する検討」、第 70 回日本消化器外科学会、2015 年 7 月 15 日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

**平島 浩太郎**、石川 卓、加納 陽介、田中 花菜、諸 和樹、羽入 隆晃、番場 竹生、小杉 伸一、小山 諭、若井 俊文、「噴門側胃切除術後に拳上空腸脚背側へ内ヘルニアを来した 1 例」、第 44 回胃外科術後障害研究会、2014 年 10 月 31 日、ロゼシアター(静岡県・富士市)

石川 卓、**平島 浩太郎**、羽入 隆晃、加納 陽介、番場 竹生、小杉 伸一、若井 俊文、「噴門側胃切除術、空腸間置再建後の逆流性食道炎」、第 44 回胃外科術後障害研究会、2014 年 10 月 30 日、ロゼシアター(静岡県・富士市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等 無し

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平島 浩太郎(KIRASHIMA, 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