

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460926

研究課題名(和文) EGFRシグナル阻害による細胞分化誘導を用いた食道癌に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Anti-tumor effects of EGFR inhibitors via cell differentiation on esophageal cancer cells

研究代表者

大橋 真也(Ohashi, Shinya)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20435556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌細胞株(TE1, TE5, TE11, TE11R, TE8, HCE4)、形質転換した食道上皮細胞株(T-Epi, T-Mes)に対するEGFR阻害剤の殺細胞及び抗腫瘍効果をin vitro, in vivoで検討した。上皮系細胞株であるTE1, TE5, TE11, TE11R, T-Epi細胞は、EGFR阻害剤投与により細胞分化が誘導され、有効な殺細胞効果、抗腫瘍効果が見られたが、間葉系細胞株であるTE8, HCE4, T-Mes細胞にはそうした効果は見られず、有効性が示されなかった。EGFR阻害剤は上皮系食道癌細胞には有効な治療となりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cytotoxic and anti-tumor effects of EGFR inhibitors on human (esophageal squamous cell carcinoma) ESCC cells (TE1, TE5, TE8, TE11R, and HCE4) as well as transformed esophageal epithelial cells (T-Epi, T-Mes) were investigated. EGFR inhibitors showed cytotoxic and anti-tumor effect on epithelial-like cells (TE1, TE5, TE11, TE11R, and T-Epi) in accompany with increased expression of cell differentiation markers, but not on mesenchymal-like cells (TE8, HCE4, and T-Mes). EGFR inhibitors are considered to be effective for epithelial-like ESCC cells through the induction of cell differentiation.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道癌 EGFR阻害剤 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

がんの治療効果を高めるためには、治療後に残存する治療抵抗性癌細胞をいかに消滅させるかが重要で、未分化な癌細胞の制御がカギとなるが、その生成には、上皮間葉移行 (EMT) が重要な役割をはたす。食道上皮において EGF 受容体 (EGFR) シグナルは、分化調節に働く Notch シグナルを負に制御し細胞分化を抑制することで EMT を促進することが知られている。我々は、食道扁平上皮癌の EGFR シグナルを阻害することが、食道がん細胞の分化を促進し、食道がん治療に有効なのではないかと考えた。

2. 研究の目的

食道癌細胞に対し、EGFR シグナル阻害による抗腫瘍効果を検討すること

3. 研究の方法

1) In vitro 実験:

形質転換の確認された食道上皮細胞である T-Epi 及び T-Mes 細胞の培養液中に EGFR 阻害剤 (チロシンキナーゼ阻害剤としてエルロチニブ、抗体薬としてセツキシマブ) を添加し、細胞分化マーカー (CK13, Involucrin) の発現及び、72 時間後の細胞増加率を検討した。

次に、食道扁平上皮癌細胞株 (TE1, TE5, TE11, TE11R, TE-8, HCE4) の培養液中に、同様に EGFR 阻害剤を添加し、細胞分化マーカー (CK13, Involucrin) の発現及び、72 時間後の細胞増加率を検討した。

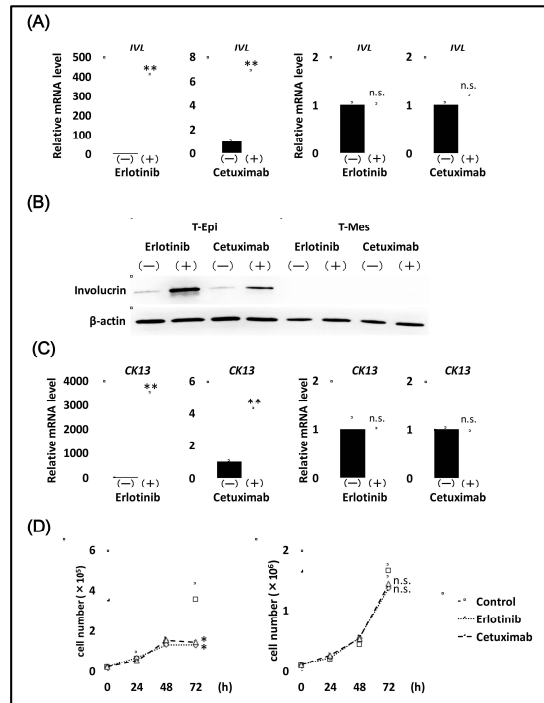
2) In vivo 実験:

免疫抑制マウスの皮下移植における生着が確認されている TE8, TE11R 細胞を 10×10^6 個皮下に移植し、腫瘍の生着 (150 ~ 300mm³ のサイズの腫瘍生着) が確認できた後に EGFR 阻害剤 (チロシンキナーゼ阻害剤としてエルロチニブ、抗体薬としてセツキシマブ) を投与し、腫瘍増殖抑制効果、病理学的評価を行った。

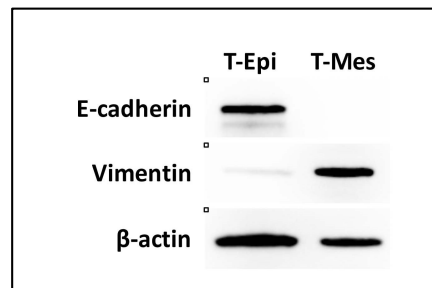
4. 研究成果

1) In vitro 実験

形質転換の確認された 2 つの細胞株 (T-Epi, T-Mes) に EGFR 阻害剤を投与した結果、T-Epi 細胞ではエルロチニブ投与群、セツキシマブ投与群のどちらの群においても Involucrin, CK13 の発現上昇が見られ、細胞分化の誘導が見られた。それに伴い、T-Epi 細胞では EGFR 阻害剤投与 (エルロチニブ投与群、セツキシマブ投与群) により、細胞増殖が抑制した。一方、T-Mes 細胞では、エルロチニブ投与群、セツキシマブ投与群のどちらの群においても、細胞分化は誘導されず、細胞増殖にも変化を認めなかった。 (右上図)

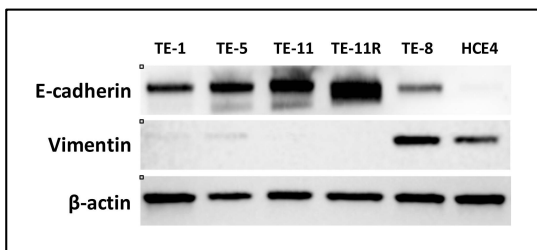


この 2 種類の細胞株の違いは、T-Epi 細胞は E-cadherin 陽性、Vimentin 陰性で上皮系細胞であること、一方、T-Mes 細胞は E-cadherin 陰性、Vimentin 陽性で間葉系細胞であることであった。



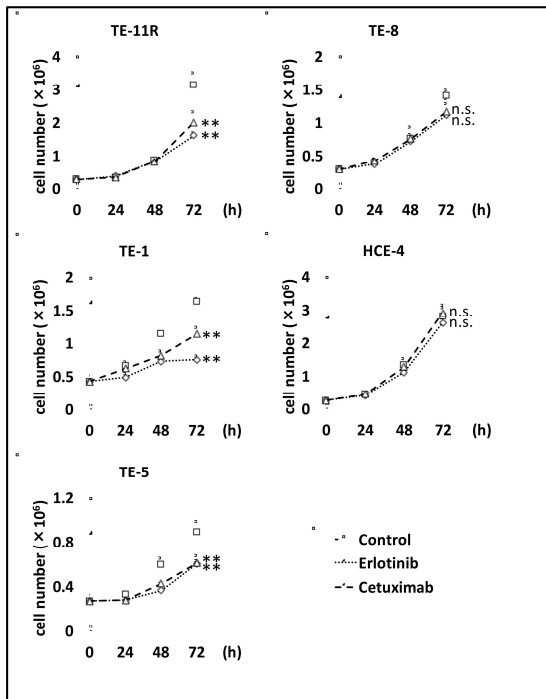
上記結果に基づき、EGFR 阻害剤の殺細胞効果は、上皮系細胞、間葉系細胞という細胞の形質により変化するのではないかと考えた。

次に食道癌細胞株 (TE-1, TE-5, TE-8, TE-11, TE-11R, HCE4) を用いて EGFR 阻害剤 (エルロチニブ投与群、セツキシマブ投与群) の治療効果を検討した。まず初めに、EMT マーカー (E-cadherin, Vimentin) の発現で食道癌細胞株を上皮系細胞、間葉系細胞に分類すると、TE-1, TE-5, TE-11, TE-11R は上皮系細胞、TE-8, HCE4 は間葉系細胞であった。



これらの細胞株に EGFR 阻害剤 (エルロチニブ、セツキシマブ) を投与すると、上皮系細胞である TE-1, TE-5, TE-11, TE-11R

は細胞分化マーカー（CK13, Involucrin）の発現亢進が見られ、細胞増殖抑制がみられたのに対し、間葉系細胞である TE-8, HCE4 には細胞分化誘導、および細胞増殖抑制は認められなかった。（下図）



2) In vivo 実験

TE-11R, TE-8 をマウス皮下に移植し、生着の確認できた腫瘍にセツキシマブを投与したところ、上皮系細胞である TE-11R 細胞では有意な腫瘍増殖抑制効果が確認できたが、TE-8 では有意な増殖抑制効果は見られなかった。また、病理組織による評価でも、TE-11R の xenograft 腫瘍には、細胞分化が誘導され Involucrin 発現の上昇がみられたが、TE-8 の xenograft 腫瘍ではそうした効果は見られなかった。

以上の結果より、食道がんの治療において、EGFR シグナル阻害を標的とした治療は、上皮系癌細胞には有効に働くが、間葉系癌細胞には無効であることが示唆され、今後の EGFR 阻害剤を用いた食道がん治療に対し重要な治療戦略となることが示唆された。

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 5 件)

1. Kikuchi O, Ohashi S, Horibe T, Kohno M, Nakai Y, Miyamoto S, Chiba T, Muto M, Kawakami K. Novel EGFR-targeted strategy with hybrid peptide against

oesophageal squamous cell carcinoma.

Scientific Reports. 査読有、6 : 2016, 22452. doi: 10.1038/srep22452.

2. Tanaka K, Whelan KA, Chandramouleeswaran PM, Kagawa S, Rustgi SL, Noguchi C, Guha M, Srinivasan S, Amanuma Y, Ohashi S, Muto M, Klein-Szanto AJ, Noguchi E, Avadhani NG, Nakagawa H. ALDH2 modulates autophagy flux to regulate acetaldehyde-mediated toxicity thresholds. *Am J Cancer Res*. 査読有、2016. 6(4) : 781-96.
3. Ohashi S, Miyamoto S, Kikuchi O, Goto T, Amanuma Y, Muto M. Recent Advances from Basic and Clinical Studies of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology*. 査読有、149(7): 2015, 1700-15. doi:10.1053/j.gastro.2015.08.054
4. Amanuma Y, Ohashi S, Itatani Y, Tsurumaki M, Matsuda S, Kikuchi O, Nakai Y, Miyamoto S, Oyama T, Kawamoto T, Whelan KA, Nakagawa H, Chiba T, Muto M. Protective role of ALDH2 against acetaldehyde-derived DNA damage in oesophageal squamous epithelium. *Scientific Reports*. 査読有、5 : 2015, 14142. doi: 10.1038/srep14142.
5. Kikuchi O, Ohashi S, Nakai Y, Nakagawa S, Matsuoka K, Kobunai T, Takechi T, Amanuma Y, Yoshioka M, Ida T, Yamamoto Y, Okuno Y, Miyamoto S, Nakagawa H, Matsubara K, Chiba T, Muto M. Novel 5-fluorouracil-resistant human esophageal squamous cell carcinoma cells with dihydropyrimidine dehydrogenase overexpression. *Am J*

Cancer Res. 査読有、5(8) : 2015,
2431-2440.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Yoshioka M, Ohashi S, Kikuchi O,
Amanuma Y, Ida T, Nakai Y, Nakagawa H,
Chiba T, Muto M: EGFR inhibition
promotes differentiation of
esophageal squamous cancer cells
through Notch signaling pathway.
Digestive Disease Week and the 116th
annual meeting of the American
Gastroenterological Association,
Washington DC, May 16-19 2015, Poster
presentation
2. Yoshioka M, Ohashi S, Kikuchi O,
Amanuma Y, Ida T, Nakai Y, Miyamoto S,
Nakagawa H, Chiba T, Muto M: EGFR
inhibition activates Notch signaling
pathway and induces esophageal
squamous cancer cell differentiation.
GAP 2015 Conference, Houston, TX,
April 14-16, 2015, Poster presentation

〔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 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者
大橋 真也 (OHASHI, Shinya)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 20435556

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし