

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008 ～ 2009
課題番号：20790975
研究課題名 (和文) 食道癌における線維芽細胞増殖因子受容体 (KGFR) の発現と局在および分子標的治療
研究課題名 (英文) Expression and localization of keratinocyte growth factor receptor (KGFR) in esophageal cancer and molecular target therapy

研究代表者
吉野 雅則 (YOSHINO MASANORI)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：10343609

研究成果の概要 (和文)：近年の分子標的治療薬の進歩は目覚ましく、増殖因子受容体に関連した薬剤は臨床応用され、その効果も確認されている。そこで分子標的治療分野では比較的後進の食道癌でもこれらの治療が応用できると考え、細胞増殖や血管新生に重要な役割を果たしている keratinocyte growth factor receptor (KGFR) の食道癌における役割に着目した。KGFR が食道癌の増殖に関与しているのか、KGFR を阻害することにより食道癌の増殖が抑制できる可能性があるのかについて研究を進め、分子標的治療法としての将来性につき検討した。

研究成果の概要 (英文)：The progress of the recent molecular target drug is remarkable, and the medicine associated with the growth factor receptor is applied clinically, and those effectiveness is confirmed. Therefore we thought that we could apply these treatment to even relatively developing esophageal cancer in the field of molecular target therapy and aimed at a role of keratinocyte growth factor receptor (KGFR) which played role that was important to proliferation of cells and angiogenesis in esophageal cancer. Progressed a study whether KGFR was associated with a proliferation of esophageal cancer whether we might prevent growth of esophageal cancer by inhibiting KGFR and examined it about the future as the molecular target therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

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：食道外科学

1. 研究開始当初の背景

日本における食道癌死亡率は全悪性新生物中6位であり、近年胃癌の死亡率が著しく減少していることに比し、食道癌の死亡率は不変、あるいはわずかに増加している。欧米諸国に比べ、我が国の食道癌の罹患率は中国と並び非常に高いことから、食道癌の発生、増殖、転移を規定する因子の解明は急務となっている。

食道癌の予後は未だ悪く、全進行食道癌（II+III+IV期）の5年生存率は30%前後程度という現状である。臨床上50種類以上の癌治療薬が利用できるようになった現在、手術療法、化学療法、放射線療法の三大治療法に生物学的治療法が加わり、治療成績は向上してきた。中でも近年の分子標的治療薬の進歩には目を見張るものがあり、いくつかの増殖因子受容体に関連した薬剤は臨床応用され、その効果も確認されている。そこで分子標的治療分野では比較的后進の食道癌でもこれらの治療が応用できると考え、この研究を計画した。

食道癌も他臓器癌同様、複数の癌遺伝子異常の蓄積により多段階発癌の過程をとることや、転移に関しても多くのステップから成り立っていることが近年明らかになりつつある。しかしこれら増殖、転移に関与する多様な因子の役割については未だ十分に解明されていない。

悪性腫瘍領域でのKGFRに関する研究は、海外では膀胱癌、肺癌、前立腺癌、頭頸部癌でいくつかの論文発表があるが、食道癌では国内外を問わず全く類をみない。今回、食道癌とKGFRの関係が証明され、その阻害が可能となれば消化器癌全般においても既に商品化されているTrastuzumab、Gefitinib、Bevacizumab、Cetuximabなどとともに分子標的治療分野での大いなる

前進となる。

2. 研究の目的

細胞増殖や血管新生に重要な役割を果たしている線維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factor: FGF）の食道癌組織における役割に着目し、特に上皮細胞の増殖に関与しているFGF-7/KGF（Keratinocyte Growth Factor）とFGF-10を中心に、培養食道癌細胞とヒト食道癌組織において、FGF-7とFGF-10の特異的受容体であるKGFRの発現と局在について検討し、KGFRが食道癌の増殖、あるいは分化に関与しているか否かを明らかにする。

さらにKGFRが食道癌の増殖に関与しているのであれば、KGFRをmRNAレベルで阻害することにより食道癌の増殖が抑制できる可能性があるのかについて研究を進め、臨床応用における分子標的治療法としての将来性につき検討する。

3. 研究の方法

(1) Western blot 法

独自に作製した、KGFRに対する特異的ポリクローナル抗体を用いて、培養食道癌細胞4系統（TE-1、2、8、11）におけるKGFRタンパクの発現を確認する。

(2) 標本採取

十分なインフォームドコンセントを得る。当施設において切除されたヒト食道癌組織と近傍の正常組織の新鮮凍結標本を作製する。同部のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を作製する。

(3) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

ヒト食道癌組織と正常組織の新鮮凍結標本を用いてRT-PCRを行ない、KGFR mRNAの発現を確認する。

(4) In situ hybridization (ISH) 法

KGFR に対するジゴキシニゲン標識 cRNA プローブ (riboprobe) を作製し、ヒト食道癌組織上で KGFR mRNA の発現を確認し、KGFR の産生細胞を同定する。

(5) 免疫組織化学染色法 (sABC 法)

上記の KGFR 抗体を用いて、食道癌組織と正常食道組織のホルマリン固定パラフィン包埋組織における KGFR タンパクの局在を検討する。また、連続切片上で細胞増殖マーカーである Ki-67 を用いた染色を行ない、比較検討する。さらに細胞分化のマーカーとして Cytokeratin 20、アポトーシスのマーカーとして Caspase-3 で染色を行ない、それぞれの局在に相関があるか検討する。

(6) 培養細胞系 (in vitro)

培養食道癌細胞 (TE-1、2、8、11) に recombinant KGF あるいは FGF-10 を添加し、細胞増殖曲線を作製する。また、KGFR (FGFR2-IIIb)、FGFR2-IIIc、KGFR+KGF などを遺伝子導入し、細胞の増殖能、遊走能、分化傾向の変化について検討する。

(7) KGFR 阻害実験 (in vitro)

pSilencer siRNA Expression vector (Ambion 社) に組み込んだ siRNA を用い、KGFR mRNA の発現を長期間にわたり阻害し、培養食道癌細胞の増殖、遊走、分化への影響を調べる。

(8) 総合評価、学会・論文発表

実験結果と食道癌の組織型・肉眼型・深達度・リンパ節転移などの臨床病理学的所見、および予後とを比較検討する。siRNA 導入による増殖抑制などが確認できれば、動物実験に向けて研究計画を進展させ、新たな分子標的治療薬としての可能性を検討する。

4. 研究成果

KGFR 抗体を用いて、培養食道癌細胞 3 系統 (TE-1、8、11) における KGFR タンパクの発現を確認した。ヒト食道癌組織と正常組織の新鮮凍結標本を用いた RT-PCR では、KGFR mRNA の発現を確認した。ヒト食道癌組織上で KGFR mRNA の発現を確認し、KGFR の産生細胞を同定した。上記の KGFR 抗体を用いて、食道癌組織と正常食道組織のホルマリン固定パラフィン包埋組織における KGFR タンパクの局在を検討した。また、連続切片上で細胞増殖マーカーである Ki-67 を用いた染色を行ない、比較検討したところ、KGFR タンパクの局在は癌真珠の中心部に向かうほど豊富にみとめられた。食道癌組織における KGFR の発現は腫瘍の分化度と有意な相関がみとめられた。ligand である KGF の発現はリンパ管侵襲、リンパ節転移と有意な相関がみとめられた。

実験結果と食道癌の組織型・肉眼型・深達度・リンパ節転移などの臨床病理学的所見、および予後とを比較検討したところ、KGFR は肉眼型と、KGF はリンパ管浸襲およびリンパ節転移と有意な相関があったが、いずれも予後との関連は認めなかった。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 当科における外科医主導の大腸癌化学療法. 吉野 雅則他, 第 63 回日本消化器外科学会総会, 2008 年 7 月

(2) 消化管癌における keratinocyte growth factor receptor (KGFR) の発現と局在の意義, 吉野 雅則, 第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009 年 4 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 雅則 (YOSHINO MASANORI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10343609

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：