

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：平成 21 年度～平成 22 年度

課題番号：21870026

研究課題名（和文）食道癌における細胞間接着因子カドヘリンの本質的な役割と新規抗癌剤としての可能性

研究課題名（英文）Essential role of Cadherin family in esophageal cancer and Potential for a novel molecule of targeted therapy

研究代表者

野間 和広 (NOMA KAZUHIRO)

岡山大学・医療教育統合開発センター・助教

研究者番号：10534761

研究成果の概要（和文）：

本研究においては、食道癌細胞（Barrett 食道癌、扁平上皮癌）の転移・接着・浸潤に強く関与する cadherin family の発現パターンを解析し、N-cadherin の Tumor microenvironment に対する関係性を解明する。また N-cadherin の働きを阻害することにより全く新しいアプローチとしての分子標的治療法の開発を目指す。まず、Barrett 食道癌および扁平上皮癌の切除標本における cadherin 発現パターンを E-cad および N-cad の免疫染色にて確認した。3/10 例の症例において N-cad の発現を認め、粘膜下層への浸潤のある症例においては特に腫瘍先端部での発現傾向を認めた。しかし E-cad の発現の減少は認めなかった。食道癌細胞株においては、TE4、10 の 2 種の癌細胞に N-cad の発現を認めた。Collagen I および TGF β 1 にて刺激すると発現の増加は認められたが、元々発現のない細胞株においては発現をとらえることができなかった。しかしながら、刺激された細胞は形態的に変化を認め EMT を誘導されている可能性があると考えられた。また我々は、血清鉄の減少が EMT を阻害するという過去の報告を踏まえ、in vivo にて経口血清鉄を制御しまた in vitro では鉄キレート剤を用い、食道癌において抗腫瘍効果を確認した。その際に N-cad の減少を認め癌細胞の遊走能、浸潤能の低下を確認した。食道癌において N-cad が腫瘍増殖および癌の浸潤における重要な分子である可能性を示唆した。現在 siRNA を用いて N-cad を制御した細胞を用いることによる再現実験を行っている段階である。今後としては、N-cad 阻害剤を用いて新規集学的治療法の検討を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：

In this research, our purpose is the analysis of cadherin family in esophageal carcinogenesis and to clarify the relation of N-cadherin and tumor microenvironment. In addition, a new molecular target therapy was aimed as a completely new approach by inhibiting the action of N-cad. First, we confirmed that 3/10 cases in Barrett's cancer expressed N-cad, especially strong expression in leading edge of tumor invasion. In esophageal cancer cell lines, TE4 and 10 expressed N-cad. Stimulation of collagen I, and TGF β 1 on those cells lead to over-express N-cad, in the other side, no change in cells which originally not expressed N-cad. However, stimulated cells showed morphological changes, suggesting EMT may have been induced. We also investigated relation of iron control and

EMT through cadherins, based on the previous reports. We confirmed the antitumor effect of that in vivo and vitro. In vivo, we used iron deficient diet and, in vitro used iron chelator. In iron deficient conditions, N-cad expression was decreased in vitro, and the cells showed decreased those migration and invasion ability, suggesting that the possibility that N-cad is an important molecule in cancer invasion and tumor growth. Now we used siRNA-N-cad and reduced expression in cancer cells and would confirm the same phenomenon in esophageal cancer cells. As the future, we scheduled to consider a new multidisciplinary cancer therapy using N-cad inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,020,000	306,000	1,326,000
22年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,960,000	588,000	2,548,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：食道癌、N-cadherin、Barrett 食道癌、分子標的治療、Tumor microenvironment

1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的治療薬によって飛躍的に予後改善を認める癌腫も出てきている、一方で従来の抗癌剤治療に抗 VEGFR 抗体である Bevacizumab の併用により、より高い抗腫瘍効果が報告されて来ている。旧来からの抗癌剤のあり方から、腫瘍増殖環境（以下 Tumor microenvironment）を制御することでより抗腫瘍効果をあげる可能性を示唆している。そこで、我々は以前より食道癌進展における Tumor microenvironment に注目し分子標的となり得る Signal transduction の解析を行って来た。昨年、癌由来の TGF β により活性化した線維芽細胞：Myofibroblast（筋線維芽細胞）が VEGF をさらに産生することで癌細胞増殖に必須である微小血管網形成を促進することを解明し、また TGF β 受容体阻害により癌微小血管新生が抑制されることを現段階で明らかにした（[Noma K et al. Gastroenterology 2008](#)）。さらに Tumor microenvironment においては細胞間接着（以下 cell to cell contact）も重要視されて

おり、特に EMT(Epithelial mesenchymal transition)の際や、転移の過程で血管上皮に接着し浸潤して行く際に cadherin family は癌の性質に影響すると言われていた。代表的には正常上皮間接着を主な働きとする E-cadherin の発現減少や β -catenin の核内移行は、その悪性度に関与しているとの報告がある。また代わりに N-cadherin を発現する” Cadherin Switch” が癌の浸潤転移に関与しているとの報告もあり、我々は Preliminary な実験として Barrett 食道癌における E、N-cadherin の発現を免疫染色で解析した。特に腫瘍の先進部および増大傾向の強い辺縁部に、通常上皮には発現していないとされる N-cadherin の新たな発現を認めた。また食道癌、正常扁平上皮および線維芽細胞における cadherin の発現パターンを Western Blot にて解析した。E-cadherin の発現低下を示す細胞や、N-cadherin の発現を認める細胞を蛋白レベルで確認した。以上のことから、我々は食道癌の進行の過程や EMT において “Cadherin Switch” が起こり、直接的な間葉系細胞（線維芽細胞）

胞や血管上皮細胞)との相互作用を可能とし、癌の悪性度や浸潤転移に重要な役割を担っているのではないかと考えた。さらに N-cadherin の発現や機能を制御することが新規癌治療の可能性を持ち、特に旧来の癌細胞増殖制御を目的とした抗癌剤との併用でより高い治療効果を得られるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究においては、食道癌細胞 (Barrett 食道癌、扁平上皮癌) の転移・接着・浸潤に強く関与する cadherin family の発現パターンを解析し、“Cadherin Switch”により発現する N-cadherin の Tumor microenvironment に対する重要性を、新規開発 3次元モデルを用いて解明する。また N-cadherin の働きを阻害することにより旧来の細胞増殖抑制に主眼をおいた化学療法に全く新しいアプローチとしての分子標的治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

最初に食道癌細胞 (Barrett 食道癌、扁平上皮癌) の転移・接着・浸潤に強く関与すると考えられる cadherin family の発現パターンを解析しその癌進展における働きを明らかにし、さらに cadherin の働きを制御する事による新規抗がん治療の開発を目的とする。まず初年度は、切除標本および細胞株にて解析すし、さらに新規開発 3次元モデルを用いて“Cadherin Switch”により発現する N-cadherin の Tumor microenvironment に対する重要性を解明する。平成 22 年度は in vitro および in vivo モデルにて N-cadherin の働きを阻害することにより旧来の細胞増殖抑制に主眼をおいた化学療法に対する全く新しいアプローチとしての抗腫瘍効果について検討する。本研究では 2 年間で以下の項目を挙げ検討する。

P-1

Barrett 食道癌および食道扁平上皮癌の切除標本における cadherin 発現パターンの検討

P-2

Barrett 食道癌細胞株、扁平上皮癌細胞株における cadherin 発現パターンの検討

P-3

食道癌の cadherin を介して間葉系細胞との相互作用 (線維芽細胞、血管新生) の検討

P-4

E-, N-cadherin の発現制御または機能阻

害を用いた腫瘍増殖抑制効果の検討

P-5

N-cadherin 阻害剤を用いた新規集学的治療法の確立

4. 研究成果

(1) Barrett 食道癌および扁平上皮癌の切除標本における cadherin 発現パターンを E-cad および N-cad の免疫染色にて確認した。3/10 例の症例において N-cad の発現を認め、粘膜下層への浸潤のある症例においては特に腫瘍先端部での発現傾向を認めた。しかし E-cad の発現の減少は認めなかった。食道癌細胞株においては、TE4、10 の 2 種の癌細胞に N-cad の発現を認めた。Collagen I および TGF β 1 にて刺激すると発現の増加は認められたが、元々発現のない細胞株においては発現をとらえることができなかった。しかしながら、刺激された細胞は形態的に変化を認め EMT を誘導されている可能性があると考えられた。

(2) また我々は、血清鉄の減少が EMT を阻害するという過去の報告を踏まえ、in vivo にて経口血清鉄を制御しまた in vitro では鉄キレート剤を用い、食道癌において抗腫瘍効果を確認した。その際に N-cad の減少を認め癌細胞の遊走能、浸潤能の低下を確認した。食道癌において N-cad が腫瘍増殖および癌の浸潤における重要な分子である可能性を示唆した。

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 AACR, 2011/4/2~6, Iron deficiency suppressed EMT through down-regulation of N-cadherin in esophageal cancer. Seishi Nishitani, Kazuhiro Noma, Toshiyoshi Fujiwara, et al.

② AACR, 2010/4/17~21, Analysis of expression patterns of cadherins in esophageal squamous cell carcinoma and Barrett's adenocarcinoma and a therapeutic potential of cadherins as new target molecule. Seishi Nishitani, Kazuhiro Noma, Toshiyoshi Fujiwara, et al.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ges-okayama-u.com/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野間 和広 (NOMA KAZUHIRO)

岡山大学・医療教育統合開発センター・

助教

研究者番号：10534761