

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791298

研究課題名（和文）分子反応検索を併用した抗癌剤感受性試験に基づく食道癌テーラーメイド化学療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a tailor-made chemotherapy of esophageal cancer, based on chemosensitivity test combining search of molecular reaction.

研究代表者

木村聡元（KIMURA TOSHIMOTO）

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60508993

研究成果の概要（和文）：精度の高い感受性試験を開発することは癌化学療法において重要なことである。本研究では食道癌培養細胞を用い、薬剤刺激に対するシグナル伝達経路の分子反応モデルを作成し、新たな感受性予測法を確立することを試みた。まず、CDDP 添加による分子反応の解析を行ったが、反応経路が多岐にわたることが判明した。そこで正確な解析手法の確立を目的とし、大腸癌細胞株 HT29 を用い、抗ヒト EGFR モノクローナル抗体 cetuximab が EGFR シグナルに及ぼす影響をウェスタンブロッティングに加え、逆相タンパクライセートマイクロアレイを用い検証した。EGF における経時的なリン酸化タンパクの変動を定量的にモニタリングすることが可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：An accurate culture drug sensitivity test may redound to chemotherapy for cancer. In this study, we attempted to establish a new predicting system for drug sensitivity by monitoring molecular signaling pathways in esophageal cancer (ESC) cell line. We firstly evaluated cell signaling affected by CDDP, a key drug for ESC chemotherapy in ESC cell lines. However, it was difficult to interpret the behavior of examined molecules, because multiple pathways were intricately involved in CDDP stimulation. As more simple analysis object, we verified to monitor the detailed cell signaling affected by cetuximab in colorectal cancer cell line HT29 at the protein level using reversephase protein lysate microarrays, with the aim of establishing an accurate analysis, in addition to the conventional Western blotting. In EGF pathway, we were able to quantitative monitor by variation of dephosphorylated protein with time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：食道癌、化学療法、RPA、感受性試験

1. 研究開始当初の背景

食道癌は早期から全身病としての性格が強

く、手術・放射線療法などの局所療法のみでは制御不能な場合が多いため、全身療法としての化学療法が重要な役割を担っている。しかし、現在 5-FU、シスプラチン (CDDP)、ドセタキセルが食道癌治療の key drug であるが、その奏効率は低く、無効例では術前療法中に癌が増殖し切除不能となったり、薬剤の毒性から全身状態の悪化を招き後治療が困難となることもしばしば見られる。また奏効例でも数コース以内に耐性を生じてしまう場合がほとんどであり、鋭敏な感受性予測法の開発や新たな抗癌剤治療の確立が重要である。従来の抗癌剤感受性試験の真陰性率は比較的高く無効薬剤を除外する検査としての有用性は高いが、真陽性率は低く必ずしも有効な薬剤の選択肢を示すに至っていない。これは生体内の腫瘍組織への薬剤の到達度や薬剤分解速度、癌に対する免疫力などが臨床経過と関連しているほかに、癌細胞は生体から離れた時点から細胞死の方向へ傾くため、試験期間中 (48-72 時間) の細胞死が薬剤による影響かどうかの判定も困難であることも大きな要因である。しかし、薬剤に対する分子反応は細胞の種類はもとより、時間や環境などの複数の因子によって変化し、また多数の分子群が複雑なネットワークを形成しているため、一時点での発現状況の比較ではその同定は困難であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、既存の感受性試験・感受性予測因子の同定法の問題点を克服するため、生体から採取された癌細胞の薬剤投与後の細胞死の程度のみでなく、早期の細胞死に関連するシグナル伝達経路上の分子群の反応を網羅的かつ経時・定量的に解析する。

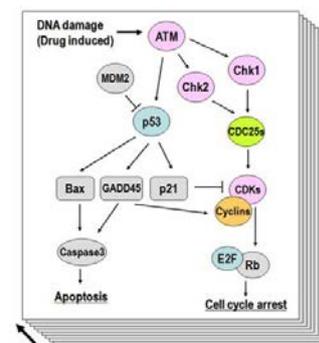
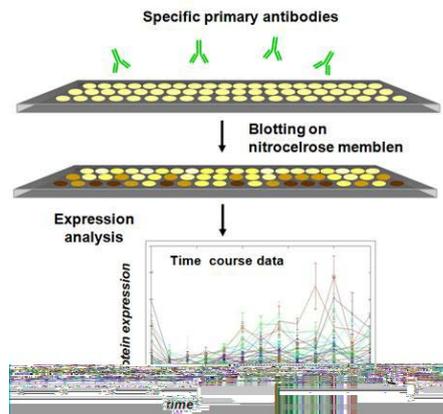
まず、食道癌培養細胞株における薬剤刺激に対する既知のシグナル伝達経路上の分子群の蛋白発現変動解析から、感受性の異なる細胞株に対する各薬剤刺激による分子反応がどのように異なるかを検討し、培養細胞における分子反応モデルを作成する。

次に患者から得られた癌細胞に対し抗癌剤感受性試験を行うが、同時に個々の薬剤に対する分子反応を解析し、培養細胞モデルと比較検討する。さらに抗癌剤治療による臨床的な抗腫瘍効果と解析結果から得られたデータとを比較し、「薬剤刺激に対する分子反応からの感受性予測法」の臨床的有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

① 食道癌培養細胞 10 株における 20 種の薬剤刺激による発育阻止の程度とシグナル伝達経路上の分子群の動的な反応を、逆相

蛋白ライセートアレイを用い網羅的に解析し、細胞株ごと・薬剤ごとの、薬剤刺激に対する感受性の違いによる分子反応の差異を見出しモデル化する。



分子反応は細胞の種類はもとより、時間や環境などの複数の因子によって変化する。また、反応する分子の種類が少数であることはむしろ稀で、多数の分子群

が複雑なネットワークを形成している。様々な因子について詳細かつ定量的に観察することは、必要となるサンプル数が膨大となることから技術的に困難とされてきた。本システムの原理はマイクロスケールのドットウェスタンブロットであるが、従来の転写産物の解析を目的としたマイクロアレイとは異なり、サンプルライセートをプリントし、特異的の一次抗体を用いて目的の蛋白質の相対的な量を検出する。2 万以上の蛋白ライセートスポットを 1 枚のスライド上で処理が可能であり、蛋白質の分子反応ネットワークを経時・定量的にモニタリングすることに特化したシステムである。

② 患者サンプルから抗癌剤感受性試験を行うとともに、同検体から薬剤刺激に対する早期 (24 時間以内) の分子反応を培養細胞実験と同様に解析する。感受性試験結果・培養細胞における分子モデルのパターンとの比較から有効抗癌剤の判定を行う。

③ 実際に投与された抗癌剤の臨床効果と感受性試験結果・分子反応の感受性パターンを比較し、生体から採取後の環境変化に伴う影響を減少させる「薬剤刺激に対する早期分子反応からの感受性予測法」の臨床的な有効性を評価する。



を大腸癌培養細胞に変更し、発現解析分子をEGFR経路上の分子にしぼり検討したが、パスウェイの分子反応モニタリングは可能であることを示した。

今後食道癌細胞を含めた消化器癌細胞における解析を継続し、種々の薬剤の各シグナル伝達経路の分子反応モデルを作成・統合することにより、各細胞の薬剤刺激分子反応マップを作成し、生体から得られた細胞の薬剤反応との比較を試みる。

#### 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)

Shioi Y, Hasegawa T, Otsuka K, Fujisawa K, Itabashi T, Kimura T, Wakabayashi G, Mue Y, Uesugi N, Sugai T ;Primary retractoritoneal spindle cell liposarcoma: pathological and immunohistochemical findings. ; Pathol Int. 60(6):472-6. 2010 Jun

木村聡元, 岩谷岳, 木村祐輔, 野田芳範, 御供真吾, 高橋正統, 肥田圭介, 佐々木章, 上杉憲幸, 若林剛; アカラシア術後に発生した食道癌の2例: 岩手医学雑誌 63 巻 1 号 Page57-62, 2011.04

[学会発表] (計5件)

岩谷岳, 木村祐輔, 野田芳範, 御供真吾, 木村聡元, 遠藤史隆, 鴻巣正史, 肥田圭介, 佐々木章, 若林剛: 高度リンパ節転移を有するStage III/IV食道癌に対するDocetaxel/CDDP/5FU療法の検討: 65回日本消化器外科学会総会、山口、2010年

加藤久仁之, 大塚幸喜, 板橋哲也, 箱崎将規, 木村聡元, 木村祐輔, 新田浩幸, 肥田圭介, 佐々木章, 若林剛: 大腸癌におけるL1 cell adhesion molecule異常発現に関わる、遺伝子プロモーター領域のメチル化状態解析: 66回日本消化器外科学会総会、大阪2011年

高橋和宏, 木村聡元, 小谷康慈, 前沢千早, 時田智子, 増田友之: 悪性黒色腫におけるSOCS3遺伝子のメチル化解析: 第110回日本皮膚科学会総会、2011年

木村聡元, 大塚幸喜, 板橋哲也, 加藤久仁之, 箱崎将規, 藤澤健太郎, 若林剛: 大腸癌遠隔および主リンパ節再発に対し摘出術を施行した5例: 第26回東北大腸癌研究会、盛岡、2011年

板橋哲也, 大塚幸喜, 箱崎将規, 加藤久仁之, 木村聡元, 藤澤健太郎, 若林剛: 当科におけるStageIV腹膜播種の治療成績: 第66回日本大腸肛門病学会学術集会、東京、2011

[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◇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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

( )

研究者番号:

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: