

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590923

研究課題名(和文) 消化器癌に対するHB-EGF-CTFを標的とした新規治療法とバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of HB-EGF-CTF related therapy and biomarker for gastrointestinal cancer

研究代表者

志村 貴也 (Shimura, Takaya)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90405192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS野生型の切除不能進行再発大腸癌に対する抗EGFR抗体療法において、大腸癌組織内のHB-EGF-CTFの局在と抗腫瘍効果との関連はみとめなかったが、HB-EGFの発現が治療効果予測に有用であることを示した (Yoshida M, Shimura T, et al. J Cancer Res Clin Oncol.2013: 367-78)。
HB-EGF-CTFの核移行を制御する機能をもつADAM12の尿中濃度と胃癌組織発現が、胃癌の早期診断に有用であることを示した (Shimura T, et al. Cancer Prev Res. 2015:240-248)。

研究成果の概要(英文)：HB-EGF expression, not intracellular localization of HB-EGF-CTF, in the tumor was one of the predictive factor for anti-EGFR therapy against KRAS wild type metastatic colorectal cancer, as well as other EGFR ligands including amphiregulin, TGF- α , epiregulin (Yoshida M, Shimura T, et al. J Cancer Res Clin Oncol.2013: 367-78).
Urinary level and tumor expression of ADAM12, which regulates HB-EGF-CTF nuclear translocation, is a useful biomarker for early diagnosis of gastric cancer (Yoshida M, Shimura T, et al. J Cancer Res Clin Oncol.2013: 367-78).

研究分野：消化器内科

キーワード：HB-EGF 胃癌 大腸癌 EGFR

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに EGF ファミリーの一つである HB-EGF や Amphiregulin (AR) が EGFR のリガンドとしての機能のみならず、細胞外ドメインが切断された後に残された細胞内ドメイン (CTF) が細胞膜から核内へ移行し胃癌の増殖や浸潤・抗がん剤の感受性に関わる可能性があることを基礎研究にて報告してきた (Shimura T, et al. Clin Cancer Res. 2008 Jun 15; 14(12):3956-65) (Yoshida M, et al. Cancer Sci. 2012 Apr; 103(4):708-15)。

EGFR 阻害薬はすでに様々な癌治療に応用されているが、申請者らは胃癌のように EGFR が発現しているにもかかわらず Cetuximab や Gefitinib などの EGFR 阻害剤の臨床効果が乏しい癌種では、EGFR だけでなく CTF シグナルをも抑制することが重要ではないかと考えているが、詳細なメカニズムや臨床的意義に関しては不明である。

以上のことから HB-EGF や AR などの EGF ファミリーは EGFR のリガンドとしての機能だけでなく、細胞内でのユニークな機能も備えており、それらの核内移行からはじまるシグナルを標的とした治療法や診断法の開発は理にかなった方法論であると考えられるが過去にその報告はない。

2. 研究の目的

EGF ファミリー特に HB-EGF の核内移行を標的とした胃癌および大腸癌の治療法ならびにバイオマーカーの開発のため、基礎的・臨床的検討を行う。

(1)大腸癌

切除不能進行大腸癌に対して Cetuximab や Panitumumab といった抗 EGFR 抗体薬が臨床的に使用されているが、これらの薬剤は KRAS 遺伝子に変異がある大腸癌に対しては臨床的効果を示さないことがわかっている。さらに KRAS 野生型の症例のなかでも一部の症例に

のみ効果を示すにすぎないため、抗 EGFR 抗体の治療効果予測因子を発見することは、無駄な副作用を減らすことや医療経済的にも大変重要な課題である。過去の我々の胃癌の検討において、HB-EGF-CTF の核移行が多くみられる症例においては EGFR シグナル伝達経路を抑制するだけでは抗腫瘍効果としては弱いことがわかっていることから、今回大腸癌における抗 EGFR 抗体薬に対する治療予測バイオマーカーとしての有用性を検討した。

(2)胃癌

HB-EGF-CTF の核移行により胃癌細胞の増殖や浸潤が増殖するメカニズムを探る。

胃癌に対して、HB-EGF-CTF およびその関連タンパクのバイオマーカーとしての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1)大腸癌

申請者の所属する施設において、抗 EGFR 抗体薬を使用した切除不能 KRAS 野生型大腸癌患者のヒト大腸癌組織を集積し、抗 HB-EGF-CTF 抗体による免疫組織化学染色を行い臨床病理学的に検討した。さらにすべての EGFR リガンドについても免疫組織化学染色を施行し、バイオマーカーとしての有用性を検討した。

(2)胃癌

野生型 HB-EGF (Wt-HB-EGF) と HB-EGF の C 末端側を変異させ核移行能を欠失させた HB-EGF (HB-EGF-mC) を強制発現させた胃癌細胞株を使用し、HB-EGF-CTF の核移行に伴う胃癌細胞の影響に及ぼすメカニズムを探る。

当院ならびに関連施設において胃癌と診断された患者ならびに健常者からの検体を使用しバイオマーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

(1)大腸癌

切除不能 KRAS 野生型大腸癌組織を使用した

臨床病理学的検討において、HB-EGFの局在と抗EGFR抗体の抗腫瘍効果との関連は認められなかった。しかしながら、局在に関わらずHB-EGFの発現そのものとの抗腫瘍効果の相関を認めた。他の6種類のEGFRリガンドすべてに対しての免疫染色を施行したところ、HB-EGF以外にもAR, TGF- β , Epiregulinが発現している大腸癌は抗EGFR抗体薬により有意な奏効率の上昇と無再発生存期間の延長をみとめた。さらにこれらの有意な4種類のEGFRリガンド(HB-EGF, AR, TGF- β , Epiregulin)のうち2種類以上のリガンドが発現しているものは奏効率:53%に対して、1種類以下のものでは奏効率:0%と抗EGFR抗体薬の奏効率に著明な差をみとめた。これらのことから4つのEGFRリガンド中、2種類以上の発現例を抽出する、免疫染色による解析法はKRAS野生型大腸癌に対する抗EGFR抗体療法におけるバイオマーカーとして有用であると考えられた(Yoshida M, Shimura T, et al. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Mar;139(3):367-78)。

(2)胃癌

HB-EGF-CTFが核移行するWt-HB-EGF発現胃癌細胞株と、核移行しないHB-EGF-mC発現胃癌細胞株を使用し、網羅的解析を行いHB-EGF-CTFの核移行に伴う因子を複数同定した。それらに対し、胃癌細胞増殖・浸潤におけるそれらの意義を検討した。

ADAM12により膜結合型のproHB-EGFが切断される事により、N末端側は分泌型のHB-EGFとなりEGFRのリガンドとして作用し、C末端側のHB-EGF-CTFは核へ移行する。つまりHB-EGF-CTFの核移行を起点とするシグナルはADAM12により制御されている。

胃癌切除標本を使用した免疫組織化学的検討において、ADAM12は正常組織に比べ胃癌組織に多く発現している事を見出した。また健康者と胃癌患者の尿検体を調べたところ、健康者に比べ胃癌患者において尿中ADAM12が

有意に上昇し、胃癌診断のバイオマーカーとして有用であることを見出した(Shimura T, et al. *Cancer Prev Res*. 2015 Mar;8(3):240-8)。

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12件)

1. Yamada T, Shimura T, Joh T (他7名, 1・2番目 (Corresponding author)). Subset Analysis of a Multicenter, Randomized Controlled Trial to Compare Magnifying Chromoendoscopy with Endoscopic Ultrasonography for Stage Diagnosis of Early Stage Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2015 Aug 13;10(8):e0134942. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0134942.
2. Ebi M, Shimura T, Joh T (他12名, 1・2番目 (Corresponding author)). Multicenter, prospective trial of white-light imaging alone versus white-light imaging followed by magnifying endoscopy with narrow-band imaging for the real-time imaging and diagnosis of invasion depth in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Gastrointest Endosc*. 2015 Jun;81(6):1355-1361. 査読有 doi: 10.1016/j.gie.2014.11.015.
3. Shimura T, Ebi M, Moses MA (他5名, 1・2番目). Urinary ADAM12 and MMP-9/NGAL Complex Detect the Presence of Gastric Cancer. *Cancer Prev Res* 2015 March 8:240-248. 査読有 doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0229.
4. Tsukamoto H, Mizoshita T, Shimura T, (他10名, 7番目). Preventive effect of rebamipide on

- N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2015 Mar; 67(3): 271-7. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0134942.
5. **Ebi M, Shimura T, Joh T (他 10 名, 1・2 番目 (Corresponding author))**. Management of systolic blood pressure after endoscopic submucosal dissection is crucial for prevention of post-ESD gastric bleeding. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014 May; 26(5):504-9. 査読有 doi: 10.1097/MEG.0000000000000072.
 6. **Shimura T, Ebi M, Joh T (他 7 名, 1・2 番目 (Corresponding author))**. Magnifying Chromoendoscopy and Endoscopic Ultrasonography Measure Invasion Depth of Early-Stage Colorectal Cancer with Equal Accuracy, Based on a Prospective Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Apr; 12(4):662-668.e2. 査読有 doi: 10.1016/j.cgh.2013.06.022.
 7. Tsukamoto H, Tanida S, **Shimura T (他 9 名, 6 番目)**. Annexin A2 Regulates A Disintegrin and Metalloproteinase 17-mediated Ectodomain Shedding of Pro-Tumor Necrosis Factor- α in Monocytes and Colon Epithelial Cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Jun; 19(7):1365-73. 査読有 doi: 10.1097/MIB.0b013e318281f43a.
 8. Tsukamoto H, Tanida S, **Shimura T (他 7 名, 6 番目)**. Infliximab salvage therapy for patients with ulcerative colitis who failed to respond to tacrolimus. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jun; 25(6):714-8. 査読有 doi: 10.1097/MEG.0b013e318281f43a.
 9. Iwasaki H, **Shimura T, Joh T (他 8 名, 2 番目 (Corresponding author))**. Novel Nasogastric Tube-Related Criteria for Urgent Endoscopy in Nonvariceal Upper Gastrointestinal Bleeding. *Dig Dis Sci*. 2013 May 22. 査読有 doi: 10.1007/s10620-013-2706-x.
 10. Yamada T, **Shimura T, Joh T (他 8 名, 2 番目 (Corresponding author))**. Preoperative drainage using a transanal tube enables elective laparoscopic colectomy for obstructive distal colorectal cancer. *Endoscopy*. 2013 Apr; 45(4):265-71. 査読有 doi: 10.1055/s-0032-1326030.
 11. **Yoshida M, Shimura T, Joh T (他 4 名, 1・2 番目 (Corresponding author))**. A novel predictive strategy by immunohistochemical analysis of four EGFR ligands in metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR antibodies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Mar; 139(3):367-78. 査読有 doi: 10.1007/s00432-012-1340-x.
 12. Ozeki K, Tanida S, **Shimura T, Joh T (他 9 名, 7 番目)**. Telmisartan Inhibits Cell Proliferation by Blocking Nuclear Translocation of ProHB-EGF C-Terminal Fragment in Colon Cancer Cells. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56770. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0056770.
- [学会発表](計 6 件)
1. **Shimura T, Ebi M, Moses MA (他 5 名, 1 番目)**. Urinary ADAM12 and MMP-9/NGAL complex detect the presence of gastric cancer. Lecture Presentation, DDW2015, May 16, 2015, Washington DC (USA)

2. **Shimura T, Ebi M**, Moses MA (他4名, 1番目). Potential of urinary MMP-9/NGAL complex as a novel non-invasive biomarker for the early detection of gastric cancer. Poster Presentation, AACR Annual Meeting 2014, April 6, 2014, San Diego (USA)
3. **Ebi M, Shimura T**, Yamada T (他7名, 1・2番目). Multicenter, Prospective, Comparative Trial of magnifying chromoendoscopy and endoscopic ultrasonography for stage diagnosis of early colorectal cancer. Oral Presentation, 21th UEG Week Berlin 2013, October 15, 2013, Berlin (German)
4. **Yoshida M, Shimura T, Ebi M** (他4名, 1・2・4番目). A promising strategy for predictive marker by immunohistochemical analysis of four EGFR ligands in anti-EGFR antibody for metastatic colorectal cancer. Poster Presentation, 20th UEGW, October 24, 2012, Amsterdam (Netherlands)
5. **吉田道弘, 志村貴也, 海老正秀** (他3名, 1・2・3番目). 大腸癌抗EGFR抗体療法の効果予測における4種類のEGFRリガンド (AR, HB-EGF, TGF- α , EREG)解析の有用性. シンポジウム8: 切除不能大腸癌の化学療法, 第99回日本消化器病学会総会, 2013年3月21-23日 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)
6. **Yoshida M, Shimura T, Ebi M** (他3名, 1・2・4番目). A novel predictive strategy by immunohistochemical analysis of four EGFR ligands in anti-EGFR antibody for mCRC. ポスター, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21日 ホテルロイトン札幌 (北海道・札幌市)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志村 貴也 (SHIMURA, Takaya)

名古屋市立大学・医学研究科・講師

研究者番号: 90405192

(2) 研究分担者

海老 正秀 (EBI, Masahide)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40611629

吉田 道弘 (YOSHIDA, Michihiro)

名古屋市立大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 20636328

(3) 連携研究者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA, Shigeki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60202272