

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460419

研究課題名(和文)食道癌におけるカンナビノイド受容体の機能解明と治療応用

研究課題名(英文)Functional analysis and therapeutic application of cannabinoid receptor in esophageal carcinoma.

研究代表者

泥谷 直樹(Hijiya, Naoki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80305036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌症例においてカンナビノイド受容体(CB1R)の過剰発現が診断マーカーとなり得ることをみつけた。CB1Rの過剰発現は88症例中54症例で認められた。CB1Rの過剰発現は上皮内癌および浸潤癌のいずれにも同程度に認められ、リンパ節及び遠隔臓器への転移と有意に相関していた。さらに、多変量解析によりCB1Rの過剰発現は独立した予後予測因子であった。食道癌細胞株を用いた機能解析から、CB1Rの過剰発現は増殖能の亢進に關与していることが示唆された。本研究から、生検組織を用いたCB1Rの免疫組織化学は転移および予後の予測に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I found that overexpression of cannabinoid receptor 1 (CB1R) was applicable as a marker for prediction of metastasis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). CB1R overexpression was detected immunohistochemically in 54 of 88 cases (61.4%). The intensity of CB1R expression was uniform in both intraepithelial and invasive regions in each case, and was significantly correlated with the status of metastasis to lymph nodes and distant organs. Furthermore, multivariate analysis revealed that CB1R overexpression was independently associated with poor prognosis. Biological analysis of CB1R overexpression using ESCC cell lines revealed that CB1R activation appeared to promote cell proliferation. On the basis of these findings, I propose that evaluation of CB1R expression status in biopsy specimens of ESCC using immunohistochemistry might be clinically useful for prediction of metastasis to lymph nodes and distant organs.

研究分野：医学

キーワード：カンナビノイド受容体 食道扁平上皮癌 転移予測因子 予後予測因子 細胞増殖

### 1. 研究開始当初の背景

食道癌は予後不良な癌のひとつである。手術療法に加えて、進行癌には化学・放射線療法が適用されるが、予後の大幅な改善には至っていない。その原因として、有効な抗癌剤、特に分子標的薬の開発が進んでいないことが挙げられる。

内因性カンナビノイドの受容体分子 (Cannabinoid receptor 1: CB1R) は、主に中枢神経系で発現している G タンパク質共役型の受容体分子である。マリファナ様物質である内因性カンナビノイドと結合して鎮痛、多幸感等の精神神経反応を引き起こすことから、近年、慢性疼痛やうつ病の治療標的分子として研究が進められている。

最近、前立腺癌や膵癌、肝細胞癌、乳癌の一部の症例で CB1R の発現が亢進していることが報告された。興味深いことに、これらの癌腫のうち肝細胞癌では CB1R 発現が亢進している症例で予後が良好となるのに対し、膵癌では CB1R 発現亢進症例の予後が不良であることが示されている。このように、CB1R の発現動態と予後の関連性は癌腫によってまったく異なっていることから、CB1R の機能的役割もそれぞれの癌腫によって異なることが予想される。

私は本研究で、食道癌における CB1R 発現を免疫組織化学により調べ、臨床病理学的所見との相関を調べた。

### 2. 研究の目的

本研究は、食道癌における CB1R 発現動態を調べ、臨床病理学的意義および機能的意義を明らかにして、CB1R 分子の食道癌への診断・治療応用を目指すものがある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 食道癌における CB1R の発現解析

大分大学医学部附属病院で外科的切除された食道癌 88 症例について、CB1R 抗体を用いた免疫組織化学を施行して、CB1R の発現動態を調べる。さらに、ヒト食道癌細胞株についてもウェスタンブロット法で、CB1R 発現動態を調べる。

#### (2) 食道癌における CB1R 発現の臨床病理学的意義の検討

各症例の CB1R 発現と、臨床病理学的所見を比較することで、食道癌における CB1R 発現の意義を検討する。

#### (3) 食道癌細胞における CB1R 発現の機能的意義の解明

食道癌細胞における CB1R の発現異常が細胞形質 (増殖、生存、運動、浸潤等) にどのような影響を与えているのかを調べる。具体的には、CB1R の発現が亢進している細胞には、特異的阻害剤を添加して、CB1R の関与するシグナルパスウェイを抑制する。反対に、発現が低下している細胞には、レンチウイルスベクターを用いて強制発現させてみる。

### 4. 研究成果

#### (1) 食道癌では CB1R の発現が亢進している

食道癌 88 症例のうち 54 症例 (61.4%) で癌組織に特異的な CB1R 陽性所見を認めた (図 1)。

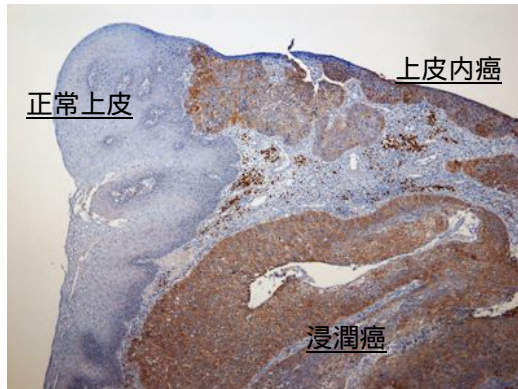


図 1 食道癌の CB1R の免疫組織化学

各々の CB1R 陽性症例において、CB1R は均一に発現しており、表層部の癌と深部の癌に発現強度の違いはなかった。これは、生検で表層部の癌組織を採取してその CB1R 発現を調べることで、その症例の CB1R 発現動態を判定できることを意味する。

#### (2) 食道癌における CB1R 発現亢進は、リンパ節および遠隔臓器への転移と有意に相関する

CB1R の発現が亢進している症例は有意にリンパ節転移 ( $p = 0.046$ ) および遠隔転移 ( $p = 0.047$ ) の合併率が高かった。したがって、CB1R はリンパ節転移および遠隔転移の診断予測マーカーとなり得ることが示唆された。

#### (3) CB1R の発現が亢進している症例は予後不良である

CB1R の発現が亢進している症例は有意に予後不良であった (図 2)。

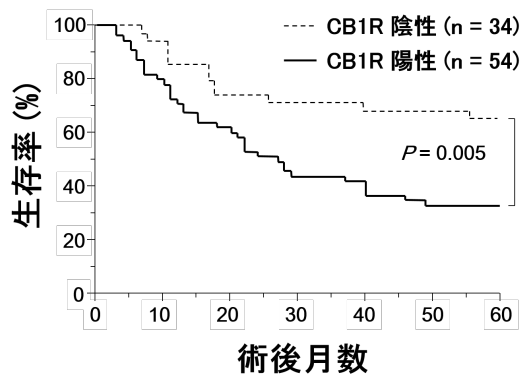


図 2 食道癌症例の生存曲線

さらに、多変量解析の結果、CB1R 発現亢進 ( $p = 0.019$ ) は、癌の深達度 ( $p = 0.018$ ) とリンパ節転移 ( $p < 0.001$ ) とともに、独立した予後不良因子であった。

#### (4) CB1R の発現亢進は食道癌細胞の増殖に寄与する

CB1R を過剰発現しているヒト食道癌細胞株に CB1R の特異的阻害剤である AM251 を添加すると、著明に増殖能が抑制された (図 3)。食道癌では、CB1R を介したシグナルパスウェイの活性化は増殖能亢進をもたらすことが示唆された。

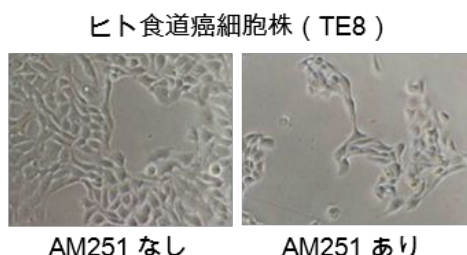


図 3 CB1R 阻害剤(AM251)による増殖抑制

近年、癌患者の疼痛緩和治療として、CB1R のリガンドであるマリファナ製剤の投与が提唱されている。CB1R の活性化は、癌腫 (前立腺癌やマンツルリンパ腫、大腸癌など) によっては増殖抑制に働くとの報告がある。したがってそれらの癌を発症している患者に対しては、マリファナ製剤の投与は疼痛治療に加えて、抗腫瘍効果も期待できる有効な治療法となりえる。しかしながら食道癌患者への投与については、今回の結果から、癌の増殖を亢進させる可能性があることを留意すべきである。

#### 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 11 件)

Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung NL, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Shirao K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M. Genomic loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma. *Cancer Res.* 査読有 2016 76(9) in press doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1846

Matsumoto S, Mori H, Kiyonaga M, Yamada Y, Takaji R, Sato F, Mimata H, Hijiya N, Moriyama M, Tanoue R, Tomonari K, Matsumoto T, Hasebe T. Perirenal lymphatic systems: Evaluation using spectral presaturation with inversion recovery T(2)-weighted MR images with 3D volume isotropic turbo spin-echo acquisition at 3.0T. *J Magn Reson Imaging.* 査読有 2016 Mar 23. doi: 10.1002/jmri.25244.

Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, Tokunaga A, Nakada C, Uchida T, Daa T, Iha H, Takahashi M, Nomura T, Sato F, Mimata H, Ikawa M, Seto M, Matsuura K, Moriyama M.

Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway. *J Pathol.* 査読有 2016 May;239(1):97-108. doi: 10.1002/path.4706.

Takahashi M, Tsukamoto Y, Kai T, Tokunaga A, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Daa T, Nomura T, Sato F, Mimata H, Matsuura K, Moriyama M. Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 査読有 2016 Apr;107(4):417-23. doi: 10.1111/cas.12892.

Tsukamoto Y, Fumoto S, Noguchi T, Yanagihara K, Hirashita Y, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Matsuura K, Hamanaka R, Murakami K, Seto M, Inomata M, Moriyama M. Expression of DDX27 contributes to colony-forming ability of gastric cancer cells and correlates with poor prognosis in gastric cancer. *Am J Cancer Res.* 査読有 2015 Sep 15;5(10):2998-3014. eCollection 2015.

Narimatsu T, Matsuura K, Nakada C, Tsukamoto Y, Hijiya N, Kai T, Inoue T, Uchida T, Nomura T, Sato F, Seto M, Takeuchi I, Mimata H, Moriyama M. Downregulation of NDUF6 due to 9p24.1-p13.3 loss is implicated in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Med.* 査読有 2015 Jan;4(1):112-24. doi: 10.1002/cam4.351.

Kiyonaga M, Matsumoto S, Mori H, Yamada Y, Takaji R, Hijiya N, Yoshizumi F, Aramaki M. Pancreatic neuroendocrine tumor with extensive intraductal invasion of the main pancreatic duct: a case report. *JOP.* 査読有 2014 Sep 28;15(5):497-500. doi: 10.6092/1590-8577/2741.

Kai K, Nasu K, Kawano Y, Aoyagi Y, Tsukamoto Y, Hijiya N, Abe W, Okamoto M, Moriyama M, Narahara H. Death receptor 6 is epigenetically silenced by histone deacetylation in endometriosis and promotes the pathogenesis of endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 査読有 2013 Dec;70(6):485-96. doi: 10.1111/aji.12155.

Kawano Y, Nasu K, Hijiya N, Tsukamoto Y, Amada K, Abe W, Kai K, Moriyama M, Narahara H. CCAAT/enhancer-binding protein is epigenetically silenced by histone deacetylation in endometriosis and promotes the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 査読有 2013 Sep;98(9):E1474-82. doi: 10.1210/jc.2013-1608.

Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N,

Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M. Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. PLoS One. 査読有 2013;8(2):e56165. doi: 10.1371/journal.pone.0056165.

Matsuo M, Nakada C, Tsukamoto Y, Noguchi T, Uchida T, Hiijiya N, Matsuura K, Moriyama M. MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2. Mol Cancer. 査読有 2013 Feb 25;12:15. doi: 10.1186/1476-4598-12-15.

〔学会発表〕(計 8件)

泥谷 直樹、腭上皮内癌が浸潤性腺癌へ形質転換するメカニズムの解明、第 53 回日本臨床分子医学会学術集会、平成 28 年 4 月 15 日、東京国際フォーラム(東京・千代田区)

清永 麻紀、森 宣、松本 俊郎、山田 康成、高司 亮、矢田 一宏、太田 正之、泥谷 直樹、守山 正胤、脾静脈に穿通し門脈系に粘液栓を形成した膵体部 IPMC の 1 例、第 51 回日本医学放射線学会秋季臨床大会、平成 27 年 10 月 2 日、いわて県民情報交流センター(岩手・盛岡市)

甲斐 友喜、松浦 恵子、泥谷 直樹、佐藤文憲、小林 隆志、守山 正胤、三股 浩光、腎細胞癌移植モデルにおいて SAV1 は TGF-pathway を抑制することで腫瘍増生を阻害する、第 103 回日本泌尿器科学会総会、平成 27 年 4 月 18 日、石川県立音楽堂(石川・金沢市)

甲斐 友喜、松浦 恵子、中田 知里、塚本善之、泥谷 直樹、佐藤 文憲、小林 隆志、三股 浩光、守山 正胤、ヒト腎細胞癌移植モデルにおいて SAV1 は腫瘍増殖を抑制する、第 73 回日本癌学会総会、平成 26 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

甲斐 友喜、松浦 恵子、泥谷 直樹、佐藤文憲、守山 正胤、三股 浩光、腎細胞癌移植モデルにおいて SAV1 遺伝子は腫瘍増殖を抑制する、第 102 回日本泌尿器科学会総会、平成 26 年 4 月 24 日、神戸国際会議場(兵庫・神戸市)

塚本 善之、松尾 光浩、中田 知里、野口剛、内田 智久、平下 有香、麓 祥一、藍澤 哲也、泥谷 直樹、松浦 恵子、守山 正胤、胃癌における miR-29c の発現機能解析、第 72 回日本癌学会総会、平成 25 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

奈須 家栄、泥谷 直樹、塚本 善之、守山 正胤、子宮内膜症における CCAAT/enhancer-binding protein(C/EBP) の発現はヒストン脱アセチル化により抑制され、病態形成に關与する、第 72 回日本癌学会総会、平成 25 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

高司 亮、松本 俊郎、清永 麻紀、山田

康成、森 宣、太田 正之、北野 正剛、泥谷 直樹、守山 正胤、中山 朋子、高木 一、福澤 謙吾、米増 博俊、転移性肝癌に随伴する MDCT 上の periportal low attenuation 病理所見との対比、第 49 回日本医学放射線学会秋季臨床大会抄録集、平成 25 年 10 月 12 日、名古屋国際会議場(愛知・名古屋市)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

泥谷 直樹(HIJIYA NAOKI)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：80305036

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：