

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861187

研究課題名(和文) 癌微小環境で産生されるMFG-E8を分子標的としら新規 抗腫瘍免疫療法の開発

研究課題名(英文) High levels of MFG-E8 through immunosuppressive effect may be a negative prognostic factor in esophageal cancer patients with preoperative chemotherapy.

研究代表者

柳本 喜智 (Yanagimoto, Yoshitomo)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70645085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌切除標本156例でのMFG-E8発現状況、その臨床病理学的意義、予後への影響を検討した。術前補助化学療法(NAC)施行例で有意に強発現例が多かった。NAC非施行例においてMFG-E8の発現強度と予後に相関はなかったが、NAC施行例ではMFG-E8強発現群で有意に予後が不良であった。食道癌NAC施行例においてはMFG-E8の強発現が予後不良をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of MFG-E8 in human esophageal squamous cell carcinoma and its influence on patient survival was investigated.

MFG-E8 expression of surgical tumor samples was examined by immunohistochemical staining in 156 cases of squamous cell esophageal carcinoma. Patients with strong MFG-E8 expression had a significantly higher rate of preoperative chemotherapy ($p < 0.0001$). The MFG-E8 expression level did not correlated with the clinical or pathological response to the preoperative chemotherapy. Additionally, in the group who received preoperative chemotherapy, there was significantly worse prognosis for patients with strong MFG-E8 expression ($p = 0.01$), however for patients without preoperative chemotherapy there was no difference in survival related to MFG-E8 expression. Strong MFG-E8 expression in esophageal cancer cells may be a negative prognostic factor in patients receiving preoperative chemotherapy.

研究分野：消化器外科

キーワード：MFG-E8 chemotherapy prognosis

1. 研究開始当初の背景

近年、癌細胞の増殖、分化、浸潤、転移を制御する因子として、微小環境を構成する線維芽細胞や血管内皮細胞などの“ニッチ”の重要性が判明している。その“ニッチ”の構成要素であるマクロファージは、以前から腫瘍内に存在することが明らかにされており、腫瘍の浸潤や転移に関連するとされている。

2011年、腫瘍内に浸潤するマクロファージから放出される分泌タンパク MFG-E8 (milk fat globule epidermal growth factor-) が癌細胞に作用し、特に癌幹細胞の維持に関与することが明らかになった (Junushi et al. PNAS, 2011)。元来、MFG-E8 はマクロファージから分泌され、貪食対象とするアポトーシス細胞を認識するためのシグナル因子として発見されたものである。しかし、癌組織内では MFG-E8 は全く別の機能をもつとされている。実際、MFG-E8 は癌細胞膜上の MFG-E8 受容体であるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ に結合し、Akt 経路や STAT3 経路を活性化させて抗アポトーシスに作用したり、Twist や Snail などの転写因子を介して EMT などを引き起こすといった報告もある。上記の報告によれば、マクロファージから分泌された MFG-E8 が癌幹細胞の維持に必須であり、この作用により造腫瘍能の上昇や抗癌剤に対する抵抗性を示すとされている。反対に、この MFG-E8 は非癌幹細胞には化学療法抵抗性は示さないことがわかっており、MFG-E8 は癌幹細胞にたいしてのみ化学療法耐性ニッチとして機能するとされている。さらに、抗 MFG-E8 抗体を抗癌剤や分子標的治療と併用することで、化学療法抵抗性ニッチが解除され、抗癌剤の効果が増強することが確認されており、今後臨床的に応用可能である有望な治療標的タンパクと期待される。

マクロファージや未分化な樹状細胞からの MFG-E8 の発現と働きが研究されているものの、癌細胞自身での MFG-E8 の発現は数種の癌でのみ報告されており、その発現意義も明らかではない。

2. 研究の目的

食道癌細胞での MFG-E8 発現状況をしらべ、その臨床病理学的意義、予後への影響、抗体治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 食道癌切除標本 156 例を使用し、免疫染色で MFG-E8 の発現状況を確認する。また発現強度と臨床病理学的因子との関係、予後との関係を検討する。術前補助化学療法 (NAC) 施行例に関しては MFG-E8 の発現状況と化学療法奏効率との関係の評価し、MFG-E8 の化学療法の腫瘍縮小効果への影響を評価した。

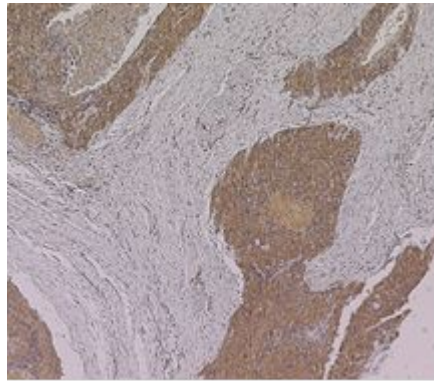
(2) 抗癌剤暴露と前後での MFG-E8 の発現を評価するため術前補助化学療法 (NAC) 施行例に関して、NAC 前生検検体と NAC 後の切除標本を使用し、MFG-E8 の発現変化を免疫染色で評価した。

(3) 抗癌剤投与と MFG-E8 発現との関係を検討するため、食道癌細胞株に各種抗癌剤を暴露し、MFG-E8 の発現変化を qRT-PCR 法で確認する。

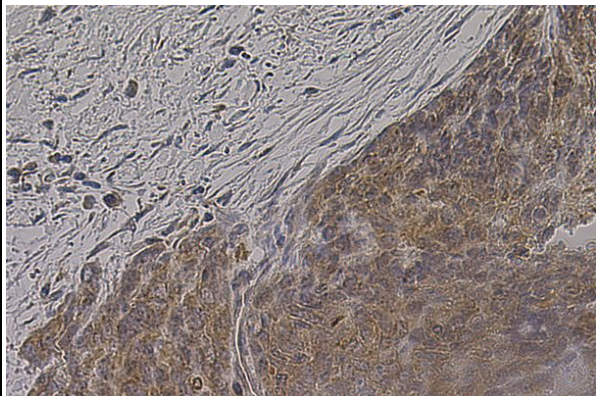
(4) MFG-E8 のがん細胞への直接作用を検討するため、食道癌細胞株に MFG-E8 の siRNA を導入し、増殖能、抗癌剤暴露時の増殖能を WST assay で評価する。

4. 研究成果

(1) 食道癌切除標本の免疫染色では 25% の症例に MFG-E8 強発現を認めた (Figure 1a, 1b)。強発現群では有意に男性の比率 ($p=0.042$)、Ce-Ut 症例の比率が高かった ($p=0.004$) 他、遠隔転移例の比率が高く ($p=0.002$)、有意に術前補助化学療法施行例が多いことが示され



食道癌細胞における MFG-E8 発現
(x40) Figure 1a



食道癌細胞における MFG-E8 発現
(x200) Figure 1b

た ($p<0.0001$) (Table 1)。全体 156 例での予後評価では MFG-E8 強発現で有意に overall survival (OS) が不良であった ($p=0.029$)。術前補助化学療法 (NAC) の有無で層別化した評価では、NAC 非施行例 72 例では MFG-E8 強発現例は 9.7% と低く、NAC 施行例では強発現例が 41.6% と高かった。予後評価では NAC 非施行例は MFG-E8 強発現群と弱発現群に OS の差がなかった ($p=0.78$) もの、NAC 施行例では MFG-E8 強発現群の OS が有意に不良であった ($p=0.01$)。

以上より食道癌細胞自体に MFG-E8 が発現し

	MFG-E8 strong Ⅲ以上 39例	MFG-E8 weak Ⅲ未滿 117例	P value
年齢 64以下/65以上	22/17	60/57	0.578
性別 男/女	37/2	97/20	0.042
占居部位Ce-Ut/Mt/Lt-Ae	10/11/13	10/62/42	0.004
深達度 T1-2/T3-4	15/24	41/76	0.700
リンパ節転移 N-/+	6/33	34/83	0.078
遠隔転移 M0/1	24/15	99/18	0.002
リンパ管侵襲 Ly-/+	8/31	19/98	0.547
脈管侵襲 V-/+	22/17	56/59	0.547
術前化学療法 +/-	7/32	65/52	<0.0001

食道癌細胞における MFG-E8 発現 (Table1)

ており、NAC 施行例ではその発現率が高いことが示された。また NAC 施行例では MFG-E8 強発現群の予後が有意に悪いことが示唆された。MFG-E8 発現と NAC の臨床学的効果、病理学的評価との関係性を評価したところ、両者とも有意な相関関係は認めなかった(table2)。この結果より化学療法の効果と MFG-E8 の発現強度には相関がないことが示された。

(2) NAC 前生検検体と NAC 後切除標本での MFG-E8 発現変化を免疫染色で比較したが、もともと heterogeneous に染まる特徴があり、組織量の少ない生検検体では染色最強部位の正確な評価が困難であった。

	MFG-E8 strong Ⅲ 35例	MFG-E8 weak Ⅲ未滿 49例	P value
臨床学的効果 SD-PD/CR-PR	12/23 (34.3%/ 65.7%)	25/24 (51.0%/49.0%)	0.12
組織学的効果 Grade0-1a/1b-3	26/9 (74.3%/25.7%)	35/14 (71.4%/28.6%)	0.77

食道癌細胞における MFG-E8 発現 (Table2)

(3) MFG-E8 食道癌細胞株での抗癌剤暴露実験では CDDP, DTX 暴露条件下で MFG-E8 発現が継続的に増強し、暴露後 72 時間後に発現が最高になっていることが示された (figure2)。

(4) 食道癌細胞株 TE8 の MFG-E8 を knock down した群と negative control 群で 24、48、72 時間後の増殖能に差はなく、抗癌剤暴露後 72 時間の生存率にも差を認めなかった (figure3a, b)。

以上より、食道癌では抗癌剤投与により MFG-E8 の発現が増強する可能性が示唆され、強発現群では OS が不良であることが示唆された。

抗癌剤暴露下MFG-E8発現変化 RT-PCR

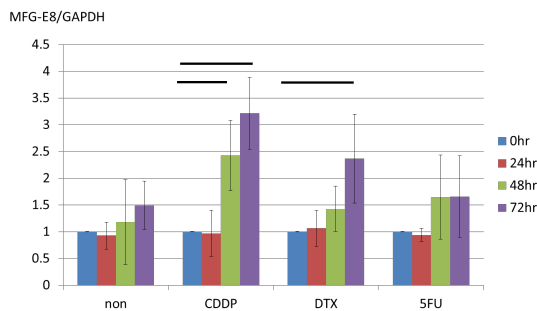


Figure2

TE8 proliferation assay

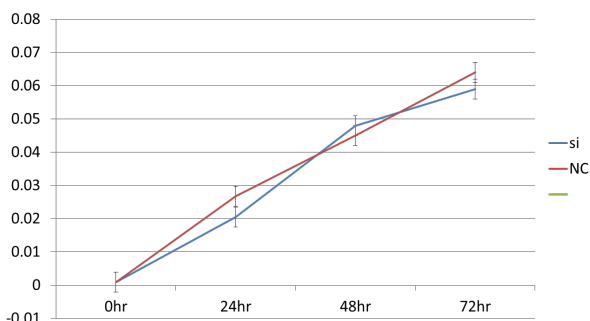


Figure3a

TE8 CDDP growth inhibition assay

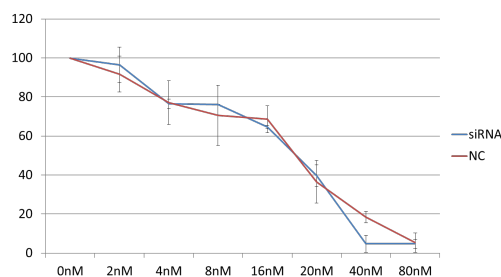


Figure3b

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 0 件)
- [学会発表] (計 0 件)
- [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

柳本喜智 (Yanagimoto Yoshitomo)
大阪大学医学部附属病院・医員
研究者番号：70645085

(2) 研究分担者

土岐祐一郎 (Doki Yuichiro)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20291445

瀧口修司 (Takiguchi Shuji)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：00301268

宮田博志 (Miyata Hiroshi)
大阪府立成人病センター・消化器外科・副部長
研究者番号：80362713

(3) 連携研究者

()

研究者番号：