

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460968

研究課題名(和文) がんの発生・進展におけるバイオマーカーとしてのインスリン様増殖因子の活性化

研究課題名(英文) Activation of insulin-like growth factor as a biomarker for cancer development and growth

研究代表者

宮本 心一 (Shin'ichi, Miyamoto)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90378761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはこれまでにインスリン様増殖因子(IGF)に対する中和抗体を用いて、治療標的としての有用性を証明してきた。われわれが使用した中和抗体は生理的な存在様式であるIGF-IGF結合蛋白質複合体には作用せず、腫瘍の微小環境で活性化されたIGFのみを中和し、全身的な副作用の軽減と腫瘍特異的な薬剤送達を期待する。抗体の投与量の設定、治療効果・副作用の予測には標的である活性型IGFの測定が不可欠と考え、血中の活性型IGFを評価する新たなアッセイ法を開発した。さらにこの方法を用いてインスリン産生腫瘍以外の腫瘍随伴症候群としての低血糖症においては活性型IGF-2が増加していることを証明した。

研究成果の概要(英文)：We have been reported the usefulness of insulin-like growth factor (IGF) as a therapeutic target using IGF neutralizing antibody. This antibody can neutralize only bioactive IGF activated in the tumor microenvironment and does not affect the physiological molecular form, IGF-IGF binding protein complex. This characteristics of antibody can lead to not only reduction of the systemic adverse effect but also tumor-specific drug delivery. It is essential for the accurate dosage adjustment and prediction of therapeutic and adverse effect to measure the level of bioactive IGF. We successfully develop the novel assay for the detection of bioactive IGF in the blood. Furthermore, we clarified that bioactive IGF-2 was elevated in a case of tumor-associated hypoglycemia except insulin-producing tumor using this assay.

研究分野：消化器内科

キーワード：インスリン様増殖因子 バイオマーカー 分子標的治療 非膵島細胞腫瘍性低血糖

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでにインスリン様増殖因子(IGF)に対する中和抗体を用いて、前立腺癌・多発性骨髄腫の骨転移、大腸癌肝転移、家族性大腸腺腫症のモデル動物を用いて IGF の治療標的としての有用性を証明してきた。われわれが使用した中和抗体は IGF 結合タンパクから遊離した、活性型 IGF のみを中和し、IGF 結合タンパクと結合した非活性型の IGF は中和できない。この特性により本抗体治療は全身的な副作用の軽減と腫瘍特異的なドラッグデリバリーを両立させる理想的な治療法といえる。しかしながら動物実験において目立った副作用を認めず、また低濃度のほうが腫瘍抑制効果が高い傾向が見られ、投与量の設定法に課題を残した。これらの背景から抗体の標的そのものである活性型 IGF を血中で測定できれば、投与量の設定、治療効果・副作用予測のための直接的なバイオマーカーになりうると期待された。

2. 研究の目的

- (1) 生体内(血中)での活性型 IGF の測定系を確立すること
- (2) 活性型 IGF の IGF 中和抗体治療におけるバイオマーカー(投与量の設定因子、治療効果・副作用予測因子)としての有用性を検討すること。

3. 研究の方法

ヒトにおいては活性型 IGF を測定する ELISA kit が市販されているが、IGF 結合タンパク質の影響を受けやすく、十分に検証された測定系とはいえない。そこでわれわれは血中の活性型 IGF を評価するため、IGF 受容体過剰発現細胞を血液検体で刺激し抗リン酸化 IGF 受容体抗体を用いたウエスタンブロット法にて IGF 受容体のリン酸化レベルを検出し、活性型 IGF を評価する機能的アッセイ法(Kinase Receptor Activation Assay:KIRA法)の開発を試みた。次に免疫不全マウスの門脈にヒト大腸癌細胞株(HT29)を注入することにより肝転移を作成し、KIRA 法を用いて、経時的に活性型 IGF を測定する。次に抗 IGF 中和抗体を脾臓経由で門脈内投与し肝転移抑制効果および、活性型 IGF のバイオマーカーとしての有用性を検討する。

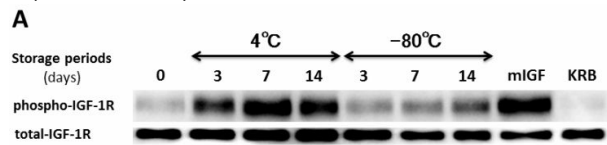
4. 研究成果

(1) KIRA 法の開発

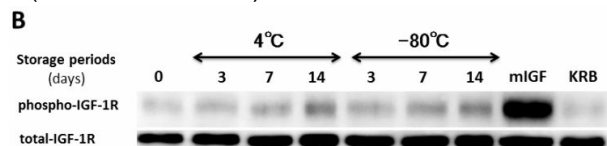
上記方法にて、血液中の活性型 IGF の検出に成功した。この系の確立に当たってサンプルの採取状況、保存状態が測定結果に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。すなわちマウスの活性型 IGF の測定には血清は不適であり、長期保存を避けることが望ましい(図上段 AB)。一方、ヒト活性型 IGF の測定は血清でも可能であるが、長期保存により高値に

なる傾向が見られた(図下段 AB)。いずれにせよ活性型 IGF の測定には EDTA 血漿が必須であり、保存温度にかかわらず、長期保存を避けたほうがよいとの結論が得られた。

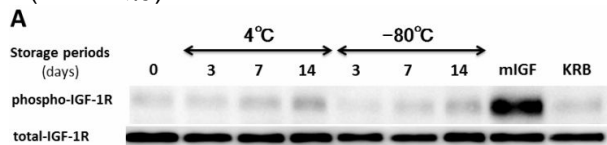
(マウス血清)



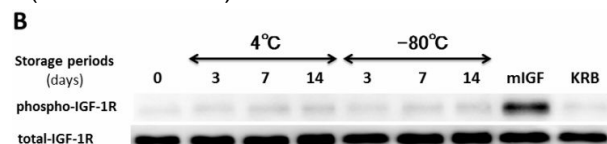
(マウス EDTA 血漿)



(ヒト血清)



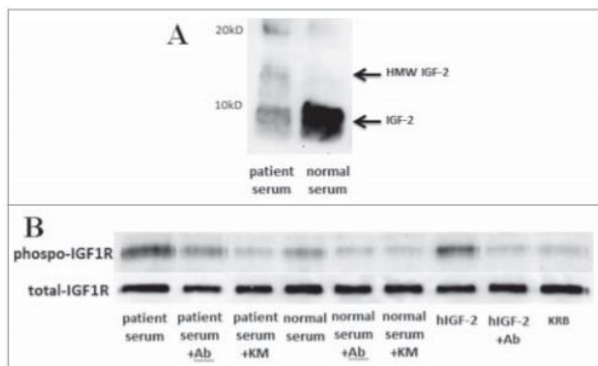
(ヒト EDTA 血漿)



これらの結果を踏まえ、われわれは KIRA のサンプルはすべて EDTA 血漿で採取し、採血当日に測定することで、採血条件による誤差をなくし、サンプル間の比較が可能になるものと考えられた。

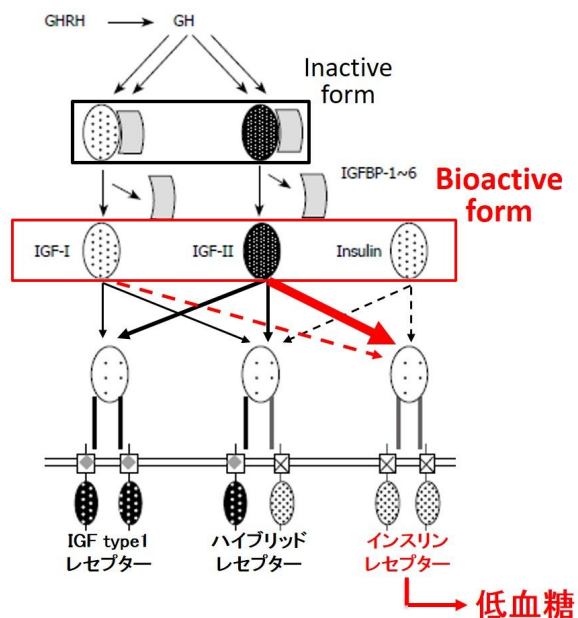
(2) 非膵島細胞腫瘍性低血糖(Non-islet Cell Tumor Hypoglycemia: NICTH)における低血糖の機序を解明。

われわれは NICTH を呈した大腸の神経内分泌細胞癌の症例を経験した。NICTH では高分子量 IGF-2 がその病態に関与していることが知られているが(下段図 A)、この症例の血中の Bioactive IGF を上記アッセイ法で測定したところ、総 IGF-2 量には変化がないにもかかわらず、Bioactive IGF-1 および-2 が増加しており(下段図 B)、NICTH の病態においては IGF の活性化機構が働き、主として Bioactive IGF-2 がインスリン受容体を介して低血糖を引き起こすことが強く示唆された(下記に図示)。以上より、NICTH は抗 IGF 中和抗体のよい適応疾患と考えられ、低血糖の改善のみならず、抗腫瘍効果も期待できるものと思われる。さらに大腸癌肝転移モデルにおいても経時的に Bioactive IGF が上昇することを確認しており、IGF 中和抗体の治療効果を予測するバイオマーカーになりうる可能性を検証中である。



KM: 抗ヒト IGF-1 + IGF-2 中和抗体
 Ab: 抗ヒト IGF-2 中和抗体

(NICTH における低血糖の機序)



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19件)

Ishizu S, Setoyama T, Ueo T, Ueda Y, Kodama Y, Ida H, Kawaguchi Y, Yoshizawa A, Chiba T, Miyamoto S. Concomitant Case of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas and Functioning Pancreatic Neuroendocrine Tumor (Vasoactive Intestinal Polypeptide-Producing Tumor): First Report. *Pancreas* (査読有) 2016;45(6):e24-5.
 doi: 10.1097/MPA.0000000000000578.

Nishikawa Y, Sakurai T, Miyamoto S. Multiple White Plaques in the Body of the Stomach in a Patient Undergoing Hemodialysis. *Gastroenterology*

2016;151(1):e18-9. (査読有)
 doi: 10.1053/j.gastro.2016.03.049.

Kikuchi O, Ohashi S, Horibe T, Kohno M, Nakai Y, Miyamoto S, Chiba T, Muto M, Kawakami K. Novel EGFR-targeted strategy with hybrid peptide against oesophageal squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* (査読有) 2016;6:22452. doi: 10.1038/srep22452.

Nishikawa Y, Miyamoto S, Horimatsu T, Okabe H, Muto M. Esophageal Rupture Associated with Colonoscopy Preparation. *J Am Geriatr Soc.* (査読有) 2016;64(3):682-3.

doi:10.1111/jgs.14003.

Tateya I, Muto M, Morita S, Miyamoto S, Hayashi T, Funakoshi M, Aoyama I, Higuchi H, Hirano S, Kitamura M, Ishikawa S, Kishimoto Y, Morita M, Ito J. Endoscopic laryngo-pharyngeal surgery for superficial laryngo-pharyngeal cancer. *Surg Endosc.* (査読有) 2016;30(1):323-9.

doi: 10.1007/s00464-015-4213-y.

Kikuchi O, Ohashi S, Nakai Y, Nakagawa S, Matsuoka K, Kobunai T, Takechi T, Amanuma Y, Yoshioka M, Ida T, Yamamoto Y, Okuno Y, Miyamoto S, Nakagawa H, Matsubara K, Chiba T, Muto M. Novel 5-fluorouracil-resistant human esophageal squamous cell carcinoma cells with dihydropyrimidine dehydrogenase overexpression. *Am J Cancer Res.* (査読有) 2015;5(8):2431-40. eCollection 2015.

Ohashi S, Miyamoto S, Kikuchi O, Goto T, Amanuma Y, Muto M. Recent Advances from Basic and Clinical Studies of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology* (査読有) 2015;149(7):1700-15.

doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.054.

Amanuma Y, Ohashi S, Itatani Y, Tsurumaki M, Matsuda S, Kikuchi O, Nakai Y, Miyamoto S, Oyama T, Kawamoto T, Whelan KA, Nakagawa H, Chiba T, Matsuda T, Muto M. Protective role of ALDH2 against acetaldehyde-derived DNA damage in oesophageal squamous epithelium. *Sci Rep.* (査読有) 2015;5:14142.

doi: 10.1038/srep14142.

Setoyama T, Miyamoto S, Nikaido M, Muto M, Chiba T. Instability of IGF-IGFBP complex as a cause of the different performance of serum and EDTA-plasma after storage: EDTA-plasma is preferable for evaluating bioactive IGF especially in the mouse. *Growth Horm IGF Res.* (査読有) 2015;25(5):227-31.

doi: 10.1016/j.ghir.2015.06.009.

Tateya I, Morita S, Muto M, Miyamoto S, Hayashi T, Funakoshi M, Aoyama I, Hirano S, Kitamura M, Ishikawa S, Kishimoto Y, Morita M, Mahattanasakul P, Morita S, Ito J. Magnifying endoscope with NBI to predict the depth of invasion in laryngo-pharyngeal cancer. *Laryngoscope* (査読有) 2015;125(5):1124-9.

doi: 10.1002/lary.25035.

Satake H, Yano T, Muto M, Minashi K, Yoda Y, Kojima T, Oono Y, Ikematsu

H, Aoyama I, Morita S, Miyamoto S, Fujii S, Yoshizawa A, Ochiai A, Hayashi R, Kaneko K. Clinical outcome after endoscopic resection for superficial pharyngeal squamous cell carcinoma invading the subepithelial layer. *Endoscopy* (査読有) 2015;47(1):11-8.

doi:10.1055/s-0034-1378107.

Nikaido M, Miyamoto S, Iinuma S. Prevention of gastric volvulus-induced recurrent acute pancreatitis by percutaneous endoscopic gastropepy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* (査読有) 2015;13(2):e11-2.

doi: 10.1016/j.cgh.2014.09.035.

Tateya I, Morita S, Muto M, Miyamoto S, Hayashi T, Funakoshi M, Aoyama I, Hirano S, Kitamura M, Ishikawa S, Kishimoto Y, Morita M, Mahattanasakul P, Morita S, Ito J. Magnifying endoscope with NBI to predict the depth of invasion in laryngo-pharyngeal cancer. *Laryngoscope* (査読有) 2015;125(5):1124-9.

doi: 10.1002/lary.25035.

Nikaido M, Miyamoto S and Iinuma S. Systemic multiple ulcerative lesions in a patient with ischemic heart disease. *Gastroenterology* (査読有) 2014;147(6):e7-8.

doi:10.1053/j.gastro.2014.06.040.

Setoyama T, Miyamoto S, Horimatsu T, Funakoshi T, Nikaido M, Kodama Y, Minamiguchi S, Yamabata T, Muto M, Chiba T. Bioactive insulin-like growth factors as a possible molecular target for non-islet cell tumor hypoglycemia.

Cancer Biol Ther (査読有)
2014;15(12):1588-92.
doi: 10.4161/15384047.2014.961878.
Mashimo Y, Ezo Y, Ueda K, Ozaki Y, Amanuma Y, Aoyama I, Horimatsu T, Morita S, Miyamoto S, Yano T, Higashino K, Chiba T, Muto M. Salvage Photodynamic Therapy Is an Effective and Safe Treatment for Patients with Local Failure after Definitive Chemoradiotherapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Journal of Cancer Therapy (査読有) 5:647-656.
Yukawa Y, Ohashi S, Amanuma Y, Nakai Y, Tsurumaki M, Kikuchi O, Miyamoto S, Oyama T, Kawamoto T, Chiba T, Matsuda T, Muto M. Impairment of aldehyde dehydrogenase 2 increases accumulation of acetaldehyde-derived DNA damage in the esophagus after ethanol ingestion. Am J Cancer Res. (査読有) 2014;4(3):279-84..
Ohashi S, Kikuchi O, Tsurumaki M, Nakai Y, Kasai H, Horimatsu T, Miyamoto S, Shimizu A, Chiba T, Muto M. Preclinical validation of talaporfin sodium-mediated photodynamic therapy for esophageal squamous cell carcinoma. PLoS One. (査読有)2014;9(8):e103126.
Shimizu T, Marusawa H, Matsumoto Y, Inuzuka T, Ikeda A, Fujii Y, Minamiguchi S, Miyamoto S, Kou T, Sakai Y, Crabtree JE, Chiba T. Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with Helicobacter pylori infection. Gastroenterology (査読有) 2014;147(2):407-17.

〔学会発表〕(計1件)

瀬戸山健
Bioactive insulin-like growth factors as a possible molecular target for non-islet cell tumor hypoglycemia
第13回日本臨床腫瘍学会
2015年7月17日 札幌

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

京都大学医学部附属病院

内視鏡部 助教

宮本 心一 (MIYAMOTO SHIN'ICHI)

研究者番号: 90378761

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

京都大学医学部附属病院

がんセンター 医員

瀬戸山健 (SETOYAMA TAKESHI)

研究者番号: 80760595