

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860985

研究課題名(和文)食道癌における放射線誘導性EMTと癌幹細胞分化制御に関する基礎的研究

研究課題名(英文)A basic study on radiation-induced epithelial-to-mesenchymal transition and control of cancer stem cell differentiation in esophageal cancer

研究代表者

岡本 浩一 (Okamoto, Koichi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：40623319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌の悪性度、治療抵抗性を決定づける因子としての上皮間葉移行(EMT)と癌幹細胞の特性や制御法を知ることは今後の癌治療に大きな福音をもたらす可能性がある。本研究では食道癌に対する放射線治療により誘導されるEMTと癌幹細胞形質獲得に焦点を置き、糖尿病治療薬であるメトホルミンがその抑制を介して食道癌治療に相乗効果をもたらす可能性について検討した。食道癌細胞株ならびに食道癌細胞株直腸移植モデルマウスを用いた研究において、メトホルミンの腫瘍増殖抑制効果や放射線誘導性EMT抑制効果が確認されたことで、癌治療における有用な治療補助薬として位置づけられる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There is a possibility to be brought great gospel by understanding the characteristics of epithelial-to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cell as pivotal factors which determine the malignant potential and treatment-resistance of cancer. In the present study, we examined the synergistic effect of anti-diabetic drug, metformin, in esophageal cancer treatment through the control of radiation-induced EMT and cancer stemness. In our study with esophageal cancer cell line and ectopic rectal transplant model mouse of esophageal cancer cell, the inhibitory effects of metformin on tumor growth and radiation-induced EMT as an effective therapeutic adjunct on cancer treatment were proven in vitro and in vivo.

研究分野：oncology

キーワード：EMT radiation esophageal cancer metformin treatment-resistance cancer stem cell

1. 研究開始当初の背景

食道癌における放射線療法は、手術、化学療法と並ぶ重要な治療手段と位置づけられている。しかし放射線治療中や終了後に遠隔転移が発生する症例や、治療抵抗性により腫瘍の増悪を認める症例が临床上少なくない。近年この機序には放射線治療誘導性の上皮間葉移行 (Epithelial-to-Mesenchymal Transition: EMT) が関与しているという報告が見られてきている。上皮系固形癌における EMT は腫瘍細胞自身が持つ内的因子だけでなく、癌の周囲に存在する間質細胞である Cancer associated fibroblast (CAF) や、それらから分泌される成長因子やサイトカインによる微小環境因子の変化により起こる変化と考えられている。これまでの研究からは、原発巣における Transforming growth factor- (TGF-) を含む様々な成長因子が EMT を誘発する因子であることが報告されている。

これまでに我々の教室では、固形癌の中でも癌間質に富む胆管細胞癌において、腫瘍間質に存在する肝星細胞・筋線維芽細胞などの CAF に由来するサイトカイン供給と腫瘍細胞との相互作用において、TGF-、Angiotensin II (AngII)、Stromal cell derived factor-1 (SDF-1) を介して EMT 誘導が増強されることで固形癌の転移・浸潤能に深く関与することを報告してきた (Int J Oncol 37: 1251-1259, 2010、Int J Oncol 41: 573-582, 2012)。これらの微小環境の変化により生じる固形癌の EMT は原発巣内で起こる転移のプロセスの準備段階と考えられており、細胞形態の紡錘形変化や運動・浸潤能の獲得、上皮系細胞の間葉系形質の獲得など、浸潤・転移により有利な形質を獲得することが EMT の本態と考えられており、TGF- 抑制作用から上皮系癌細胞の EMT を抑制する薬剤として mTOR 阻害薬である metformin の有効性がここ数年の基礎研究より明らか

にされてきた。

一方近年、消化器癌において癌幹細胞の存在と特性、及びその抗癌剤耐性が注目されている。その中で metformin が抗癌剤耐性を緩和することが近年の臨床研究で明らかにされており、metformin の癌幹細胞分化の制御作用が期待されている。一方、血小板由来の TGF- を介する乳癌・大腸癌細胞株における EMT の細胞内伝達経路を解析した研究では、nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- B) の経路が活性化することで転移が促進されたと報告されている。さらに、微小環境から提供されるサイトカインが活性化する NF- B 経路が癌幹細胞の自己複製能の維持に関与することが報告されていることから、癌幹細胞の分化誘導と EMT 誘導は浅からぬ関与があると推察される。また、これらの TGF-、NF- B を抑制する薬剤が EMT と癌幹細胞への分化誘導を介する遠隔転移・再発を抑制する可能性があることを示している。

食道癌の再発を抑制し、治療成績を向上させるためには、術後再発や遠隔転移の最大の原因と考えられる癌幹細胞と放射線誘導性 EMT の分子生物学的特性とメカニズムを明確にした上で、これらを標的とした新しい治療手段の開発が望まれる。

2. 研究の目的

食道癌に対する放射線療法により、癌組織における癌細胞の EMT の亢進と、EMT を根本として生じる遠隔転移の増加のメカニズムを解析することを目的とする。また、癌幹細胞の形質である抗癌剤耐性や増殖・浸潤能、sphere 形成、細胞表面マーカーなどの生物学的特性の変化につき検証する。さらに癌幹細胞の分化誘導への関与が推察される EMT において TGF- と NF- B に着目し、mTOR 阻害薬である metformin を用いたこれらのシグナル伝達を介する癌幹細胞・上皮間葉移

行の制御と治療抵抗性の克服の可能性に関して検証する。

3. 研究の方法

ヒト食道扁平上皮癌培養細胞株への放射線照射により EMT が誘導されること、癌幹細胞形質の発現を証明する。EMT 誘導の証明として発現蛋白の変化、浸潤能、増殖能につき評価する。また、癌幹細胞分化誘導の証明として、細胞表面マーカー発現の変化、抗癌剤耐性の変化につき評価する。さらに、metformin を用いて、EMT 誘導の抑制効果と癌幹細胞形質の発現抑制について in vitro にて検討する。

in vitro の結果の上で、放射線照射後の食道扁平上皮癌細胞株を用いたマウス直腸移植モデルを用いて、in vivo でのリンパ節転移や遠隔転移の増加の証明、および metformin による転移形成能の抑制を含む抗腫瘍効果、間質の線維化、抗癌剤耐性の緩和などへの相乗的な影響について検討する。

4. 研究成果

ヒト食道扁平上皮癌細胞株における放射線照射による EMT の誘導（細胞形態変化、上皮系蛋白発現の低下、間葉系蛋白発現の増強、浸潤能の上昇）を蛍光免疫染色、Western blotting 法、Invasion assay、Gelatin zymography を用いて in vitro にて確認した（図 1, 2）。

図1. 細胞形態変化（照射48時間後）

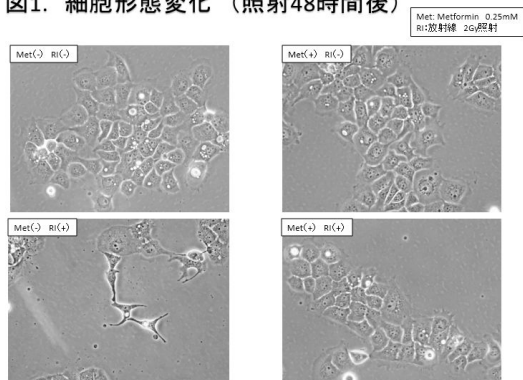
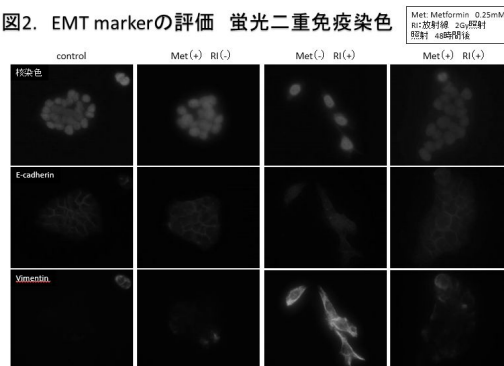


図2. EMT markerの評価 蛍光二重免疫染色



食道扁平上皮癌細胞株に対する Metformin 添加による 1mM 以上の濃度では濃度依存性の増殖抑制効果を認めた。増殖抑制効果を有しない 0.5mM 濃度の Metformin 照射前添加にて、培養上清中の TGF- β 1 濃度の抑制を認め、放射線誘導性 EMT が抑制されることを確認した（図 3-7）（E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, SMA, HIF-1 α , TGF- β 1, Slug, Snail, Twist などの EMT 関連誘導蛋白・転写因子の発現変化や浸潤能・遊走能の変化を検討）。また、これらの反応は、HIF-1 α 発現低下に伴う TGF- β 1 発現抑制を介する Smad 経路と、AMPK・Akt-mTORc1 のリン酸化を介する非 Smad 経路の双方を介して起こることを証明した。

図3. EMT誘導関連タンパクの評価（Western Blotting）

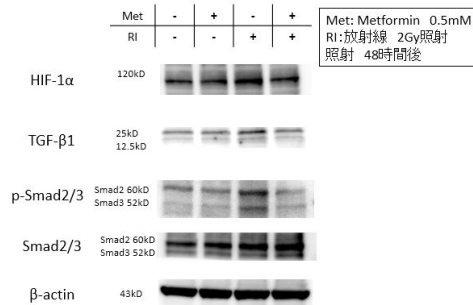


図4. EMT関連転写因子の評価

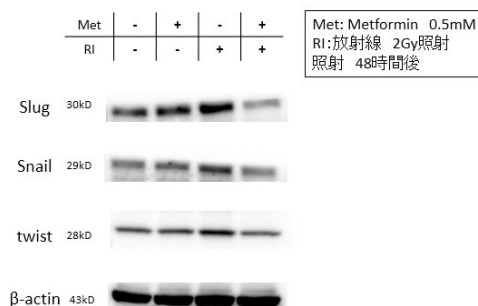


図5. EMT markerの評価

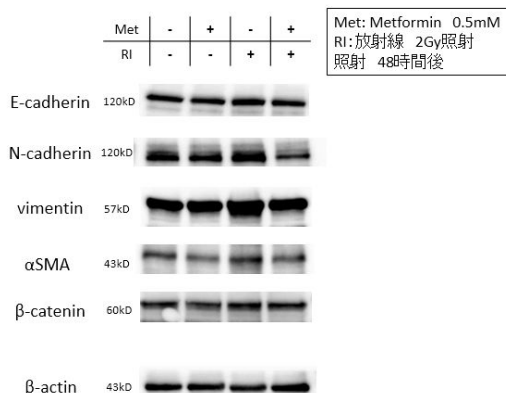


図6. 培養上清中TGF-β濃度 (ELISA, 照射48時間後)

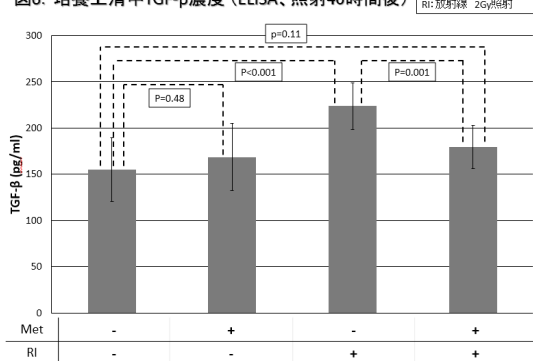
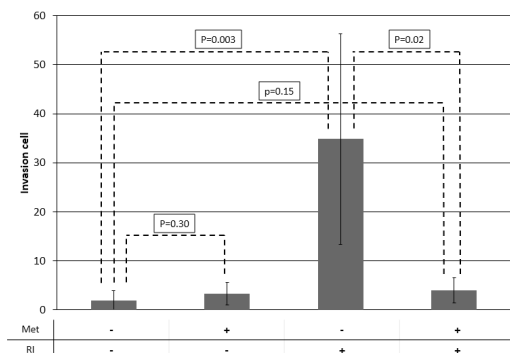


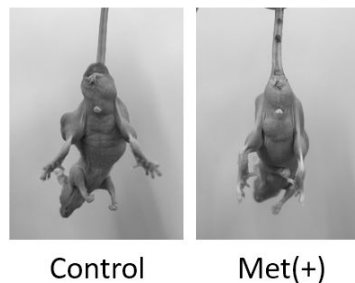
図7. 浸潤能評価 Invasion assay



これらの結果より、Metformin は食道扁平上皮癌における放射線抵抗性を改善し、さらに放射線照射の細胞増殖抑制効果や放射線誘導性 EMT 抑制効果を増強する可能性が示唆された。

また、ヌードマウス (Balb/c) を用いた食道癌細胞株直腸移植モデルを作成し、2.5mg/mL 濃度の Metformin 溶解飲料水投与を行ったところ、Control 群と比較して腫瘍重量および腫瘍サイズにおいて有意な腫瘍増殖抑制傾向を認めた。

図8. 直腸粘膜移植モデルマウスへのMetformin投与



今後更なる検討課題として、in vivo での放射線誘導性 EMT や癌幹細胞形質への影響の証明などにつき検討し、さらに Metformin 投与による EMT 誘導や癌幹細胞形質の獲得の抑制効果を介して、食道癌治療に相加相乗効果をもたらす可能性について評価したい。

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)

[学会発表](計 3 件)

1. 岡本浩一、二宮 致、他：食道癌術前化学療法による効果と癌幹細胞マーカー発現との相関 .第 58 回関西胸部外科学会学術集会；2015 年 6 月 12-13 日、岡山コンベンションセンター (岡山県)
2. 岡本浩一、二宮 致、他：食道癌術前化学療法における癌幹細胞マーカーの意義 .第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会；2013 年 10 月 16-19 日、仙台国際センター (宮城県)
3. 岡本浩一、二宮 致、他：食道癌術前化学療法における癌幹細胞の意義 .第 113 回日本外科学会定期学術集会；2013 年 4 月 11-13 日、福岡国際会議場 (福岡県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 浩一 (OKAMOTO Koichi)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：40623319