

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10111

研究課題名(和文)食道癌に対するGSTP1タンパク発現を指標とした新規個別化治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel individualized therapy for esophageal squamous cell carcinoma in accordance with GSTP1 expression

研究代表者

藤原 斉 (Fujiwara, Hitoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20332950

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)：食道癌細胞株においてsiRNAによる発現抑制により増殖能・浸潤能の抑制が確認された。cleaved caspase3, cleaved PARPタンパクの発現亢進が見られ、アポトーシス誘導が示唆された。FACSではsubG1/G0期分画と早期アポトーシスの有意な増加を認めた。一方、GSTP1発現抑制により高濃度CDDPに対する感受性亢進が確認され、CDDP存在下でGSTP1発現抑制により早期・晩期アポトーシスの著明な亢進を認めた。免疫染色では術前加療によるダウンステージがGSTP1タンパク発現と有意に相関し( $p=0.04$ )、生検検体・切除検体にも軽度の相関を認めた( $p=0.08$ )。

研究成果の概要(英文)：In the esophageal cancer cell lines, the proliferation and invasion ability were significantly decreased by GSTP1 suppression, and the apoptosis induction was suggested because of the enhancement of apoptosis-related protein, cleaved caspase3 and cleaved PARP. Moreover, in FACS analysis, subG1/G0 fraction or the early apoptosis was significantly increased. Drug resistance for high level of CDDP was introduced by GSTP1 suppression, and the early and late apoptosis were markedly enhanced. In the immunohistochemistry analysis, the down staging by pre-operative chemotherapy was significantly correlated with GSTP1 protein expression ( $p=0.04$ ), and the expression between biopsy and resected tissue samples slightly related ( $p=0.08$ ).

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 GSTP1 抗がん剤感受性

1. 研究開始当初の背景

GSTP1 はGST(glutathione S-transferase) 群の1つのクラスに分類される細胞内解毒酵素であり、様々なストレスや化学物質によりその発現が誘導され、有害物質のGSH(glutathione)との抱合を促進する事で細胞保護的に働く事が知られている。また同様に、抗がん剤の抱合によりその活性を下げる事で化学療法に対する耐性獲得機序の1つとして報告されており、乳癌・大腸癌・肺癌・腎癌・卵巣癌などの多くの癌において発現上昇と化学療法耐性や生存との関係が報告されている(Laborde E, Cell death and Differentiation, 2010、Miyake T et al., Cancer Science, 2012)。

食道扁平上皮癌(以下、食道癌)においても、GSTP1 発現と予後や化学療法耐性との関連の報告が散見されるが、その内容にはばらつきが多く、またGSTP1 の遺伝子多型との関連の報告が多い(Wang Z et al, BMC cancer, 2010、Sasano H et al, Anticancer Res, 1993、Lee JM et al, Clinical Cancer Res, 2005)。

我々はこれまで、GST 群の中で食道組織における発現量が最も多いとされるGSTP1 に着目し、食道癌組織におけるGSTP1タンパクの発現により、食道癌の予後に有意な悪化を認め、また術後化学療法 (FP 療法) に対する感受性が低下する事を報告した (Yamamoto Y, Konishi H et al, Oncol Rep, 2013)。

多くの食道癌細胞株においてGSTP1 タンパクは、正常線維芽細胞株(WI-38)よりも高発現を示し、また食道癌組織での免疫組織染色において、低発現群/高発現群(grade1/2)の2群に分類が可能であり(図1)、低発現群で生存率が有意に良好であった(図2)。

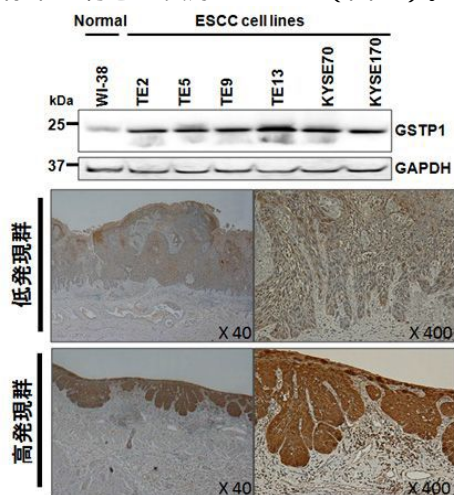


図1、食道癌細胞株・組織におけるGSTP1発現

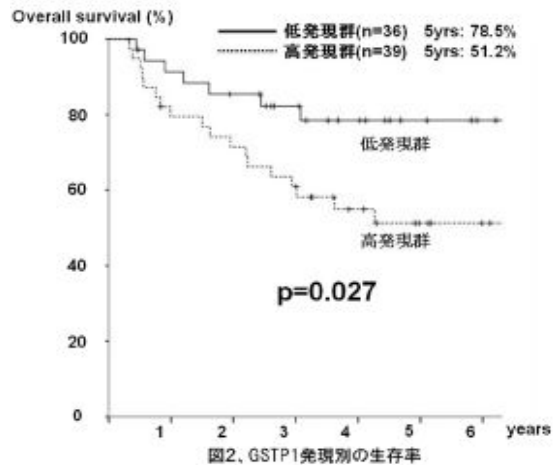


図2、GSTP1発現別の生存率

低発現群では有意差はないものの術後化学療法による予後の改善が認められ、高発現群では予後の改善を認めず、GSTP1 発現が高いほど化学療法に抵抗性である可能性が示唆された(図3)。

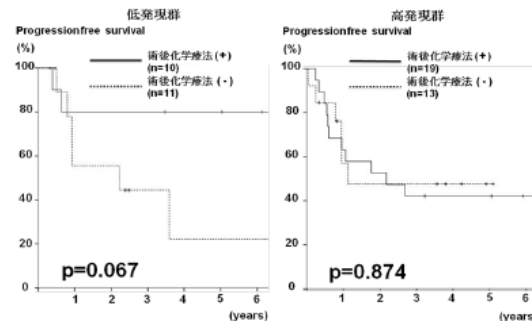


図3、GSTP1発現別の術後化学療法の効果の検討

これらの事から、GSTP1 発現は術後のみならず術前化学療法に対する効果予測の指標になる可能性も秘めており、これらの機序の解明は、GSTP1 発現を指標とした新たな食道癌の治療戦略の確立につながると考えられた。

2. 研究の目的

本研究には、食道癌細胞株においてGSTP1 高発現をもたらす要因の解明とGSTP1 高発現による癌細胞に対する影響を、抗がん剤感受性やその下流分子の変化から検討・同定する事を目的とした。さらに食道癌の術前生検検体と切除標本におけるGSTP1 タンパク発現の比較を行い、術前化学療法による効果を確認すると共に、術前・術後化学療法の施行や種類に関してGSTP1 発現を指標とした新たな治療戦略の確立を目指した。

3. 研究の方法

食道癌細胞株を用いて、siRNA による GSTP1 発現抑制の影響を、増殖アッセイ、浸潤・遊走アッセイ、抗がん剤感受性試験などから検討する。また、術前化学療法を施行した食道癌患者の術前生検検体・切除検体を用いて、GSTP1 免疫染色によるタンパク発現の評価と臨床病理学因子や予後との関連を評価する。これらの検討から GSTP1 発現を指標とした、新たな治療標的としての可能性を検討する。

#### 4. 研究成果

食道癌細胞株のうち GSTP1 の高発現が確認された細胞株 KYSE170, TE13 を用いて、siRNA による mRNA, タンパクの発現抑制が確認され (図 1) MTT アッセイでは siRNA による GSTP1 発現抑制により増殖能の抑制が確認された (図 2)。

図 1 GSTP1 発現抑制

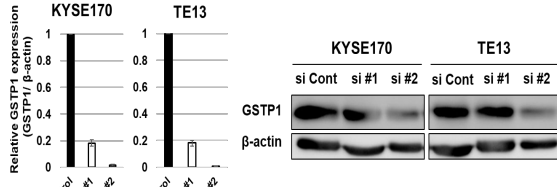
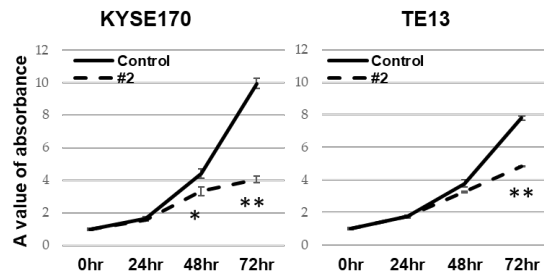


図 2 増殖アッセイ



またこの際に cleaved caspase3, cleaved PARP タンパクの発現亢進が確認され、アポトーシス誘導による増殖抑制の可能性が示唆された (図 3)。同様に、GSTP1 発現抑制により軽度の浸潤能抑制が確認されたが有意ではなく、遊走能には明らかな変化を認めなかった (図 4)。

図 3 ウェスタンブロット

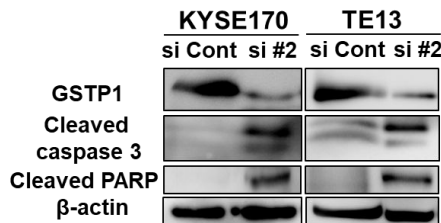
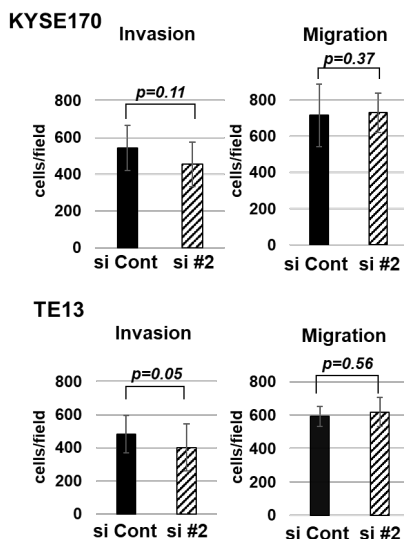


図 4 浸潤・遊走アッセイ



一方、FACS を用いた細胞周期の検討では GSTP1 発現抑制により subG1/G0 期分画の増加が見られ (図 5) アポトーシスアッセイでは早期アポトーシスの有意な増加が認められた (図 6)。

これらの結果から、GSTP1 発現抑制によりアポトーシスが誘導され増殖抑制が起こると共に、浸潤能も抑制されることが確認された。

図 5 細胞周期 (FACS)

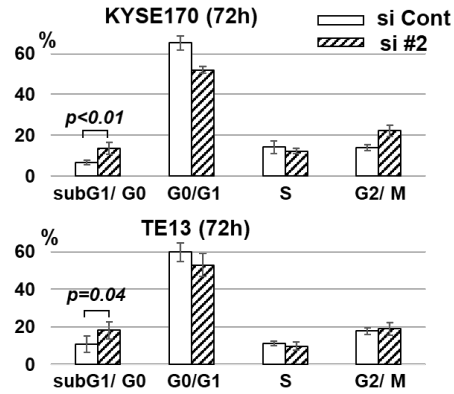
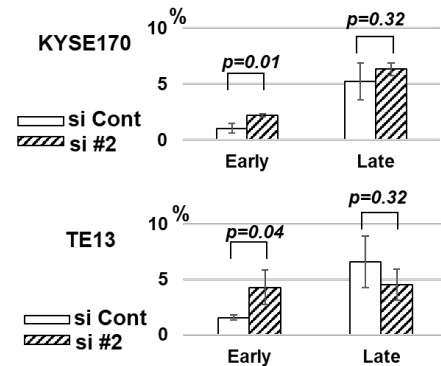
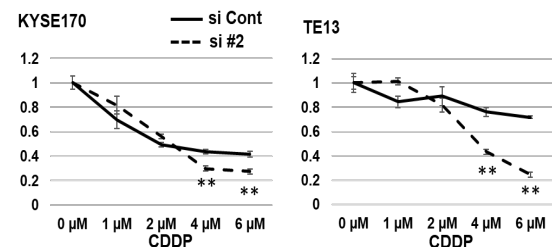


図 6 アポトーシスアッセイ



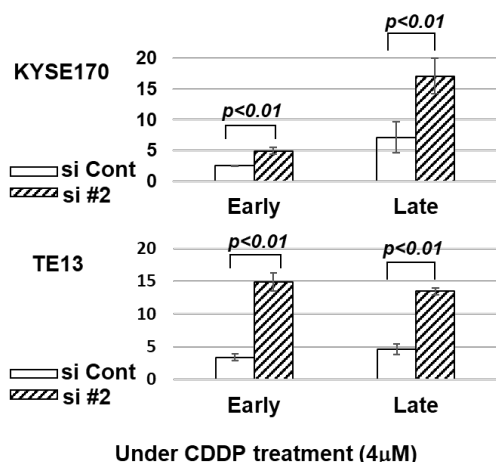
ここで増殖アッセイを用いて、GSTP1 発現抑制による抗がん剤に対する感受性変化を検討した。5FU に対する感受性は、GSTP1 発現抑制による明らかな影響を確認できなかったものの、GSTP1 発現抑制により高濃度 CDDP に対する感受性が増強する事が確認された (図 7)。

図 7 抗がん剤感受性試験 (増殖アッセイ)



4 μM の CDDP 存在下でのアポトーシスアッセイでは、コントロール群に比べて GSTP1 発現抑制群において、早期・晚期アポトーシスの著明な亢進を認めた (図 8)。これは GSTP1 発現抑制に伴う CDDP に対する感受性亢進を反映した変化であると予想された。

図8 アポトーシスアッセイ



術前化学療法を施行した患者の切除検体を用いた免疫組織染色では、約70%の症例がGSTP1高発現群として判定され、臨床病理学的因子との相関が検討された。その結果、術前から術後へのダウンステージがGSTP1タンパク発現の評価と有意な相関を示し( $p=0.04$ )、GSTP1タンパクの低発現群ほど高い術前化学療法によるダウンステージ効果を示した。しかし、他の臨床因子や予後との有意な相関は認めなかった。

少数例ではあるが術前の生検検体12サンプルを用いて、手術切除検体における免疫染色の評価との比較も施行した。この結果、両者の染色評価には有意ではないものの軽度の相関を認め( $p=0.08$ )、生検検体を用いたGSTP1タンパク発現の評価が、化学療法に対する効果予測因子として利用可能である可能性が示唆された。

一方で、化学療法後の切除検体では、GSTP1低発現症例においては多くの感受性の高い癌細胞が化学療法の効果により死滅する事で、GSTP1高発現の化学療法感受性の低い細胞群のみが残存し、正確なGSTP1タンパク発現の評価が困難な可能性が高い。今後は、生検検体におけるより多数例での検討が臨床応用に向けて必要であると考えられた。

#### 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1件)

S Ogin, H Konishi, H Fujiwara, E Otsuji et al. Glutathione S-transferase Pi 1 is one of the valuable predictors related to anticancer drug resistance in esophageal squamous cell carcinoma. British Journal of Cancer Cancer (2018. Under submission) 査読有

[学会発表](計5件)

荻野真平、小西博貴、藤原斉、岡本和真、大辻英吾 他. 食道癌の予後および化学療法耐性に対するGSTP1の重要性の検討. 第26回日本癌病態治療研究会. 2017

荻野真平、小西博貴、藤原斉、大辻英吾 他. 食道癌の予後および化学療法耐性におけるGSTP1の重要性. 日本外科学会. 2018

Shinpei Ogin, Hiroataka Konishi, Eigo Otsuji et al. Glutathione S-transferase Pi 1 (GSTP1) is one of valuable predictors related to poor prognosis and resistance to chemotherapy in esophageal cancer. ISDE. 2018

荻野真平、小西博貴、大辻英吾 他. 食道癌の抗癌剤耐性・予後に関与する因子GSTP1の重要性について. 日本癌学会. 2018

荻野真平、小西博貴、藤原斉、大辻英吾 他. 食道癌の増殖能および化学療法耐性に対するGSTP1の重要性. 消化器外科学会. 2018

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤原 斉 (Hitoshi Fujiwara)  
京都府立医科大学・消化器外科・准教授  
研究者番号: 20332950

##### (2) 研究分担者

小西 博貴 (Hiroataka Konishi)  
京都府立医科大学・消化器外科・助教  
研究者番号: 00448739

大辻 英吾 (Eigo Otsuji)  
京都府立医科大学・消化器外科・教授  
研究者番号: 20244600

##### (4) 研究協力者

荻野 真平 (Shinpei Ogin)  
京都府立医科大学・消化器外科  
・大学院生