

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10122

研究課題名(和文) 食道扁平上皮癌におけるがん代謝を制御する分子機序の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis to elucidate the mechanism of cancer metabolism in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

渡邊 雅之 (Watanabe, Masayuki)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・部長

研究者番号：80254639

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)：本研究において、食道癌手術症例の内臓脂肪として大網の脂肪組織を収集し、その mRNA をマイクロアレイ遺伝子発現解析[高BMI症例(N=3) vs. 標準BMI症例(N=3)]に提出した。Pathway解析にて、高BMIでは、標準BMI症例と比較して、補体経路が有意に活性化していた。特に補体関連遺伝子のC3遺伝子(P=0.0061)とC4遺伝子(左P=0.018)の発現上昇が肥満症例において有意に顕著であった。肥満合併の食道癌患者では、内臓脂肪から過剰な補体成分C3/C4が過剰に産生され、それらは腫瘍局所で補体の古典経路の活性化を誘導し、腫瘍進展に関与しているのではないかと推測している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have collected omental fat, extracting total RNA, and then submitted those to microarray analysis [high-BMI cases (BMI more than 25, N=3) vs. normal-BMI cases (BMI around 20, N=3)], in the patient with esophageal squamous cell carcinoma who underwent curative resection in our institution. Pathway analysis revealed that complementary activation pathway was significantly upregulated in the high-BMI cases (N=3), compared to the normal-BMI cases (P=0.0028). Especially, we observed significantly overexpression of C3 and C4 genes in the high-BMI cases. Our results suggest that in obese patients with esophageal squamous cell carcinoma, complements C3/C4 were highly produced in omental fat, activate classical pathway of complement at the tumor microenvironments.

研究分野：食道癌

キーワード：食道癌 代謝 脂肪

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は消化器がんの中でも最も難治性のがんのひとつである。手術・化学療法・放射線治療を組み合わせた集学的治療によりその治療成績は改善傾向にあるが、特に進行癌症例においては、既存の治療法による予後向上には限界がある。

申請者は、肥満が食道癌の悪性度に及ぼす影響を研究してきた。食道癌においては再発予後を BMI 別に検討し、高 BMI が重要な予後不良因子であることを報告してきた。肥満症例ではメタボリックシンドロームなど多くの併存症を有するが、そのような背景因子を統計学的に調整しても、肥満症例では予後不良である(文献①)。とりわけ内臓脂肪が癌の進行再発に関わることを明らかにしてきた(文献)。

近年、がん細胞は健常細胞に比較して細胞内代謝が大きく異なり、特に食道扁平上皮癌は嫌気性解糖系が亢進した腫瘍であることが明らかにされている。このような健常細胞と異なるがん代謝は新たながん治療のターゲットとして期待されている。

また、その一方で我々はこれまで代謝性疾患、主に肥満が癌の悪性度に影響を及ぼし、予後不良因子になることを報告してきた。このような代謝性疾患は、癌細胞における細胞内代謝に大きく影響を及ぼしている可能性が高いのではないかと推測し、本研究を推進することとした。

2. 研究の目的

食道癌扁平上皮癌担癌患者において、肥満症例 (BMI > 25) の腹腔内脂肪と正常 BMI (BMI 20 前後) の腹腔内脂肪の網羅的遺伝子発現解析による、肥満症例の腹腔内脂肪の癌の進展に関わる因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腹腔内脂肪のサンプリング

食道扁平上皮癌患者における腹腔内脂肪のサンプリングを前向きにおこなう。手術研単に付着した大網の一部をサンプリングし、採取直後に RNA later に入れてマイナス 80 度で保管する。本研究は倫理委員会での承認を受けた後 (IRB 受付番号 2014-1028)、すべての症例において術前にインフォームドコンセントを行い、書面で同意を得た。

(2) RNA の抽出と quality check

RNAeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) を用いて、脂肪組織 100mg から total RNA を 1000 µg 抽出し、Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Inc., cat.# 5067-1151)、Agilent RNA 6000 Nano Ladder (Agilent Technologies, Inc., cat.# 5067-1529)、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) を用いて、Total RNA の Quality check を行った。

(3) マイクロアレイ解析

遺伝子発現解析は、GeneChip Human Clariom S Array 2.4K (Affymetrix) にて行った。マイクロアレイ上の遺伝子データは、MicroArray Data Analysis Tool Ver3.2 (Filgen, Inc.)

PathVisio 3 (<http://www.pathvisio.org/>) を用いて、Gene Ontology 解析と、Pathway 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 脂肪組織のサンプリング

2017 年 1 月 13 日までに以下の 36 例の大網脂肪サンプルを蓄積した (表 1)。

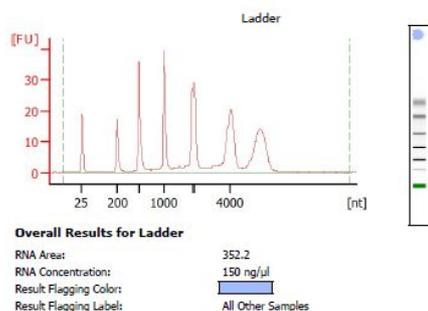
表 1 . 大網脂肪サンプル数と BMI

Type of cancer	BMI low (18.5<)	Normal (18.5-24.9)	High (25.0≤)
ESCC	11	22	3

(2) RNA quality check

Agilent 2100 Bioanalyzer にて行いました。その結果、すべてのサンプルに関して、18S 及び 28S rRNA に由来する 2 本のピークが確認され、RIN 値も 7 以上でした (図 1)。

図 1 . RNA quality check



(3) マイクロアレイ解析結果

遺伝子発現マイクロアレイ解析には BMI によって以下の 6 症例を選択し提出した (表 2)。

表 2 . 遺伝子発現マイクロアレイ解析を行った 6 例

		年齢	性別	BMI	Differentiation	pTNM Stage
Normal BMI	Case 1	62	M	21.8	mod	T1aN2M0
	Case 2	72	M	20.5	well	T3N0M0
	Case 3	69	M	20.3	mod	T3N3M0
High BMI	Case 4	69	M	26.4	Basaloid	T3N0M0
	Case 5	63	M	25.5	mod	T1bN0M0
	Case 6	57	M	27.7	mod	T1bN0M0

Pathway 解析の結果、癌の悪性化に最も関わる可能性がある因子として、補体系の活性化が 2 項目有意な因子として挙げられた (表 3)。

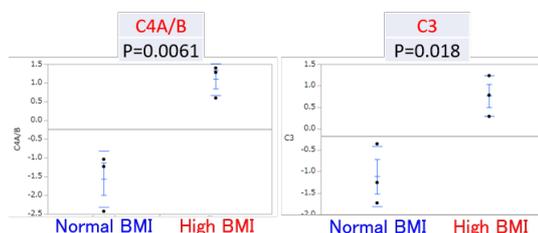
表 3 . Gene pathway 解析結果

Pathway	Z score	P-value
Significantly UP regulated pathways (P<0.05)		
Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis	4.573	0.0018
Complement Activation	5.454	0.0028
Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy	3.437	0.0115
Allograft Rejection	3.264	0.0142
Differentiation Pathway	3.285	0.0204
Pathogenic E.coli infection	2.967	0.0286
Complement and Coagulation Cascades	2.846	0.0325
Lung fibrosis	2.698	0.0382
Wnt Signaling Pathway	2.561	0.0444
Significantly DOWN regulated pathways (P<0.05)		
Chemokine signaling pathway	2.782	0.0314
SRF and miRs in Smooth Muscle Differentiation and Proliferation	4.644	0.0458

また、ケモカインシグナル系は有意な down regulation を認めた (表 3)。

実際の補体 C4A/B, C3 RNA 発現量の差をみたところ、正常 BMI (Normal BMI) と高 BMI (High BMI) で有意な差を認めた (図 2)。

図 2 . 補体 C4A/B, C3 RNA 発現量



(考察)

我々は、これまで肥満と腫瘍進展メカニズムの解明を目指し、食道癌手術症例の内臓脂肪細胞の検体収集を前向きに行ってきた。今回、その遺伝子発現解析データから、標準 BMI 症例に比べて高 BMI 症例の大網脂肪組織では補体活性化経路にかかわる遺伝子群の発現が有意に上昇していることを見出した (P=0.0028)。本研究により、肥満症例では内臓脂肪から大量の補体が産生され、それが腫瘍局所において補体経路活性化を引き起こすことで腫瘍進展に関与すると示唆される。

< 引用文献 >

① Watanabe M. *Ann Surg Oncol.* 2013

Watanabe M et al. *Ann Surg Oncol.* 2016

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

Canadas I, Imamura Y(15 番目),
Watanabe M(22 番目), Barbie D. (27 人
省略). Tumor innate immunity primed
by specific interferon-stimulated
endogenous retroviruses. *Nature
Medicine*. 2018 (accepted) 査読有

Wong GS, Watanabe M(34 番目), Imamura
Y(36 番目), Bass AJ. (34人省略).
Targeting wild-type *KRAS*-amplified
gastroesophageal cancer through
combined MEK and SHP2 inhibition.
Nature Medicine. 2018 (accepted) 査
読有

Eirini Pectasides, Watanabe
masayuki(27 番目), Imamura Y (52 番目),
Daniel Catenacci. (52 人省略).
Genomic Heterogeneity as a Barrier to
Precision Medicine in
Gastroesophageal Adenocarcinoma.
Cancer Discov. 2018; 8: 37-48. 査読
有
DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0395

Eto T, Imamura Y(5 番目), Baba Y(16
番目), Ishimoto T. (17 人省略).
Impact of loss-of-function mutations
at the RNF43 locus on colorectal
cancer development and progression. *J
Pathol* 2018 (accepted) 査読有
DOI: 10.1002/path.5098

Ishimoto T, Baba Y(16 番目), Watanabe
M(18 番目), Tan P. (18 人省略).
Activation of transforming growth

factor beta 1 signaling in gastric
cancer-associated fibroblasts
increases their motility, via
expression of rhomboid 5 homologue 2,
and ability to induce invasiveness of
gastric cancer cells. *Gastroenterol*
2017; 153: 191-204. 査読有
DOI: 10.1053/j.gastro.2017.03.046

Izumi D, Baba Y(10 番目), Watanabe
M(14 番目), Baba H. (13 人省略).
Colorectal cancer stem cells acquire
chemoresistance through the
upregulation of F-Box/WD
repeat-containing protein 7 and the
consequent degradation of c-myc. *Stem
Cells* 2017; 35: 2027-2036. 査読有
DOI: 10.1002/stem.2668

Izumi D, Imamura Y(11 番目), Baba Y(15
番目), Watanabe M(19 番目), Baba H.
(18 人省略). CXCL12/CVCR4 activation
by cancer-associated fibroblast
promotes integrin $\alpha 1$ clustering and
invasiveness in gastric cancer. *Int J
Cancer*. 2016; 138: 1207-1219. 査読有
DOI: 10.1002/ijc.29864

Nakamura K, Baba Y(2 番目), Watanabe
M(14 番目), Baba H. (12 人省略). UHRF1
regulates global DNA hypomethylation
and is associated with poor prognosis
in esophageal squamous cell carcinoma.
Oncotarget. 2016; 7: 57821-57831. 査
読有
DOI: 10.18632/oncotarget.11067

Okamura A, Watanabe M(2 番目), Imamura
Y(5 番目), Sano T. (4 人省略).
Clinical impact of abdominal fat

distribution on prognosis after esophagectomy for esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2016; 23: 1387-1394. 査読有
DOI: 10.1245/s10434-015-5018-x

Tokunaga R, Imamura Y(2 番目), Baba Y(10 番目), Watanabe M(16 番目), Baba H. (15 人省略). Fibroblast growth factor receptor 2 expression, but not its genetic amplification, is associated with tumor growth and worse survival in esophagogastric junction adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016; 7: 19748-19761. 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.7782

Tokunaga R, Imamura Y(9 番目), Baba Y(12 番目), Watanabe M(16 番目), Baba H. (12 人省略). The prognostic significance of Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2016; 23: 678-685. 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.7782

Yang S, Imamura Y (as co-first author) (1 番目), Barbie DA. (17 人省略). Autophagy inhibition dysregulates TBK1 signaling and promotes pancreatic inflammation. *Cancer Immunol Res.* 2016; 4: 520-30. 査読有
DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0235

Baba Y(1 番目), Watanabe M(7 番目), Baba H. (5 人省略). Prognostic impact of postoperative complications in 502 patients with surgically resected esophageal squamous cell carcinoma: A retrospective single

institution study. *Ann Surg* 2016; 264: 305-311. 査読有
DOI: 10.1097/SLA.0000000000001510

Kosumi K, Baba Y(2 番目), Watanabe M(15 番目), Baba H. (14 人省略). Lysine-specific demethylase-1 contributes to malignant behavior by regulation of invasive activity and metabolic shift in esophageal cancer. *Int J Cancer* 2016; 138: 428-439. 査読有
DOI: 10.1002/ijc.29714

Yamamura K, Baba Y(2 番目), Watanabe M(14 番目), Baba H. (11 人省略). Human microbiome fusobacterium nucleatum in esophageal cancer tissue is associated with prognosis. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 5574-5581. 査読有
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1786

Baba H, Baba Y(2 番目), Watanabe M(6 番目), Kokudo N. (21 人省略) Changes in expression levels of ERCC1, DPYD, and VEGFA mRNA after first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer: results of a multicenter study. *Oncotarget* 2015; 20: 34004-34013. 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.5227

Eto K, Watanabe M(3 番目), Imamura Y(6 番目), Baba Y(8 番目), Baba H. (7 人省略). The sensitivity of gastric cancer to trastuzumab is regulated by the miR-223/FBXW7 pathway. *Int J Cancer* 2015; 136: 1537-1545. 査読有
DOI: 10.1002/ijc.29168

Ishimoto T, Watanabe M(3 番目),
Imamura Y(9 番目), Baba Y(12 番目), Baba
H. (11 人省略). Chronic inflammation
with helicobacter pylori-infection is
implicated in CD44 overexpression
through miR-328 suppression in the
gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2015;
50: 751-757. 査読有
DOI: 10.1007/s00535-014-1019-y

〔学会発表〕(計 8 件)

渡邊 雅之、高齢者食道癌の治療方針と
短期成績、第 71 回 日本食道学会、2017
年

渡邊 雅之、頸部食道胃管吻合における
三辺外翻三角吻合と有茎大網被覆の成
績と縫合不全のリスク因子の解析、第 72
回 日本消化器外科学会総会、2017 年

渡邊 雅之、胸部食道扁平上皮癌に対す
る鎖骨上リンパ節郭清の意義、第 70 回
日本胸部外科学会定期学術集会、2017
年

渡邊 雅之、EMR/ESD で非治癒切除となっ
た食道表在癌に対する外科的切除の成
績、第 116 回 日本外科学会定期学術集
会、2016 年

今村 裕、食道胃接合部腺癌におけるマ
イクロサテライト不安定性の検討、第
117 回 日本外科学会定期学術集会、2017
年

今村 裕、食道胃接合部腺癌における手
術関連因子の術式間比較と予後解析、第
71 回 日本食道学会学術集会、2017 年

馬場 祥史、食道扁平上皮癌における
fieldcarcinogenesis を考える、第 117
回日本外科学会定期学術集会、2017 年

馬場 祥史、重複癌を有する食道癌症例
の特徴とは？ field cancerization と
prognosis の観点から、第 71 回日本食道
学会学術集会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 雅之 (Watanabe Masayuki)
公益財団法人がん研究会・有明病院 消化
器外科・部長
研究者番号：80254639

(2)研究分担者

森 誠一 (Mori Seiichi)
公益財団法人がん研究会・がんプレシヨ
ン医療研究センター 次世代がん研究シー
ズ育成プロジェクト・プロジェクトリーダ
ー
研究者番号：10334814

馬場 祥史 (Baba Yoshifumi)
熊本大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：20599708

澤山 浩 (Sawayama Hiroshi)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療講
師
研究者番号：40594875

今村 裕 (Imamura Yu)
公益財団法人がん研究会・有明病院 消化
器外科・副医長
研究者番号：70583045

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

原口 郁実 (Haraguchi Ikumi)
公益財団法人がん研究会・がんプレシヨ
ン医療研究センター がんモデル開発グ
ループ・特任研究助手

緒方 陽子 (Ogata Yoko)
熊本大学・大学院生命科学研究部 消化器
外科学・技術補佐員