

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19888

研究課題名(和文)食道癌に対する化学療法感受性および副作用予測におけるABCトランスポーターの意義

研究課題名(英文)Significance of ABC transporter in predicting response and adverse effect of chemotherapy for esophageal cancer

研究代表者

牧野 知紀(Tomoki, Makino)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80528620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ABC transporterのうち特にABCC2について、切除サンプルを用いた定量的RT-PCR法および免疫組織染色により術前無治療症例と比較して術前化学療法症例で、また術前化学療法奏効例より非奏効例で食道癌腫瘍のABCC2発現が有意に高いことを見出した。また、切除サンプルでABCC2高発現症例は低発現症例より予後不良であった。食道扁平上皮癌細胞株パネル(TE1,5,6,9,10,11,14,15)を用い、ABCC2発現解析と化学療法耐性(とくにDDP)との相関を認めた。なおABCC2発現と化学療法副作用との明らかな相関は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Expression of ABCC2 (one of ABC transporters), assessed by quantitative RT-PCR and immunohistochemistry (IHC), was found to be increased in esophageal cancer with vs without preoperative chemotherapy, and non-responders vs responders to preoperative chemotherapy. In resected specimen, cases with high ABCC2 expression showed more favorable survival compared ones with low ABCC2 expression. In a panel of esophageal cancer cell lines (TE1,5,6,9,10,11,14,15), high ABCC2 expression was significantly associated resistance to chemotherapy, in particular cisplatin. However no apparent relation was identified between ABCC2 expression and adverse effect of chemotherapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ABCトランスポーター 食道癌 化学療法 副作用

### 1. 研究開始当初の背景

予後不良な進行食道癌において化学療法の効果は決定的な予後因子の一つでありこれを治療前に予測できればテーラーメイド治療確立へ大きな1歩となりその臨床的意義は計り知れない。今回、一部の癌で化学療法耐性や副作用に密接に関連するとされる ATP-binding cassette (ABC) transporter に着目し、これらの食道扁平上皮癌における発現、あるいは食道癌患者の正常組織における遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism: SNPs) を同定する。これらと化学療法の効果や副作用・予後との関連を明らかにし、その分子メカニズム解明をくわえ最終的に臨床応用しうる化学療法効果および副作用予測システムを確立することを目的とする。

### 2. 研究の目的

近年切除可能進行食道癌において術前化学療法が標準治療となり、食道癌治療における化学療法の役割は大幅に増した。しかし化学療法の non-responder では予後の改善に寄与しない上に、深刻な副作用・手術時期の遅延・コスト面など多大なデメリットを蒙ることになる。化学療法は治療効果に対して個体間格差が大きくそれを治療前に予測することは困難であるが、実現すれば個々の症例に応じたテーラーメイド治療を確立でき、その臨床的意義は計り知れない。ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily は主に細胞膜に発現し ATP 依存的に種々の抗癌剤を細胞外に排出するポンプとして働き、腫瘍モデルや臨床、卵巣癌、膵癌、白血病などでこれら transporter 発現や正常組織の single nucleotide polymorphism (SNPs) が化学療法耐性に関係することが知られている。実際に近年 ABC transporter のひとつの ABCB1 の inhibitor (P-glycoprotein) がいくつかの癌種で臨床応用 (phase III) され、一部の報告では乳癌において化学療法との併用で臨床効果がみられている。一方、ABCC transporter は正常の肝・腎臓、消化管などに発現し種々の生理活性物質・薬物・毒物を体外に排出するため、正常組織の transporter 活性低下は抗癌剤の排出阻害による血中・組織内濃度の増大、すなわち重大な副作用を引き起こす。

一方で Multidrug resistance protein 2 (MRP2; ABCC2 or cMOAT) は 48 種類ある ABC transporter のひとつであり肝細胞、腎、小腸などに発現する。In vitro では卵巣癌、肝細胞癌、胆嚢癌、大腸癌の cisplatin 耐性細胞株は MRP2 を高発現していることが報告されており、多剤耐性メカニズムのひとつと認識されている。また肺癌では正常組織の MRP2 の対立遺伝子変異が化学療法の副作用と相関することが報告されている。

しかし、食道扁平上皮癌 (ESCC) においてはこれら ABC transporter 発現プロファイルや正常組織の SNPs と化学療法耐性・副作用との関係性はいまだ明らかにされていない。

### 3. 研究の方法

初年度は食道扁平上皮癌切除サンプル・食道癌細胞株における各 ABC transporter 発現解析を行い、それらと臨床病理学的因子および予後についての関連を検討する。また腫瘍における化学療法前後での各 ABC transporter 発現変化と化学療法副作用・効果との関連について検討し生体サンプルを用いて内因性の耐性および獲得耐性についての理解を深める。また、(後述する) 関連施設のデータベースを用いて日本人の食道扁平上皮癌患者に多くみられる ABC transporter の SNPs を同定する。次年度は食道扁平上皮癌細胞株パネルを用い、ABC transporter 発現解析と化学療法耐性との関連、遺伝子発現操作による化学療法耐性変化の検討、食道扁平上皮癌における耐性獲得のメカニズム解明を in vitro モデルにより行う。また前述のデータ解析で同定された SNPs と化学療法副作用との関連性を食道癌患者の治療前血液サンプルを用いて検討する。

#### (1) 食道癌における ABC transporter 発現と臨床病理因子・予後との関連の検討

当施設で保存している術前無治療食道癌切除サンプル 100 症例から RNA 抽出する。抽出方法はすでに確立されており、抽出した RNA の質は Agilent 2100 bioanalyzer を用いてチェックを行う。各 ABC transporter (MDR1, BCRP, MRP1-5) の遺伝子発現解析は定量的 RT-PCR 法により行い、タンパク発現解析については各 ABC transporter の抗体を購入し IHC によるスコアリング評価を行う。統計ソフト (JMP) を用いてこれらの発現データと臨床病理学的因子・予後と関連のある transporter を同定する。

#### (2) 食道癌における化学療法前後での ABC transporter 発現変化と化学療法効果・予後との関連の検討

術前化学療法を施行した食道扁平上皮癌 40 症例において同一症例で 3 つのタイムポイント (化学療法前内視鏡生検サンプル、化学療法後内視鏡生検サンプル、および手術切除サンプル) で採取し腫瘍における各 ABC transporter (MDR1, BCRP, MRP1-5) 発現解析を定量的 RT-PCR 法および IHC にて行う。これらの結果と治療効果 (臨床効果: primary tumor は 2 方向測定、リンパ節は RECIST、組織効果: 食道癌取扱い規約 grade 分類)、予後 (Overall survival、

progression-free survival)、およびその他の臨床病理学因子との相関をそれぞれ検討する。

### (3) 日本人の食道癌扁平上皮癌患者にみられる ABC transporter の Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) の同定

関連施設(九州大学医科学研究所)に術前無治療食道扁平上皮癌患者の血液(リンパ球)サンプル1071例および健常者コントロール血液サンプル2762例の全エクソンシーケンス解析データおよびそれに対応した詳細な臨床データを所有している(Tanaka F et al *Gut* 2010)。当研究ではこれを用いて各 ABC transporter(MDR1、BCRP、MRP1-5)における日本人の食道扁平上皮癌患者に多い代表的なSNPsをこれらのデータ解析から同定する。

### (4) 食道扁平上皮癌細胞株パネルにおける各 ABC transporter 発現解析、化学療法耐性との相関、遺伝子発現操作による化学療法耐性変化の検討(in vitro 解析)

食道扁平上皮癌細胞株パネルを用いて各 ABC transporter の遺伝子・タンパク発現解析を行う。それらと 3 種類の各抗がん剤(cisplatin、docetaxel、5-FU)に対する耐性(IC<sub>50</sub>)との相関を検討する。また各耐性株樹立やそれに伴う細胞内シグナル伝達の検索など耐性獲得の機序についての解明も行う。同定されたシグナル経路について、低分子阻害剤、抗体医薬、遺伝子治療(遺伝子導入、RNAi)等の手法を用いて阻害をかける。その評価項目として、シグナルの抑制が得られているかどうか確認の後、MTT assay などの細胞増殖評価、細胞周期、アポトーシスの誘導などが得られるかどうかを試みる。

### (5) 化学療法の効果および副作用における正常組織での ABC transporter SNPs の意義について検討

術前化学療法を施行した食道扁平上皮癌患者 40 例(先述の計画 2.と同一患者)の治療前血液(リンパ球)サンプルを prospective に回収し、専用 kit を用いてゲノム DNA の抽出を行い、先述の計画 3.で同定した ABC transporter(MDR1、BCRP、MRP1-5)の SNPs 解析を Taqman assay を用いた Genotyping により行う(Tanaka et al. *Cancer* 2010, Campa et al. *Int J Cancer* 2012)。これらの SNPs の有無と化学療法の副作用(the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria version 3.0. に準じて leukocytopenia, anemia, thrombocytopenia, nausea, vomiting を含む項目で検討)および治療効果(臨床効果: primary tumor は 2 方向測定、リンパ節は RECIST、組織効果: 食道癌取扱い規約に基づいた grade 分類)、

予後との相関をこれらの血液サンプルを用いて検討する。また化学療法中の各薬物血中濃度もこれらの血液サンプルを用いて測定する(化学療法前、化学療法開始 1, 3, 7 日目)。また同一症例で切除サンプルにおける正常組織での各 ABC transporter 発現を IHC にて検討することで SNPs の機能性についても検証する。

### 4. 研究成果

ABC transporter のうち特に MRP2 について、術前化学療法 (NACT : cisplatin + 5-fluorouracil + doxorubicin)症例を含む食道扁平上皮癌 (ESCC) 81 例の手術切除サンプルでの検討では、NACT 後の腫瘍は非 NACT 症例より免疫組織染色法(IHC)による MRP2 発現が有意に高く(27.3 vs 5.4%)、この MRP2 高発現群は低発現群より有意に予後不良であった(5-year survival rate 25.6 vs 55.7% p=0.0272)。これと一致して NACT 後の腫瘍は非 NACT 症例より MRP2 mRNA 発現(定量的 RT-PCR)が 2.1 倍高かった。治療前内視鏡生検サンプル 42 例での検討では、NACT の non-responder は responder より MRP2 mRNA 発現が 2.9 倍高かった。8 種類の ESCC 細胞株を用いた検討では、MRP2 mRNA 発現の一番高い TE14 株は cisplatin に最も耐性を示した。また同細胞株を用いて siRNA により MRP2 発現を抑えると cisplatin 耐性が有意に改善したが、doxorubicin 耐性には変化無かった。以上より、MRP2 は食道扁平上皮癌において cisplatin 耐性(内因性および獲得耐性)に寄与する分子の一つであることが分かった。

なお今回の臨床検体を用いた解析においては MRP2 発現と NACT の副作用との明らかな相関は認めなかった。

### 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 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  
牧野 知紀 ( Tomoki, Makino )  
大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号:80528620

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者  
( )