

令和元年6月17日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10507

研究課題名(和文) レクチンマイクロアレイを用いた食道癌の再発予測マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of predictive marker for recurrence of esophageal cancer using lectin microarray

研究代表者

圓福 真一郎 (Empuku, Shinichiro)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30722342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食道がん患者の組織切片レクチンマイクロアレイシステムを用いて糖鎖発現を網羅的に解析した。臨床病期IからIIIまでの食道癌患者41名の正常およびがん組織切片の45種類のレクチンの発現を比較した。正常組織とがん組織で有意に減少しているレクチンはAOL(p=0.0035)などの4個であった。有意に増加しているレクチンはTJA-1(p=0.048)などの4個であった。多変量解析にて食道癌の再発に関連するレクチンPSA(p=0.009)が同定された。現在PSAのValidation studyを行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌の再発リスク因子となりうるレクチンを同定することによって、ハイリスク群とそうでない群とで、個別の治療方法の選択が可能になると思われる。個別化された治療は、患者にとっては副作用の軽減などから日常生活動作の改善につながると思われ、また社会的意義として述べるのならば、個別化治療による医療費削減に貢献できると思われる。それらの結果をもとに論文化を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We comprehensively analyzed glycan expression of an esophageal cancer specimen using a lectin microarray system. Expression of 45 types of lectins in normal esophagus and cancer tissue of 41 patients from 2008 to 2012 Compared. As a result, lectins significantly decreased in normal tissues are AOL (p = 0.0035), AAL (p = 0.002), PHA (L) (p = 0.004), ACA (p = 0.011). There were four lectins that increased significantly: TJA-1 (p = 0.048), HHL (p = 0.037), WFA (p = 0.031), and SBA (p = 0.014). In univariate analysis, four lectins of PSA (p = 0.011), AOL (p = 0.027), AAL (p = 0.042), DBA (p = 0.040) were identified. As a result of performing multivariate analysis based on the information from the clinic, one lectin, PSA (p = 0.009), was identified. The lectin was related to the recurrence of esophageal cancer. At present, we are investigating the validation of lectin PSA, and we are conducting research on expression of PSA in esophageal cancer tissue sections by immunostaining.(985 letters)

研究分野：腫瘍学

キーワード：食道癌 再発 腫瘍マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 食道癌は消化器癌のうちでも未だ治療困難であり、手術を受けても不幸にして再発することがある。術前化学療法により生存率は改善しているが、化学療法がよく効いた場合でも癌のコントロールは十分であるといえず、再発や予後に影響をあたえる要因の究明が必要とされている。切除後の病理組織検査でリンパ節転移が見つかった場合は再発の危険性が高くなることが知られているが、通常の組織学的検査でリンパ節転移のない患者様においても30~45%に再発がみられます。したがって通常の検索手法による再発予測は不十分であり、さらなる再発予測因子の探索が不可欠であると考えられる。

(2) 現在の消化管癌の再発高リスク因子として、リンパ節転移、深達度、リンパ管侵襲、脈管侵襲、未分化癌、腫瘍径がある。一方で、消化管癌の再発予測バイオマーカーとして、EGFR, HER2, VEGF, TGF β , BRAF, E-Cadherin, CD44, CD20, p53 が挙げられる。食道癌では、特異的な再発予測バイオマーカーとして、CEA, SCC, CYFRA のほかに、微小癌転移巣と再発や予後との相関が報告され、予後予測因子として期待されている。しかし、これらいずれのバイオマーカーによる癌診断の補助、進行癌の治療モニター、予後、再発の予測などの検討はいくつかはなされているが、単独に使用しても臨床的に極めて有用であるとは言い難い。

2. 研究の目的

研究の目的は消化管癌の中でも、食道癌に特有の再発予測因子について臨床応用が可能な糖鎖レクチンのマイクロアレイ解析による新規バイオマーカーを同定することである。

3. 研究の方法

(1) 対象

病理学的に診断された食道扁平上皮癌患者を2008年から2012年の間に大分大学医学部消化器外科で外科的に切除された標本から選択した。この研究では、術前化学療法も化学放射線療法も受けていない連続したステージ0~IIIの食道癌患者41名を対象とした。これらの41人の患者のうち、10人の患者がリンパ節転移の7人、肺の1人、肝臓の1人、椎骨の1人を含む再発を発症した。

(2) 組織サンプル

41個のパラフィン包埋食道癌組織サンプルをスライドガラス上に置き、脱パラフィン処理した。レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用いて、同様の容積を含むよう2mmの直径を有した正常組織およびがん組織をスライドガラスから採取した。

(3) レクチンマイクロアレイ

製造元のプロトコルを使用して、前述のようにレクチンマイクロアレイを実施した。詳細には、リン酸緩衝食塩水(PBS)でサンプルを3回洗浄し、遠心分離によってペレットを回収した。0.5%Nonidet P-40を含む20 μ LのPBSで再度懸濁し、続いてBioruptor UCW-310(Cosmo Bio, Carlsbad, CA, USA)で超音波処理した。Micro BCA タンパク質アッセイ試薬キット(Thermo Fisher Scientific Inc., 米国イリノイ州ロックフォード)を用いてタンパク質濃度を滴定し、PBSで15 μ g/mLに希釈した。Probing Solution(GP Bios

ciences Ltd.、東京、日本)を用いてシアニン3蛍光色素で100 μ L容量の糖タンパク質画分を標識し、Lecchip(商標)(GP Bioscience Ltd.)の各ウェルにアプライした。次に、LecChipTMの画分を暗所(20 $^{\circ}$ Cで湿度>80%)で15時間インキュベートした。バックグラウンドを減らすために、LecChipTMウェルを Probing Solution で3回洗浄し、サンプルを塗布しました。インキュベーション後、レクチンアレイの蛍光画像を得た。スキャナー(GlycoStationTMReader 1200; GP Biosciences Ltd.)を使用し、GlycoStationTMTool Pro Suite 1.5を使用してデータを分析しました。レクチン-グリカン相互作用(LGI)値は、45個のレクチンの平均強度を100%に設定することによって、45個の異なるレクチンにわたって正規化した。

(4) 免疫染色

免疫染色は標準的なプロトコルを参考にしてみた。詳細には、キシレンおよび段階的アルコール系列を使用して脱パラフィン処理した後、スライドを希釈された抗原アンマスキング溶液(Vector Laboratories、Burlingame、CA、USA)に浸してレクチン活性を高めた。

4. 研究成果

今回我々は、食道がんの摘出標本を用い、レクチンマイクロアレイシステムを用いて糖鎖発現を網羅的に解析した。2008年から2012年までの当施設で切除術を施行された臨床病期IからIIIまでの食道癌患者41名の正常食道組織切片とがん組織切片を用いて、それぞれ45種類のレクチンの発現を比較した。

食道組織(通常のおよびがん組織)の41名の患者のタンパク質は抽出され、45のレクチンの発現強度を得た。その結果、正常組織とがん組織で、有意に低下しているレクチンはAOL(p=0.0035)、AAL(p=0.002)、PHA(L)(p=0.004)、ACA(p=0.011)の4レクチンであった。また有意に増加しているレクチンは、TJA-I(p=0.048)、HHL(p=0.037)、WFA(p=0.031)、SBA(p=0.014)の4つであった。また単変量解析にて食道癌術後の再発に関連するレクチンとして、PSA(p=0.011)、AOL(p=0.027)、AAL(p=0.042)、DBA(p=0.040)の4つの候補を同定できた。

ステージI-III食道がんの切除を受けた患者において、臨床病理学的要因と再発に関連したレクチン発現を比較した。10名の患者は、7人が遠隔リンパ節転移として、1人が肝転移、1人が肺転移、1人が脊髄転移で再発を認めた。

我々は、再発のない31名の患者グループと手術後の再発を認めた10名の患者グループの2つのグループに分けた。

単変量解析において、年齢や性別に有意差は認められなかった。またCYFLAとCEA、SCCにおいて、再発と相関は認められなかった。これとは対照的に、腫瘍部位(p=0.013)、リンパ管侵襲(p=0.040)、静脈侵襲(p=0.047)において有意差を認めた。グループの間でROCカーブを使ってカットオフポイントを決定し、各々のレクチンを分類した。

また単変量解析にて食道癌術後の再発に関連するレクチンとして、PSA(p=0.011)、AOL(p=0.027)、AAL(p=0.042)、DBA(p=0.040)の4つの候補を同定できた。その候補の中から臨床から得られた情報をもとに多変量解析を行った結果、食道癌の再発に関連する1つのレク

チン、PSA(p=0.009)を同定できた。実際に再発の有無の確認のために Kaplan-Meier 解析を行った結果、PSA 値が高値であった場合に再発する可能性が有意に高い (p=0.009) ことが確認された。

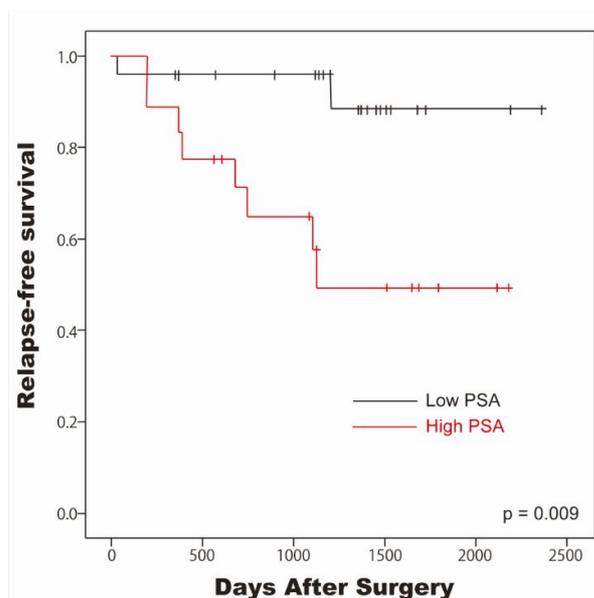
現在、レクチン PSA について検証を深めているところであり、免疫染色によって食道癌組織切片における PSA の発現について研究を進め、Validation study を行っている。それらの結果をもとに論文化を行う予定である。

Table 1. Differential glycan analysis between esophageal cancer tissue and normal control using data from 45 lectins.

	Normal average	Tumor average	T/N ratio	P-value
LTL	18.41	20.72	1.12	0.506
PSA	61.28	65.90	1.08	0.417
LCA	129.39	135.42	1.05	0.666
UEA _I	25.04	20.93	0.84	0.852
AOL	215.24	171.84	0.80	0.035
AAL	173.58	125.03	0.72	0.002
MAL _I	21.67	20.86	0.96	0.166
SNA	148.29	166.45	1.12	0.115
SSA	144.65	161.73	1.12	0.096
TJA-I	237.76	270.83	1.14	0.048
PHA(L)	12.45	11.19	0.90	0.004
ECA	11.76	14.78	1.26	0.081
FCA120	81.30	89.58	1.10	0.332
PHA(E)	127.96	142.60	1.11	0.052
DSA	403.26	401.40	1.00	0.982
GSL-II	39.40	4.66	0.12	0.323
NPA	99.39	107.37	1.08	0.312
ConA	239.45	221.71	0.93	0.337
GNA	72.78	84.87	1.17	0.066
HHL	18.16	21.64	1.19	0.037
ACG	86.66	92.55	1.07	0.241
TxLC _I	39.42	49.29	1.25	0.562
BPL	36.57	31.38	0.86	0.125
TJA-II	77.00	73.20	0.95	0.537
EEL	7.88	6.02	0.76	0.455
ABA	101.36	97.91	0.97	0.450
LEL	400.40	399.82	1.00	0.728
STL	507.69	491.18	0.97	0.799
UDA	256.99	249.72	0.97	0.952
PWM	30.58	26.45	0.86	0.438
Jacalin	180.30	203.80	1.13	0.085
PNA	14.20	2.10	0.15	0.664
WFA	22.01	25.76	1.17	0.031
ACA	95.00	76.86	0.81	0.011
MPA	31.46	42.17	1.34	0.257
HPA	41.81	44.17	1.06	0.871
VVA	6.08	9.26	1.52	0.138
DBA	12.91	9.16	0.71	0.823
SBA	7.91	9.91	1.25	0.014
Calsepa	97.20	101.06	1.04	0.444
PTL _I	5.29	3.37	0.64	0.529
MAH	16.69	20.11	1.20	0.060
WGA	165.81	172.34	1.04	0.945
GSL _A 4	18.72	17.68	0.94	0.678
GSL _B 4	4.00	4.24	1.06	0.264

Table 2 Correlation between recurrence and clinicopathological factors, in patients who underwent curative resection for stage I-III esophageal cancer.

Factors	Category	Recurrence(-) (n = 31)	Recurrence(+) (n = 10)	Univariate analysis P-value	Multivariate analysis P-value, RR (95%CI)
Age, mean ± SD (range)		66±10	63±6	0.219	-
Sex	Male	28	9	0.689	-
	Female	3	1		
SCC(ng/mL)	<1.5	21	9	0.250	-
	≥1.5	8	1		
CYFRA(ng/mL)	<2.3	22	7	0.367	-
	≥2.3	5	3		
CEA(ng/mL)	<5	26	8	0.556	-
	≥5	5	2		
Site	Upper	3	5	0.463	-
	Mid-Low	28	5		
Tumor invasion	T1T2	29	7	0.083	-
	T3T4	2	3		
Lymph node status	N(-)	22	4	0.084	-
	N(+)	9	6		
lymphatic invasion	ly(-)	18	2	0.040	0.016 23.148 (1.780-300.999)
	ly(+)	13	8		
venous invasion	v(-)	28	6	0.047	N.S.
	v(+)	3	4		
Histology	well_mod	26	10	0.400	-
	por	3	0		
pStage	0, I, II	28	6	0.045	-
	III, IV	3	4		
PSA	low	21	2	0.011	0.009 17.646 (2.050-151.910)
	high	10	8		
AOL	low	19	2	0.027	N.S.
	high	12	8		
AAL	low	21	3	0.042	N.S.
	high	10	7		
DBA	low	17	2	0.040	N.S.
	high	10	7		



5. 主な発表論文等

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。