

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10663

研究課題名(和文) 大腸癌肝転移における抗酸化ストレス蛋白質発現の臨床的意義と抗癌剤耐性機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of clinical significance and chemotherapy resistance mechanism of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) expression for colorectal liver metastasis

研究代表者

中野 麻恵 (Nakano, Mae)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：20790281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：NQO1は生体内におけるストレス環境下で発現が亢進する抗酸化ストレス蛋白質である。大腸癌肝転移においてNQO1発現が術前化学療法の効果と予後にどのように影響をおよぼすかについて研究した。本研究では、当院で手術を受けた大腸癌肝転移患者の切除標本に対して、モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学を行い、NQO1の発現を解析した。NQO1発現のある患者の予後は悪く、NQO1遺伝子多型のある患者は遺伝子多型のない患者より化学療法の効果があった。NQO1の発現パターンは、予後や化学療法の治療効果を予測できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の既存のバイオマーカーであるRAS/BRAF変異に加え、大腸癌のNQO1発現や遺伝子多型を評価することにより、大腸癌肝転移に対する術前化学療法の効果予測が可能となり、薬物療法効果予測を基盤とした新しい治療戦略が構築できると言える。

研究成果の概要(英文)：NQO1 is an antioxidant stress protein. The expression of NQO1 is enhanced under stressed environment in vivo. We studied how NQO1 expression affects response of preoperative chemotherapy and prognosis in colorectal liver metastasis. In this study, immunohistochemistry using monoclonal antibody was performed on the resected specimen of colorectal liver metastasis, and the expression of NQO1 was analyzed. The NQO1 positive group had worse overall survival than the NQO1 negative group, and the presence of NQO1 polymorphism was associated with a better response to preoperative chemotherapy. The expression pattern of NQO1 can predict the prognosis and the response of preoperative chemotherapy in patients with colorectal liver metastasis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌肝転移 NQO1 薬剤抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

切除可能な大腸癌肝転移に対する術前補助化学療法の主な目的は、腫瘍の生物学的評価や潜在的転移巣への治療、切除範囲の縮小である。しかし、非奏効例は切除不能になるリスクもあるため、大腸癌肝転移の術前補助化学療法において、化学療法の効果を予測するマーカーが求められている。

GTP 結合蛋白である RAS は EGFR 下流のシグナルを伝達する。RAS 遺伝子変異によって RAS 蛋白が恒常的に活性化されると EGFR シグナルとは無関係に Oncogenic Ras-MEK-ERK pathway が活性化される。そのため、RAS 遺伝子変異の有無は、抗 EGFR 抗体薬の効果を予測する重要な因子であり、大腸癌領域では臨床的有用性が確立している。しかし、RAS 野生型であっても抗 EGFR 抗体薬の奏効率の上乗せは 10-30%程度であり、Oncogenic Ras-MEK-ERK pathway とは別の経路が治療抵抗性に関与していると考えられる。

近年、抗酸化ストレス蛋白質である NQO1 が癌細胞における放射線・抗癌剤耐性に関与しているとの報告が散見される。そこで、細胞内での様々なストレスに対する生体防御機構の一つである、p62/Keap1/Nrf2/NQO1 pathway に着目した。Nrf2 はユビキチンリガーゼアダプタータンパク質である Keap1 によりユビキチン化されることで分解が促進される。しかし、細胞がストレスに暴露されると Nrf2 の分解が抑制される。また、同じく生体防御機構の一つである選択的オートファジーと p62/Keap1/Nrf2/NQO1 pathway が連動することも明らかとなっている。すなわち、選択的オートファジーにより分解される構造体にはリン酸化された p62 が集積しており、これが Keap1 と競合的に結合することで、Nrf2 の分解が抑制される。こうして安定化した Nrf2 が核内へ移行し、転写因子として抗酸化ストレス蛋白質の発現を誘導する。NQO1 は様々なストレスに対する生体防御機構を担う抗酸化ストレス蛋白質の一つだが、抗癌剤や放射線照射治療時には癌細胞内で誘導されることで治療抵抗性に関与すると考えられている。また、われわれは、Nrf2 が癌細胞内で代謝関連遺伝子を活性化し、グルコース、グルタミン代謝を再編成することで、抗癌剤耐性や細胞増殖の促進に寄与していることを報告した。

これまでにわれわれは肝内胆管癌における NQO1 発現の関連性を報告した。その中で、NQO1 発現は腫瘍の組織分化度に関与し、切除後の予後と関連があることを明らかにしている。また、切除不能・再発大腸癌を対象に RAS 変異および NQO1 発現の有無と予後を比較した Pilot study において、RAS 野生型 NQO1 陰性大腸癌は RAS 野生型 NQO1 陽性大腸癌と比較し、有意に生存期間が延長していることを明らかにした。

以上より、大腸癌における薬物療法耐性機序には、Oncogenic Ras-MEK-ERK pathway 非依存性の p62/Keap1/Nrf2/NQO1 pathway が関与していると推測される。われわれは「大腸癌薬物療法耐性の機序には、抗酸化ストレス蛋白質である NQO1 の発現が関与しており、NQO1 の発現は大腸癌肝転移に対する術前補助化学療法の効果を予測するマーカーになり得る」という仮説をたて、本研究を企画した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「抗酸化ストレス蛋白質である NQO1 発現が大腸癌肝転移に対する術前補助化学療法の効果予測マーカーとなり得るか否かを明らかにすること」である。

## 3. 研究の方法

大腸癌原発巣および肝転移での NQO1 発現パターンを解明するために、モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学を行い、その発現形式を病理学的に解析した。NQO1 発現には遺伝子多型が存在し、生来 NQO1 を発現することができない症例が一定の割合で存在した。その一例として、C609T の置換により特徴づけられる NQO1\*2 が知られている。肝内胆管上皮は、常に胆汁というストレス環境にさらされているため、恒常的に NQO1 を発現していた。しかし、NQO1 遺伝子多型の症例では、正常肝内胆管において NQO1 発現が認められないことから、正常肝内胆管の NQO1 発現の有無により遺伝子多型の症例を抽出することが可能であった。そこで、原発巣と肝転移巣における NQO1 発現比較、および NQO1 遺伝子多型の有無を明らかにするため、原発巣、肝転移、および正常肝内胆管の 3 つの部位について NQO1 発現を評価した。

大腸癌原発巣および肝転移での NQO1 発現と NQO1 多型の有無を比較し、臨床データ(抗腫瘍効

果、予後)の関連性を明らかにした。臨床効果判定には CT/MRI/PET-CT などの画像診断を用いた。化学療法判定には RECIST v1.1 を使用し、PR 以上を奏功とした。予後は統計学的に評価した。

#### 4. 研究成果

大腸癌肝転移 88 例のうち術前化学療法を施行されたのは 30 例であった。腫瘍細胞における NQO1 発現から NQO1 陽性群と NQO1 陰性群に分けられた。また、NQO1 発現には遺伝子多型が存在し、生来 NQO1 を発現することができない症例が存在することから、通常 NQO1 発現陽性を示す肝内胆管の非腫瘍性上皮細胞において、NQO1 発現有する NQO1 非多型群と NQO1 多型群に分けられた。

結果は、NQO1 陽性群が 61 例 (69.3%)、NQO1 陰性群が 27 例 (30.7%) であった。また、NQO1 非多型群が 69 例 (78.4%)、NQO1 多型群が 19 例 (21.6%) であった。NQO1 陽性群は NQO1 陰性群と比較して、術後成績は有意に不良であった (累積 5 年全生存率: 90.9%対 66.5%、 $P=0.026$ )。また、NQO1 陽性は全生存の独立した予後不良因子であった (ハザード比 5.296、 $P=0.007$ )。大腸癌肝転移に対する術前化学療法の効果については、NQO1 多型群が NQO1 非多型群よりも有意に奏効率が高かった (奏効率: 100%対 40.9%、 $P=0.004$ )。

NQO1 発現陽性は、大腸癌肝転移の肝切除後の予後不良因子である可能性がある。NQO1 多型の存在は、大腸癌肝転移の術前化学療法の効果予測マーカーとなり得る可能性がある。

現在、研究成果をまとめて英文論文を執筆し、投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 相馬大輝、坂田純、小林隆、滝沢一泰、三浦宏平、堅田朋大、石川博補、廣瀬雄己、峠弘治、油座築、安藤拓也、田島陽介、市川寛、羽入隆晃、永橋昌幸、中島真人、島田能史、亀山仁史、若井俊文
2. 発表標題 大腸癌肝転移に対する術前化学療法 NQ01発現を用いた治療効果予測の可能性
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣瀬雄己、坂田純、安藤拓也、油座築、峠弘治、堅田朋大、三浦宏平、滝沢一泰、小林隆、永橋昌幸、島田能史、亀山仁史、若井俊文
2. 発表標題 大腸癌肝転移におけるNQ01発現が肝切除術後の遠隔成績に与える影響
3. 学会等名 第26回日本消化器関連週間（第17回日本消化器外科学会大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣瀬雄己、坂田純、小林隆、滝沢一泰、三浦宏平、堅田朋大、永橋昌幸、島田能史、市川寛、亀山仁史、若井俊文
2. 発表標題 NQ01 Expression Predicts OS and Response to Preoperative Chemotherapy in Colorectal Liver Metastasis
3. 学会等名 14th ANNUAL ACADEMIC SURGICAL CONGRESS（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	亀山 仁史  (Kameyama Hitoshi)  (40626420)	新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員    (13101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松田 康伸 (Matsuda Yasunobu)  (40334669)	新潟大学・医歯学系・准教授  (13101)	
研究分担者	坂田 純 (Sakata Jun)  (70447605)	新潟大学・医歯学系・講師  (13101)	
研究分担者	小林 隆 (Kobayashi Takashi)  (40464010)	新潟大学・医歯学総合病院・講師  (13101)	
研究分担者	若井 俊文 (Wakai Toshifumi)  (50372470)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究協力者	中野 雅人 (Nakano Masato)		
研究協力者	小柳 英人 (Oyanagi Hideto)		
研究協力者	田中 花菜 (Tanaka Kana)		
研究協力者	相馬 大輝 (Soma Daiki)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	島田 能史  (Shimada Yoshifumi)		
研究協力者	阿部 馨  (Abe Kaoru)		