

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461980

研究課題名(和文)食道癌のDNA修復機構に着目した化学・放射線療法感受性の分子機序解明

研究課題名(英文) Investigation of chemoradiation sensitivity based on the DNA repair mechanism in esophageal carcinoma

研究代表者

伊藤 修平 (Ito, Shuhei)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10706914

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)：DNA損傷に関するPARPの阻害剤(Olaparib)を用いた細胞遺伝学的解析により、正常細胞において、ゲノム不安定性の指標である姉妹染色分体交換、染色体異常の増加をそれぞれ、5-10倍、2-6倍認めた。PARP阻害剤は正常細胞にもゲノム不安定性を引き起こすため、非腫瘍性疾患や早期癌の治療、また予防的投与として使用する場合は、特に十分な配慮が必要と考えられた。また、食道癌組織を用いた免疫関連分子の発現の検討では、PD-L1高発現/HLA class I 高発現は独立した予後不良因子であり、PD-L1、HLA class I 発現の評価が、予後予測に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We quantified cytogenetic alterations of human cells exposed to PARPi by both sister chromatid exchange (SCE) assays and chromosome spreading. Clinically relevant doses of the FDA-approved olaparib led to a marked increase of SCEs (5-10-fold) and chromatid aberrations (2-6-fold). Genomic instability arising from PARPi warrants consideration, especially if these agents will be used in people with early stage cancers, in prevention strategies or for non-oncologic indications. Programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) and human leukocyte antigen (HLA) class I molecules on malignant cell surfaces are pivotal for tumor immunity. PD-L1 and HLA class I protein expression was investigated by immunohistochemical staining of resected specimens from 90 ESCC patients who underwent radical surgery without preoperative therapy. High PD-L1 expression was a significant independent prognostic factor in ESCC patients with high HLA class I expression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：DNA2重鎖修復 染色体不安定性 姉妹染色分体交換 PARP阻害剤 腫瘍免疫 PD-L1 HLA Class

1. 研究開始当初の背景

(1) 化学放射線療法の治療効果予測

切除可能な clinical stage の食道癌に対し、手術に先立って術前に抗癌剤を投与する術前補助化学療法による生存率向上が認められ (JCOG9907, Ando N et al. *Ann Surg Oncol* 2011) 現在、標準治療となっている。しかし、術前治療中の原発巣の増悪により、手術不能となる症例が存在することも事実である。また、切除不能な clinical stage の食道癌に対しては、根治的な化学放射線療法が行われているが、根治照射後の遺残癌に対する salvage 手術は極めて危険性が高い。我々は、食道癌術前放射線照射例における各免疫パラメーター (総リンパ球数、Bリンパ球、リンパ球幼弱化能、NK 活性) が、手術単独例より低下していることを報告しており (Tsutsui S, Morita et al. *J Surg Oncol* 1992) このことは、治療効果の期待できない症例に対する術前治療は、患者の免疫力低下を来すのみであり、手術合併症増加につながることを示唆している。よって、化学療法、放射線療法感受性の分子機構を解明し、治療効果が期待できる症例を選別することは極めて重要である。今回、我々は、食道癌に対し標準治療として用いられるシスプラチンが誘導する鎖間架橋 (ICL: Interstrand crosslink) や、放射線治療が引き起こす DNA2 重鎖切断に対する修復経路である相同組み換え修復 (HR: homologous recombination) (Wooster R et al. *N Engl J Med* 2003) に関与する蛋白 (RAD50, MRE11, NBS1, BRCA1, BRCA2, RAD51, RAD54 など) に着目した。我々の研究室では、これまでに食道癌の治療前生検標本の免疫組織化学染色により、p53, p21, Rad51 タンパク質の発現が、放射線化学療法の治療効果予測因子になりうることを報告してきた (Ishida M et al. *Anticancer Res* 2007, Nakanoko T et al. *Ann Surg Oncol* 2013) また、我々は、食道癌において、p14 メチル化が癌の悪性度と関連し、予後不良因子であること (Ito S et al. *Anticancer Res* 2007) や、p53 遺伝子変異を高頻度に認めること (Egashira et al. *J Surg Oncol* 2011, Egashira et al. *Cancer Sci* 2007) さらに、癌部において、酸化的 DNA 損傷マーカー (8-OHdG) の上昇とその修復系 (OGG1) の低下を認めること (Kubo et al. *Dis Esophagus* 2013) を報告してきた。また、SNP-CGH を用いたゲノム解析技術により、p53 遺伝子変異を伴う食道癌では、染色体不安定性に伴って起こる p53 遺伝子座のコピーニュートラル LOH が発癌に関与していることを提唱した (Saeki H et al. *Clin Cancer Res* 2011) このような様々なエピジェネティックな変化、ジェネティックな変化、染色体異常が、放射線化学療法の感受性に影響を与えている可能性が考えられる。一方、食道癌は食道内に多発する頻度が高いが、それぞれの病変で p53 遺伝子の status が異なっており、多

発癌が独立して発生するという癌領域発生 (field carcinogenesis) を、我々は提唱してきた (Ito S et al. *Int J Cancer* 2005) が、このように、個々の病変が異なる生物学的特性を有すると考えられることが、治療効果予測を困難なものにしていることも事実である。

(2) 新規分子標的薬の出現

近年、分子生物学の進歩に伴い、癌に対する分子標的治療薬が注目を浴びており、臨床試験にて乳癌、卵巣癌などに対するポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) 阻害剤の有望な成績が報告されている。PARP は、DNA 切断部位に結合して DNA 修復蛋白質を損傷部位に引き寄せることにより、DNA 修復を促進する。DNA2 本鎖切断に対する相同組換え修復に必須である BRCA1/BRCA2 が欠損している腫瘍細胞では、DNA 修復は PARP に依存しているため、PARP 阻害剤に対して強い感受性を示す。このような癌治療に対するアプローチは合成致死 (Synthetic lethality) と呼ばれている。食道癌に対しては、世界各国の標準治療にばらつきがあること、食道癌患者数が比較的少ないことより、共通の臨床試験が展開されにくく、有効な分子標的薬の導入が遅れているのが現状である。しかし、食道扁平上皮癌において、BRCA1 遺伝子の LOH を高頻度に認める (Mori T et al. *Cancer Res* 1994) ことは、食道癌に対して、PARP 阻害薬が有効である可能性を示唆している。また、非小細胞肺癌、精巣腫瘍、頭頸部癌において PARP 阻害薬が、シスプラチンや放射線の感受性を増強するという報告がある (Michels J et al. *Cell Cycle* 2013, Cavallo F et al. *PLoS One* 2012, Nowsheen S et al. *Radiother Oncol* 2011) これらより、鎖間架橋形成薬剤であるシスプラチン、放射線が DNA に及ぼす DNA2 重鎖切断に着目し、さらに PARP を阻害することで選択的化学療法に関して新たな知見が得られることが予測される。一方、正常ヒト細胞においては、PARP 阻害剤の細胞毒性は比較的少ないと考えられているが、ゲノムレベルでの毒性に関するデータは十分ではない。研究代表者は、これまでに (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, Research Fellow) 正常ヒト細胞において、PARP 阻害薬である olaparib は、細胞毒性を来さない濃度で、DNA 損傷マーカーである姉妹染色分体交換 (SCE: sister chromatid exchange) (図 1) や染色体の構造異常の増加 (図 2) を認め、PARP 阻害薬がゲノム不安定性を誘導したことを報告した (AACR-NCI-EORTC International Conference, Molecular Targets and Cancer Therapeutics 2011, San Francisco, CA, oral presentation) したが、化学放射線療法との相互作用、その他の PARP 阻害薬 (ABT-888, BSI-201 など) の正常ヒト細胞のゲノムに与える影響など、依然明らかではない。

図1. PARP阻害薬投与によるSCEの増加

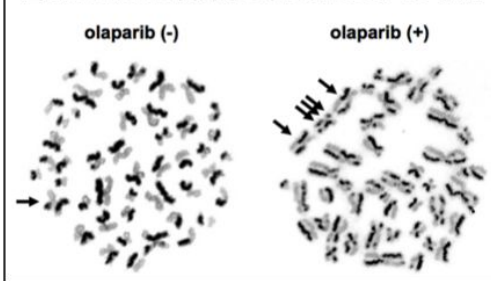
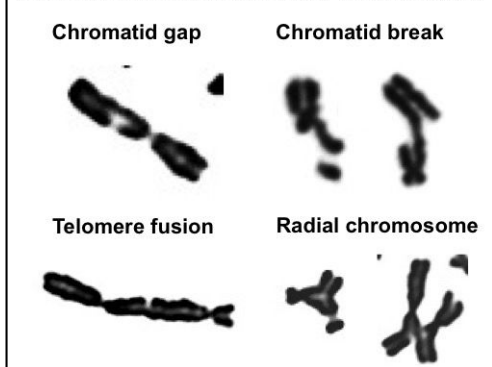


図2. PARP阻害薬投与による染色体の構造異常



2. 研究の目的

食道癌は、手術成績向上に伴う遠隔成績向上は認められるものの、手術単独ではコントロール不良であり、いまだ極めて予後不良な癌である。よって、治療成績向上のためには、手術、化学療法、放射線療法からなる集学的治療のさらなる発展が望まれる。さらに、欧米では腺癌が多くを占めるのに対し、わが国では扁平上皮癌が多いのが特徴であり、わが国独自の治療法の確立が不可欠である。本研究では、DNA修復機構に着目した食道癌における化学放射線療法の感受性予測因子の検討を行い、さらに新規分子標的薬であるPARP阻害薬の化学放射線増強作用とゲノムレベルでの毒性（ゲノム不安定性）を明らかにすることにより、食道癌の予後を著明に改善する革新的な治療戦略を提唱し、個別化治療へと展開することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)術前無治療の食道癌切除標本、放射線療法後に手術を施行した治療前生検標本を用い、DNA2重鎖切断修復関連遺伝子変異、蛋白発現と術前化学放射線療法の治療効果の関連性を明らかにし、治療感受性予測因子を同定する。
(2)細胞株を用い、PARP阻害薬の放射線化学療法増強効果とDNA2重鎖切断修復関連蛋白発現との関連性を明らかにする。さらに、正常ヒト細胞株を用い、各PARP阻害薬がゲノムレベルで与える影響を評価する。
上記の解析より、化学放射線療法に関する個別化治療や、新規分子標的薬による治療感受

性増強などの斬新的な治療戦略を構築する。また新規分子標的薬のゲノム不安定性に関する新しい知見を得ることにより、実臨床にフィードバックする。

(3)癌の宿主免疫回避機構に重要な役割を果たしているPD-L1、HLA class の癌組織における発現の予後に与える影響、化学放射線療法の効果に与える影響に関して検討する。

4. 研究成果

(1)ヒト正常細胞におけるPARP阻害剤によるゲノム不安定性の検討

ヒト正常細胞を用いて、現在臨床試験で使用されているPARP阻害剤(olaparib、ABT-888、BSI-201)の遺伝毒性の検討を行った。Olaparibを用いた細胞遺伝学的解析により、ゲノム不安定性の指標である姉妹染色分体交換、染色体異常の増加をそれぞれ、4.4-9.6倍、1.7-5.5倍認めた。また、Olaparib、ABT-888は、細胞内PARP活性を著しく抑制し(97%)、BRCA1/BRCA2欠損細胞はこの2剤に高感受性を示した。一方、BSI-201によっては、姉妹染色分体交換の増加を認めず、PARP活性の抑制はolaparib、ABT-888と比較し軽度であった(60%)。これらの結果より、PARP阻害剤は正常細胞にもゲノム不安定性を引き起こすため、非腫瘍性疾患や早期癌の治療、また予防的投与として使用する場合は、特に十分な配慮が必要と考えられる。

(2)食道癌におけるPD-L1、HLA class 発現を用いた腫瘍免疫能評価と予後の関連性に関する検討

術前無治療で根治手術を施行された食道扁平上皮癌症例90例を対象に、PD-L1、HLA class 発現を免疫染色にて評価し、臨床病理学的因子、予後、再発形式との関連を検討した。【結果】背景因子：平均年齢62.7±9.4歳(38歳~82歳)、男性/女性80/10例。

PD-L1、HLA class 発現と臨床病理学的因子：PD-L1発現と年齢、性別、病変長径、組織型、リンパ管侵襲、静脈侵襲、壁内転移、食道多発癌の有無に相関を認めなかったが、PD-L1高発現群では、壁深達度の深い症例(P=0.0379)、リンパ節転移症例(P=0.0031)が有意に多かった。HLA class 発現と臨床病理学的因子に有意な相関を認めなかった。

PD-L1、HLA class 発現と予後：PD-L1低/高発現群において、全5年生存率(平均観察期間45.4ヶ月)：60.9%/28.4%(P=0.0110)、5年無再発生存率(平均観察期間36.7ヶ月)：41.2%/17.7%(P=0.0542)であり、PD-L1高発現群で予後不良であった。HLA class 低/高発現と予後の相関を認めなかった。PD-L1、HLA class 発現で4群に層別化すると、HLA class 高発現/PD-L1高発現群は、全生存率、無再発生存率ともに、他の3群と比較し予後不良であった(ともにP<0.05)。一方、HLA class 低発現群では、PD-L1低/高発現で全生存率、無再発生存率に有意な差を認めな

った。また、単変量解析で有意であった予後因子をCox回帰分析で多変量解析すると、HLA class 高発現/PD-L1 高発現は、全生存率、無再発生存率に有意に関連する独立した予後因子であった(全生存率: HR 4.39, 95%CI 1.40-12.53, P=0.0128; 無再発生存率: HR 3.46, 95% CI 1.18-9.03, P=0.0259)。PD-L1 発現と再発形式: PD-L1 低/高発現群における再発率は、41.1%/76.5%と高発現群で高く(P=0.0085)、特にリンパ節・局所再発: 38.4%/76.5%(P=0.0045)、播種再発: 4.1%/17.6%(P=0.0439)が高発現群で多かった。以上より、食道癌においてPD-L1 高発現/HLA class 高発現症例は予後不良であり、PD-L1、HLA class 発現の評価が、予後予測に有用と考えられた。

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4件)

- 1) Tsutsumi S, Saeki H, Nakashima Y, Ito S, Oki E, Morita M, Oda Y, Okano S, Maehara Y. PD-L1 expression at tumor invasive front is associated with EMT and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2017 [Epub ahead of print] (査読有) doi:10.1111/cas.13237
- 2) Ito S, Murphy CG, Dobrovina E, Jasin M, Moynahan ME: PARP inhibitors in clinical use induce genomic instability in normal human cells. *PLoS One* 11(7): e0159341, 2016 (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0159341
- 3) Ito S, Okano S, Morita M, Saeki H, Tsutsumi S, Tsukihara H, Nakashima Y, Ando K, Imamura Y, Ohgaki K, Oki E, Kitao H, Mimori K, Maehara Y: Expression of PD-L1 and HLA class I in esophageal squamous cell carcinoma: prognostic factors for patient outcome. *Ann Surg Oncol* 23(Suppl 4): 508-515, 2016 (査読有) doi: 10.1245/s10434-016-5376-z
- 4) 佐伯浩司ほか Rad51 発現による食道癌悪性化とバイオマーカーとしての意義 *Surgery Frontier* 21:322-324, 2014

[学会発表](計11件)

- 1) 佐伯浩司、伊藤修平ほか 食道がんのバイオマーカー 食道扁平上皮癌における PD-L1 発現様式と臨床病理学的意義の検討 第 54 回日本癌治療学会 2016 年 10 月 横浜
- 2) 堤 智崇、伊藤修平ほか 食道扁平上皮細胞癌における腫瘍免疫回避と上皮-間葉転換 第 71 回日本消化器外科学会 2016 年 7 月 徳島
- 3) 伊藤 修平ほか 食道癌における血中 cell free DNA 測定の臨床的意義 第 70 回日本食道

学会学術集会 2016 年 7 月 東京

- 4) 堤 智崇、伊藤修平ほか 食道扁平上皮癌における PD-L1 発現の意義 腫瘍免疫回避と上皮間葉移行の協調作用 第 116 回日本外科学会 2016 年 大阪
- 5) 佐伯浩司ほか 食道がんのバイオマーカー 食道癌に対する術前治療の効果予測バイオマーカーとしての Rad51 発現の意義 第 53 回日本癌治療学会 2015 年 10 月 京都
- 6) 伊藤 修平ほか 食道癌 cStage2、3 切除症例における再発形式からみた術前治療の有用性の検討 第 69 回日本食道学会 2015 年 7 月 横浜
- 7) 中島 雄一郎ほか 補助療法無効例の選別と周術期の対策 術前化学放射線療法の治療前効果予測バイオマーカーの開発と周術期合併症の検討 第 69 回 日本食道学会 2015 年 7 月 横浜
- 8) Ito S, et al. PD-L1 and HLA class I expression and patient outcome in esophageal squamous cell carcinoma 第 70 回日本消化器外科学会 2015 年 7 月 浜松
- 9) 伊藤 修平ほか 食道扁平上皮癌における PD-L1、HLA class 発現の臨床的意義 第 115 回日本外科学会 2015 年 4 月 名古屋
- 10) 堤 智崇、伊藤修平ほか 食道扁平上皮癌における PD-L1 発現と上皮間葉移行に関する検討 第 115 回日本外科学会 2015 年 4 月 名古屋
- 11) 岡野 慎士ほか 固形癌における Programmed cell Death 1 Ligand 1(PDL1)発現の生物学的意義 第 52 回日本癌治療学会 2014 年 8 月 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 修平 (ITO, Shuhei)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 10706914

(2) 研究分担者

岡野 慎士 (Okano, Shinji)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号: 10380429
(平成 26 年 10 月 9 日 削除)

森田 勝 (MORITA, Masaru)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・消化器外科部長
研究者番号: 30294937

北尾 洋之 (KITAO, Hiroyuki)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号: 30368617

池田 哲夫 (IKEDA, Tetsuo)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号: 60585701

沖 英次 (OKI, Eiji)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：70380392

佐伯 浩司 (SAEKI, Hiroshi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80325448

中島 雄一郎 (NAKASHIMA, Yuichiro)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：40733564