

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10097

研究課題名(和文)オートファジー制御による食道癌化学療法抵抗性克服の検討

研究課題名(英文)Overcoming chemoresistance in esophageal cancer by regulating autophagy

研究代表者

宮田 博志(Miyata, Hiroshi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・副部長

研究者番号：80362713

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)：オートファジーは細胞内の恒常性を維持するための自己貪食機構として知られているが、近年、腫瘍組織においてオートファジーが腫瘍内環境の維持によりがんの増殖に寄与していると報告されている。今回、食道扁平上皮癌におけるオートファジー関連タンパクLC3とミトファジー関連タンパクPink1発現の意義について検討した。食道癌切除標本217例におけるLC3およびPink1の免疫組織学的評価の結果より、食道扁平上皮癌術前化学療法症例におけるPink1発現は、化学療法抵抗性に関連し、予後増悪因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the expression and effects of the autophagy-related protein LC3 and the mitophagy-related protein Pink1 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Both LC3 and Pink1 were analyzed by immunohistochemistry in 217 ESCC patients. Pink1 expression was significantly higher in patients who underwent chemotherapy than in patients who did not ( $p = 0.032$ ). High LC3 and Pink1 expression was significantly correlated with poor response to chemotherapy ( $p = 0.004$  and  $p = 0.001$ ). High expression of Pink1, but not LC3, was significantly correlated with a poor prognosis for patients treated with preoperative chemotherapy ( $p = 0.007$ ). In vitro assays demonstrated that inhibition of autophagy and mitophagy using chloroquine and siPink1, respectively, restored chemosensitivity. Thus, high expression of Pink1 is associated with chemoresistance and a poor prognosis for ESCC patients undergoing neoadjuvant chemotherapy.

研究分野：腫瘍学

キーワード：オートファジー 食道癌 ミトファジー 化学療法 治療抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内の恒常性を維持するための自己貪食機構として知られているが、近年、腫瘍組織においてオートファジーが腫瘍内環境の維持によりがんの増殖に寄与していると報告されている。さらに悪性腫瘍においてオートファジーが化学療法抵抗性に関与していることが明らかにされつつある。ミトコンドリア特異的なオートファジーであるマイトファジーは、機能不全に陥ったミトコンドリアを分解することによりミトコンドリアの品質管理の役割を担っており、がんの増殖との関連が注目されている。しかしながら、食道扁平上皮癌におけるマイトファジーと化学療法抵抗性の関連について検討した報告はこれまでにない。

### 2. 研究の目的

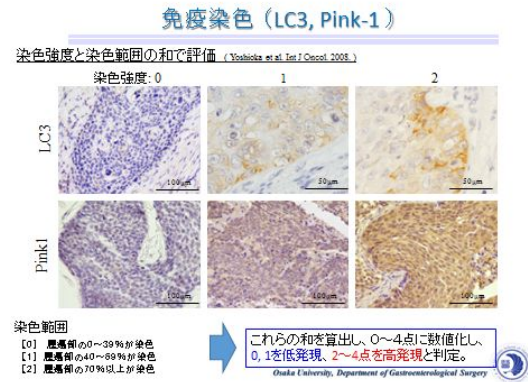
食道扁平上皮癌におけるオートファジー関連タンパク LC3 とマイトファジー関連タンパク Pink1 発現の意義について検討した。

### 3. 研究の方法

2000年から2011年までの12年間に食道切除術を施行した食道扁平上皮癌術後組織検体217例を対象にLC3、Pink1の免疫染色を実施し、LC3、Pink1の発現と化学療法治療効果を含む臨床病理学因子との関連を検討した。対象には術前化学療法施行例159例が含まれていた。同時重複癌症例、術前化学療法治療効果がgrade3であった症例は除外した。免疫染色は染色強度と染色範囲をそれぞれ0-2点で評価し、その和が2点以上のものを高発現と定義した。

また治療抵抗性獲得におけるLC3とPink1の役割について調べるために、食道癌細胞株を用いたin vitro assayを行った。

### 4. 研究成果



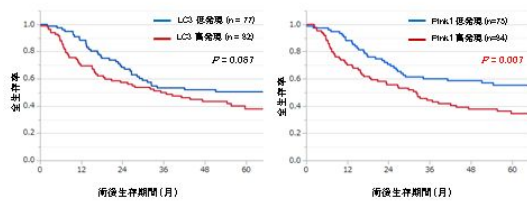
LC3 高発現は104例(47.9%)に、Pink1 高発現は105例(48.4%)に認められた。LC3、Pink1ともに高発現の症例は81例(37.3%)、どちらも低発現の症例は89例(41.0%)であり、LC3とPink1の発現には正の相関を認めた( $p < 0.001$ )。LC3、Pink1の発現はいずれも年齢、性別、腫瘍分化度、壁深達度やリンパ節転移との相関を認めなかったが、Pink1 高発現は術前化学療法施行例において有意に多かった( $p = 0.032$ )。

### LC3、Pink1発現と治療効果

	LC3高発現 n = 82 (%)	LC3低発現 n = 77 (%)	p-value	Pink1高発現 n = 84 (%)	Pink1低発現 n = 73 (%)	p-value
病理学的治療効果			0.004			< 0.001
Grade 0, 1a	65 (79.3)	44 (57.1)		69 (82.1)	40 (53.3)	
Grade 1b, 2	17 (20.7)	33 (42.9)		15 (17.9)	35 (46.7)	
腫瘍縮小率			0.058			0.011
< 50%	50 (61.0)	35 (45.5)		53 (63.1)	32 (42.7)	
≥ 50%	32 (39.0)	42 (54.5)		31 (36.9)	43 (57.3)	

術前化学療法施行例159例の検討では、病理学的治療効果奏効例(grade 1b以上)の割合はLC3高発現例で20.7%、低発現例で42.9%であり高発現例では治療効果が有意に低かった( $p = 0.004$ )。またPink1高発現例では病理学的治療効果奏効例割合が17.9%、低発現例では46.7%であり、高発現例で治療効果が有意に低かった( $p < 0.001$ )。Ki-67の免疫染色を実施したところ、Pink1発現はKi-67発現と正の相関を認めたが( $p < 0.001$ )、LC3発現にはKi-67発現との相関を認めなかった( $p = 0.25$ )。

## 術前化学療法症例におけるLC3、Pink1発現と全生存期間

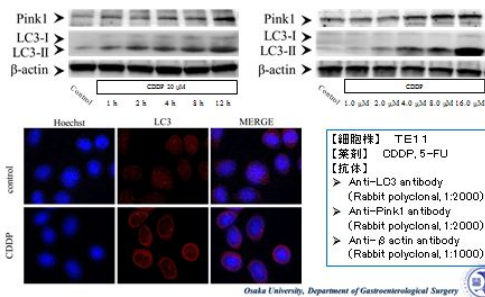


Osaka University, Department of Gastroenterological Surgery

予後解析では、Pink1 高発現例では低発現例に比較して全生存期間が有意に短かったが (p=0.007)、LC3 高発現例では予後不良の傾向はあるものの有意差は認めなかった (p=0.067)。全生存期間に関する Cox 多変量解析においても Pink1 高発現は腫瘍深達度、リンパ節転移とともに独立予後増悪因子であることが示された (p=0.042)。

## 化学療法暴露とLC3、Pink1発現

食道扁平上皮癌細胞株において、化学療法暴露によるLC3、Pink1の誘導を確認。

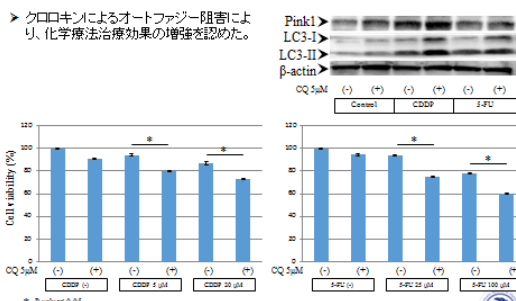


Osaka University, Department of Gastroenterological Surgery

さらに食道扁平上皮癌細胞株において、シスプラチン暴露により、時間依存性、濃度依存性に LC3 のオートファゴソーム膜結合型である LC3-II と Pink1 の発現が誘導されることを western blotting にて確認した。

## オートファジー阻害と化学療法効果

クロロキンによるオートファジー阻害により、化学療法治療効果の増強を認めた。

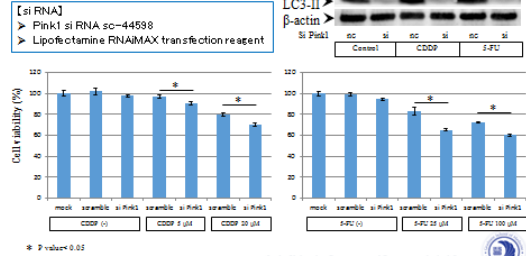


Osaka University, Department of Gastroenterological Surgery

オートファジー阻害作用を持つクロロキンを投与することにより、食道扁平上皮癌細胞株のシスプラチンと 5-FU に対する感受性の増強を認めた。

## Pink1抑制と化学療法効果

si-RNAによるPink1抑制により、化学療法治療効果の増強を認めた。



Osaka University, Department of Gastroenterological Surgery

また、Si-Pink1 による Pink1 発現抑制によっても同様にシスプラチン、5-FU に対する感受性の増強を認めた。

上記結果より、食道扁平上皮癌術前化学療法症例における Pink1 発現は、化学療法抵抗性に関連し、予後増悪因子であることが示唆された。

## 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 1 件)

Kotaro Yamashita, Hiroshi Miyata, Tomoki Makino, Yasunori Masuike, Haruna Furukawa, Koji Tanaka, Yasuhiro Miyazaki, Tsuyoshi Takahashi, Yukinori Kurokawa, Makoto Yamasaki, Kiyokazu Nakajima, Shuji Takiguchi, Eiichi Morii, Masaki Mori, Yuichiro Doki, High Expression of the Mitophagy-Related Protein Pink1 is Associated with a Poor Response to Chemotherapy and a Poor Prognosis for Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy for Esophageal Squamous Cell Carcinoma.

Ann Surg Oncol 査読有、2017; 24: 4025-4032.

doi: 10.1245/s10434-017-6096-8

〔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

宮田 博志 (Hiroshi Miyata )

地方独立行政法人 大阪国際がんセンター  
(研究所)・その他部局・副部長

研究者番号：80362713

##### (2) 研究分担者

杉村 啓二郎 (Keijiro Sugimura )

地方独立行政法人 大阪国際がんセンター  
(研究所)・その他部局・診療主任

研究者番号：00571374