

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590544

研究課題名 (和文)

癌分化誘導療法における hedgehog 情報伝達系の解明—消化器癌を中心に

研究課題名 (英文)

Clinical significance of hedgehog signalling pathway in oesophageal cancer patients after neoadjuvant chemoradiotherapy

研究代表者

吉川 麗月 (YOSHIKAWA REIGETSU)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号： 90319864

研究成果の概要：

zinc finger 型の転写因子 glioma-associated oncogene homologue 1 (Gli-1) は Hedgehog (Hh) signalling pathway の重要な構成成分である。Hh 経路は morphogenesis や stem-cell renewal に必要不可欠であり、近年多くの癌腫においてその異常が報告されている。食道癌の進展における Gli-1 発現の役割は未だ明らかにされておらず、今回、私達は neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) を施行した食道癌患者において、Gli-1 発現が病期の進行や予後と関連するの否かを検討した。病理組織学的に食道扁平上皮癌 (ESCCs) と確定診断された 69 症例を対象とし、このうち 25 症例は術前 CRT に pathological complete response (pCR) を示した。Overall survival (OS) はリンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、CRT の反応性の有無と有意に相関し、更に Gli-1 nuclear expression および遺残腫瘍の有無とも相関した。Gli-1 nuclear expression を示した 7 症例 (10.1%) は全例遠隔あるいはリンパ節転移を示し、その内 6 症例は 13 ヶ月以内に再発により死亡していた。Gli-1 nuclear-positive cancers はそうでない症例に比べて有意に予後が不良であった (Disease-Free Survival; mean DFS time 250 vs 1738 days, 2-yr DFS 0% vs 54.9%, $P=0.009$, OS; mean OS time 386 vs 1742 days, 2-yr OS 16.7% vs 54.9%, $P=0.001$)。本研究によって、術前 CRT 施行 ESCC 患者において Gli-1 nuclear expression は独立した信頼性の高い再発および予後の規定因子であることが明らかになった。以上の結果より、Hh 経路の活性化が CRT 後の cancer regrowth と progression を促進することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 境界医学・応用薬理学

キーワード： 癌幹細胞、食道癌、hedgehog 情報伝達系、polycomb 群、分化、化学放射線療法

1. 研究開始当初の背景

Hedgehog (Hh) signalling pathway は正常組織の embryonic pattern formation と adult tissue homeostasis において細胞の成長と分化を司る重要な役割を果たしており、腫瘍組織でもその initiation および growth と病理学的に深く関与している。また、組織損傷を負った際の再生に関わる adult stem cells の反応を制御している (Beachy *et al.*, 2004; Wetmore, 2003; van den Brink *et al.*, 2001; Ingham *et al.*, 2001)。分泌型 Hh 分子は Hh receptor である patched1 (Ptch1) と結合することによって、Ptch を介した smoothed (Smo) による情報伝達系の抑制を解き、細胞内シグナルの cascade を on にして zinc finger protein glioma-associated oncogene homologue 1 (Gli-1) の nuclear translocation を惹起する (Nakano *et al.*, 1989; Aza-Blanc *et al.*, 1997; Ruiz i Altaba Ruiz, 1999; Hooper and Scott, 2005)。

Hh 情報伝達系の異常活性化は Gorlin's syndrome として知られており皮膚基底細胞癌などの腫瘍形成を示す (Johnson *et al.*, 1996) だけでなく消化管癌の癌化にも関与することが報告されている。細胞株および xenografts レベルで Hh pathway antagonists が腫瘍抑制効果を示した実験結果が現在注目されている (Berman *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005; Ohta *et al.*, 2005)。

食道癌はリンパ節転移や血管浸潤を来すなどの特性を示し、極めて悪性度の高いことが知られており (Parkin *et al.*, 2005)、curative surgery を施行できた症例でさえも5年生存率は20%程度である (Parkin *et al.*, 2005)。私達は1996年来、切除率と予後の向上を目的として根治手術前に chemoradiotherapy (CRT) を組み合わせて施行しており、この導入により CRT responders における切除率の向上と再発率の減少を認めている (Fujiwara *et al.*, 2005)。しかしながら、世界的には CRT の有用性について異論も多く未だ確立されていないのが現状である (Coia *et al.*, 2000; Iyer *et al.*, 2004)。本疾患の死亡率が高いのは therapy-resistant cancer cells の出現によって現在の治療効果が限定されてしまうことに起因するところが大きい。

この治療抵抗性の細胞の主体こそ近年注目されている癌幹細胞であると考えられる (Al-Hajj *et al.*, 2003; Dick *et al.*, 2003)。Hh 情報伝達系は正常な development や homeostasis で幹細胞を制御していること

から、私達は Hh 情報伝達系の異常活性化が癌幹細胞と考えられる cancer progenitor cells の維持にも関与しているのではないかと仮説をたてた。

2. 研究の目的

そこで私達はその仮説を証明すべく oesophageal squamous cell carcinoma (ESCC) 組織を用いて Gli-1 protein 発現を retrospectively に解析し、Hh 情報伝達系の活性化が術前 CRT 施行患者においていかなる臨床的意味を持つのか検討することにした。

3. 研究の方法

Patients and therapy

術前CRT後外科的に切除され病理学的にESCCと診断された69症例(11 women and 58 men; mean age, 60.7 years; age range, 38-78 years)を対象とした。以下のプロトコールに従ってFP療法と放射線療法 (total dose of 40 Gy) を組み合わせた術前CRTを施行した (Figure 1)。

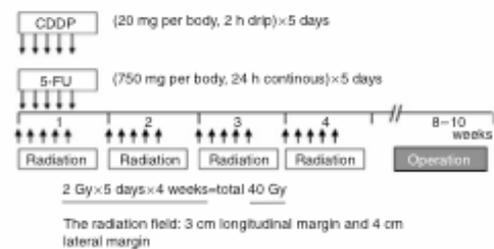


Figure 1 Schedule of preoperative CRT.

Immunohistochemistry

Envision kit (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)を用いて goat polyclonal antibody against human Gli-1 (C-18, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、goat polyclonal anti-human cyclooxygenase (COX)-2 antibody、mouse monoclonal anti-human vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody (Santa Cruz Biotechnology)、mouse monoclonal anti-human chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) antibody (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) に対する免疫組織学的染色を行った。Gli-1 の nuclear

expression は以下の 5 段階にグレード分類した: no specific staining (-); <5% of the tumour cells (\pm); $\geq 5\%$ to <35% of the tumour cells (+); $\geq 35\%$ to <65% of the tumour cells (++) ; $\geq 65\%$ tumour cells (+++). Subtle expression は<5% of the tumour cells (\pm)

Statistical Analysis

各因子間比較は univariate analysis を用い、Overall Survival (OS) および Disease-Free Survival (DFS) は Kaplan-Meier survival curves に基づいて log-rank test で計算した。統計学的有意差は $P < 0.05$ とした。統計ソフトは STATISTICA statistical software, version 06J (STATISTICA, Tulsa, OK, USA) を用いた。

4. 研究成果

RESULTS

Patient and tumour characteristics

Patient characteristics は Table 1 にまとめられた。

Table 1 Patient characteristics

Characteristics	n
Sex (male/female)	69 (58/11)
Mean age, years (range)	60.7 (38–76)
Location of tumour	
Cervix	2
Upper thorax	8
Middle thorax	39
Lower thorax	20
T-classification	
T ₁	40
T ₄	29
N-classification	
N ₀	40
N ₁	29
M-classification	
M ₀	55
M ₁	14
UICC TNM stage	
IIa	29
III	26
IVa	7
IVb	7

TNM = tumour-node metastasis; UICC = International Union Against Cancer.

Gli-1 nuclear expression predicts early recurrence and poor prognosis

25 症例は CRT 後 pathological CR を示した。Gli-1 染色は 31 症例 (44.9%) に認められ、このうち 7 症例 (10.1%) が活性化を示す nuclear expression 陽性だった。このうち (\pm) が 2 症例、(+) が 2 症例、(++) が 3 症例であった (Figure 2)。Gli-1 nuclear expression 群は全例再発を起こしていた。その内 3 例は局所再発で 4 例は遠隔再発であった (in the liver, bone, lung and neck lymph nodes)。7 症例中 6 症例は 13 ヶ月以内に再発

により死亡していた。(±) 発現を示した患者でさえも肺・頸部リンパ節転移で術後 10 ヶ月で亡くなっていた。一方 Gli-1-null or cytoplasmic expression or no residual tumour 群 ($n = 62$) では 22 例に再発が認められた (in the liver, bone, lung, neck lymph nodes and thyroid gland)。Gli-1 nuclear expression 群では有意に遠隔再発が多かった ($P = 0.002$, hazard ratio 4.115, 95% confidence interval [CI] 1.676–10.104)。OS prognostic factors における univariate analysis の結果を Table 2 にまとめた。リンパ節および遠隔転移は予後規定因子として有意差を示した ($P = 0.0001$, $P = 0.0001$, respectively)。更に CRT responders はそうでないものと比し有意に予後の延長を呈した ($P = 0.0001$)。

Kaplan-Meier analysis の結果より Gli-1 nuclear expression 群はそうでない群 (Gli-1-null or cytoplasmic expression patients or those with no residual tumour 群) に比し極めて予後不良であることが明らかとなった。Gli-1 nuclear expression 群の DFS は 250.8 ± 38.7 days (95% CI 174.9–326.8 days) でそうでない群は 1734.8 ± 212.2 days (95% CI 1318.8–2150.8 days) (Figure 3; $P = 0.009$)。同様に OS はそれぞれ 386.7 ± 116.6 days (95% CI 158.1–615.3 days) vs 1742.7 ± 208.5 days (95% CI 1334.2–2151.3 days) だった (Figure 4; $P = 0.001$)。Gli-1 nuclear expression 群とそうでない群との 1-, 2-, 3-年 DFS rates はそれぞれ 16.7% vs 68.9%, 0% vs 54.9%, 0% vs 47.8% で、対応する OS rates は 33.3% vs 82.8%, 16.7% vs 54.9%, 0% vs 46.1% であった。

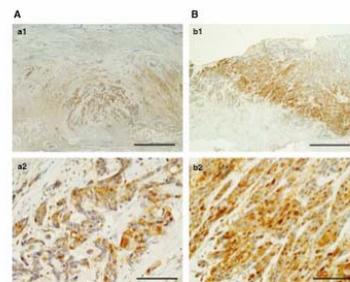
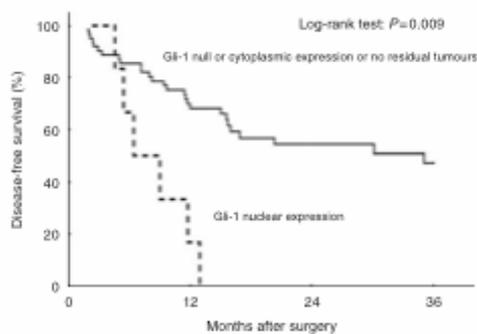
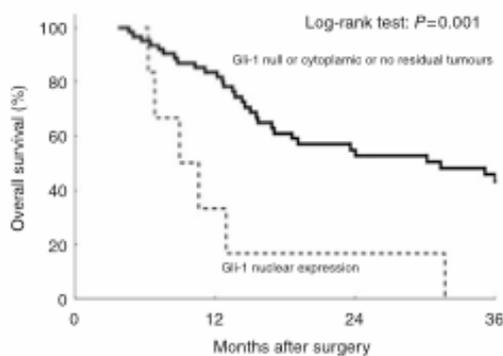


Figure 2 Immunohistochemical detection of Gli-1 in ESCC specimens. (A) Subtle nuclear expression for Gli-1 (a1, $\times 20$; a2, $\times 200$). (B) Strong nuclear expression for Gli-1 (b1, $\times 20$; b2, $\times 200$). Bars indicate 1 mm ($\times 20$) or 100 μm ($\times 200$).

Table 2 Univariate analysis of prognostic factors for OS

Covariate	n	Hazard ratio	95% CI	P-value for OS
Age (years)				
<70	54	0.984	0.448–2.160	0.968
≥70	15			
Gender				
Male	58	0.456	0.161–1.291	0.139
Female	11			
Effect of CRT				
Effective	49	0.207	0.104–0.413	0.0001***
Not effective	20			
Lymph-node metastasis				
Positive	31	3.567	1.751–7.266	0.0001***
Negative	38			
Distant metastasis				
Positive	13	4.064	2.016–8.192	0.0001***
Negative	56			
Depth of tumour invasion				
T ₃	40	0.383	0.195–0.751	0.005*
T ₄	29			
Tumour location ^a				
Upper	10	1.139	0.442–2.934	0.787
Lower	59			
Gli-1 expression				
Nuclear	7	4.115	1.676–10.104	0.002**
Others	62			

CI = confidence interval; CRT = chemoradiotherapy; Gli-1 = glioma-associated oncogene homologue 1; OS = overall survival. *P < 0.01; **P < 0.005; ***P < 0.0005. ^aUpper or lower: above or below the tracheal bifurcation.

**Figure 3** Disease-free survival differences between patients with nuclear Gli-1 expression and patients with no residual tumour and Gli-1-null or cytoplasmic expression.**Figure 4** Overall survival differences between patients with Gli-1 nuclear expression and patients with no residual tumour and Gli-1-null or cytoplasmic expression.

DISCUSSION

私達はこれまでESCC患者においてCRT後も持続する CXCR4、COX-2、VEGF expression が再

発を規定することを報告してきた (Koishi *et al*, 2006; Yoshikawa *et al*, 2007)。これらの事実は転移という現象が腫瘍細胞のみならず chemokine networks や microvasculature といった外的な therapeutic intervention (*i. e.*, CRT) に反応した細胞周囲の環境 (niche) にも強く関係していることを示唆している。確かに Gli-1 nuclear-positive cancers は全症例とも、cancer progenitor cell-like surface characteristic である上記3マーカー全てを発現していた。興味深いことに、CRT後にCOX-2 やVEGF が発現している症例では、そうでない症例と比較明らかに再発率は高いのだが、何らかの術後治療を加えることによって再発がおこったとしても予後を延長することが可能であった。これと対照的に、Gli-1 nuclear expression 症例では術後のいかなる therapeutic intervention をもってしてもHh signal activation に関連したdisease progression を抑制することが不可能であった。この結果は、Hh signal activation がCRT後の cancer regrowth およびprogression に強く関与している可能性を示しており、subtle Gli-1 activation がCRT後の治療抵抗性を引き起こす ‘more aggressive’ cancer cells の出現を意味することが示唆される。

一般の食道癌でのGli-1発現率はほぼ半数と報告されているので (Mori *et al*, 2006)、CRTによって絶対多数を占めるbulkタイプの癌細胞は駆逐され、治療抵抗性を示す ‘more aggressive’ cancer cells が10%程度残ったと考えられる。即ち、CRTを施行した後もGli-1の活性化している癌は、治療抵抗性で非常に早期に再発し死亡に到ることが明らかになったわけである。

本研究の成果を受け、Gli-1の発現解析を再発を予測するバイオマーカーとして臨床にルーチンに取り入れることによって、再発ハイリスク群患者のスクリーニングが容易になり、個人に応じた治療オプションの選択が可能になる。また将来的には、癌幹細胞を死滅させる薬は再発を防ぐ根本的な治療法につながる大きな可能性を持っている。実際に米国では、Hh情報伝達系のantagonist が開発され、皮膚基底細胞癌に対して臨床試験が端緒に終わったばかりである。Gli-1発現ESCC患者に絞り込んだ形でGli-1を分子標的とした臨床試験を行えば予後向上が見込める可能性が高く、食道癌再発ハイリスク患者での早期臨床応用を目指して研究を継続する予定である。

In summary, we showed that the monoclonal amplification of Gli-1 nuclear localisation implicating Hh pathway activation was correlated with oesophageal cancer progression, and that subtle Hh cascade activation after CRT indicated

early cancer progenitor cell emergence. Although the functional and clinical significance of the Hh pathway remain to be elucidated, we suggest that Gli-1 expression is a link between relapse and CRT-resistant cancer cells, and is thus a potential diagnostic biomarker and therapeutic target.

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)

- ① Yoshikawa R, Nakano Y, Tao L, Koishi K, Matsumoto T, Sasako M, Tsujimura T, Hashimoto-Tamaoki T, Fujiwara Y. Hedgehog signal activation in oesophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy. Br J Cancer 98: 1670-1674, 2008. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

- ① Fujiwara Y, Yoshikawa R, Tao L, Tsujimura T, Sasako M. Expression of Bmi-1, stem cell marker, is associated with early recurrence and poor prognosis in esophageal cancer patients after neoadjuvant chemoradiotherapy. 2009 Gastrointestinal Cancers Symposium, Jan. 15-17, San Francisco, USA, 2009.
- ② Kaibe N, Fujiwara Y, Yoshikawa R, Tao L, Koishi K, Matsumoto F, Toorabally F, Tsujimura T, Sasako M. Stem cell marker ALDH1 is a predictor of poor clinical outcome in esophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy. 2009 Gastrointestinal Cancers Symposium, Jan. 15-17, San Francisco, USA, 2009.
- ③ Yoshikawa R, Tao L, Tsujimura T, Nakano Y, Hashimoto-Tamaoki T, Sasako M, Fujiwara Y. Stem cell-related markers in oesophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy. The 16th United European Gastroenterology Week "UEGW 2008". Oct. 18-22, Vienna, Austria, 2008.

- ④ Fujiwara Y, Yoshikawa R, Kaibe N, Matsumoto T, Koishi K, Tao L, Hashimoto-Tamaoki T, Tsujimura T, Sasako M. Prognostic significance of chemokine receptor CXCR3 expression after neoadjuvant chemoradiotherapy in oesophageal cancer patients. The 16th United European Gastroenterology Week "UEGW 2008". Oct. 18-22, Vienna, Austria, 2008.
- ⑤ Yoshikawa R, Fujiwara Y, Nakano Y, Tao L, Tsujimura T, Hashimoto-Tamaoki T. Prognostic significance of Hedgehog signal activation in esophageal cancer patients undergoing preoperative chemoradiotherapy. American Association for Cancer Research, 99th Annual Meeting, Apr. 12-16, San Diego, CA, USA, 2008.
- ⑥ Fujiwara Y, Yoshikawa R, Tao L, Matsumoto T, Koishi K, Sasako M, Hashimoto-Tamaoki T, Tsujimura T. Persistent expression of chemokine receptor CXCR3 after neoadjuvant chemoradiotherapy predicts early recurrence and poor prognosis in esophageal cancer patients. 2008 Gastrointestinal Cancers Symposium, Jan. 25-27, Orlando, USA, 2008.
- ⑦ Fujiwara Y, Yoshikawa R, Koishi K, Matsumoto T, N Tomita, Hashimoto-Tamaoki T, Tsujimura T. Expression of CXCR4 and COX-2 after preoperative chemotherapy predicts poor prognosis in oesophageal cancer patients. The 15th United European Gastroenterology Week "UEGW 2007". Oct. 27-31, Paris, France, 2007.
- ⑧ Fujiwara Y, Yoshikawa R, Koishi K, Matsumoto T, Kojima T, Hashimoto-Tamaoki T, Tsujimura T. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression after neoadjuvant chemoradiotherapy and response to platinum/taxanes containing adjuvant chemotherapy in

esophageal cancer. 41st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, June 1-5, Chicago, USA, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 麗月 (YOSHIKAWA REIGETSU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90319864

(2) 研究分担者

中野 芳朗 (NAKANO YOSHIRO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30360267

玉置 知子 (TAMAOKI TOMOKO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10172868

藤原 由規 (FUJIWARA YOSHINORI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10258155

(3) 連携研究者

該当なし