

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591945

研究課題名(和文) タキサン併用術前化学療法の食道癌への効果予測因子と予後規定因子の解明

研究課題名(英文) Experimental analysis of the factors which predict the prognosis and the efficacy of preoperative systemic chemotherapy with taxane for esophageal cancer

研究代表者

丹黒 章 (TANGOKU, Akira)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10197593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌患者から生検組織を採取、術前DFP療法後に効果を判定し、生検組織は免疫組織化学的手法を用いてALDH1, CCD44, CXCL12, CXCR4, CXCR7を免疫染色並びにRT-PCRによって解析、臨床データと比較した。CXCL12, CXCR4, CXCR7の高発現は予後不良因子であった。RT-PCRによる検討でmRNAレベルにおけるCXCR4, CXCR7は癌種で増加しており、CXCR4発現は予後に影響しており、CXCL12とCXCR4は予後予測因子であった。また、ALDH1陽性群は陰性群より予後不良で、ALDH1陰性で手術により予後が改善できたがALDH1発現は抗癌剤の効果に影響しなかった。

研究成果の概要(英文)：The expression of ALDH1, CXCL12, CXCR4 and CXCR7 in the specimens from esophageal cancer were evaluated by immunohistochemistry and RT-PCR. These results were compared with the clinicopathological parameters and survival of the patients.

Results: High expression of CXCR4 with cytoplasmic and nuclear staining and CXCR7 were associated with cause-specific survival (CSS). The expression levels of messenger RNA (mRNA) of CXCR4 and CXCR7 were significantly increased in the tumor tissue compared with the normal esophageal tissue analysed by RT-PCR. The expression levels of mRNAs of CXCR4 was associated with CSS, and the expression levels of mRNA of CXCL12 and CXCR4 were associated with recurrence-free survival.

ALDH1 was associated with postoperative recurrence and prognosis. CD44 was found to be associated with postoperative recurrence and prognosis after chemotherapy. ALDH1-negative groups displayed better prognoses with operation only. ALDH1 did not influence on the effect of chemotherapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：食道癌 抗癌剤 タキサン 術前化学療法 抗癌剤感受性

1. 研究開始当初の背景

食道癌は世界でも頻度の高い癌であり、中高年の男性に多く発生する。その死亡率は高く、本邦男性の癌死亡率第6位であり、高齢社会であるわが国では今後も増加が予測される癌腫である。

食道は後縦隔内に存在し、発達したリンパ網を介して縦隔内から頸部、腹部にまで広範囲にリンパ節転移を起こすため、その根治手術は3領域にわたる広範囲なリンパ節郭清が必要であり、その手術侵襲は大きく、術後に合併症を高率に発症する。食道癌の発生が脳血管や代謝障害を有する高齢者に多いことと相まって、手術に起因する死亡も少なくない。手術可能な臨床病期、早期食道癌を対象とした多施設共同第Ⅲ相臨床試験であるJCOG9906の長期成績は化学放射線治療の治療効果は外科的治療を凌駕するものではないことが判明した。FP療法(cisplatin+5FU)による術前と術後補助療法のどちらが有効かを検証した臨床試験であるJCOG9907の結果、術前にFP療法による化学療法を行った方が完遂率も高く、無再発生存期間、全生存期間とも術後補助化学療法より良好であることが証明された。しかし、FP療法はその副作用の割にCR率が低く、奏功率は満足できるものではない。申請者らは2004年からlow dose FP療法にweekly Docetaxelを加えた術前DFP療法を行い、良好な治療効果(奏功率83.4%, CR率26.7%)と生存率の改善効果を得ている。

2. 研究の目的

本研究の目的は今後、食道癌治療の標準になる可能性がある術前化学療法を有効に行うための治療効果予測因子、食道癌再発リスク因子、予後規定因子を解明することである。術前、術中に採取した臨床材料を用いた検証を行い、遺伝子や組織診断による新しい分子生物学的なリスクカテゴリーと薬剤感受性予測による個別治療を実現したい。本研究の知見により食道癌治療成績を劇的に改善できる可能性があり、治療効果関連遺伝子の解明による創薬の可能性も秘めている。

3. 研究の方法

動物実験： SCIDマウスを用いた食道癌移植Xenograftモデルの作成

食道癌 in vivo モデルを作製する。SCIDマウス(SCID17/1cr-scid Jc1 雄 CLEA Tokyo Japan 6-8週齢 重量20-25g)を用いて細胞懸濁液を注入する。移植する細胞株はYES-2をもとに継代培養を行い、マウス親和性株を樹立することにより、長期生存が可能な移植モデルを作成する。移植モデルを生育し、定

期的に(1週間、2週間、3週間の時点で)犠牲死し、腫瘍増殖と侵襲を計測して time course を作成する。

食道癌同所移植 Xenograft モデルに対する薬剤感受性

SCIDマウスの同所移植モデルXenograftを使って in vivo における分子標的治療薬単独と抗癌剤併用における効果を検証する。Xenograft モデルラットへ抗癌剤投与量は5-FUを20 mg/kg /day on day 1-5で4週、CDDP 10 mg/ body/ day on day 1を4週、Docetaxel 25 mg/kg/day on day 1を4週投与、腫瘍組織を採取し、治療効果のあるものとならないものを抽出し、蛋白発現や遺伝子に違いがあるかどうかを検証する。

臨床研究：Docetaxel+CDDP+5-FUで術前治療を行う症例のパラフィン切片、OCT compoundやRNAlater(Qiagen)に入れた凍結保存切片を作成した。

術前化学療法：stage II以上の患者ほぼ全例にDFP療法(Docetaxel+5-FU+CDDP療法を行い、治療経過を記録した。治療前後に採血を行い、血清を凍結保存した。内視鏡・CTおよびPETCTにより効果判定を行った。手術を行い、組織学的治療効果を判定し組織も凍結保存した。組織は免疫組織化学的手法を用いてEGFR, Her2, 3, 4, Ki67, p53, Cyclin D1, ADLH1, CCD44, CXCL12, CXCR4およびCXCR7など様々なバイオマーカーを免疫染色ならびにRT-PCRによって解析を行った。CXCL12, CXCR4, CXCR7 蛋白発現は免疫染色で、mRNA)レベルでのCXCL12, CXCR4, CXCR7測定はRT-PCRで行った。

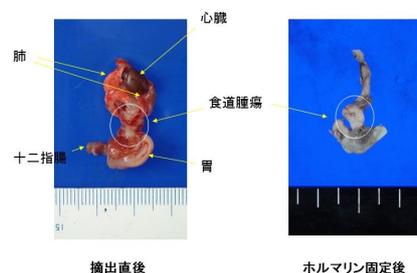
4. 研究成果

動物実験：

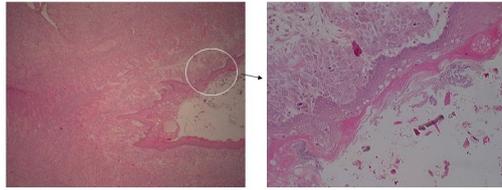
マウス親和性食道癌細胞株懸濁液を注入し、同所移植モデルを作成、癌腫の発育とリンパ節転移を確認した。

同所移植の結果(2ヶ月目)

[YES-3]

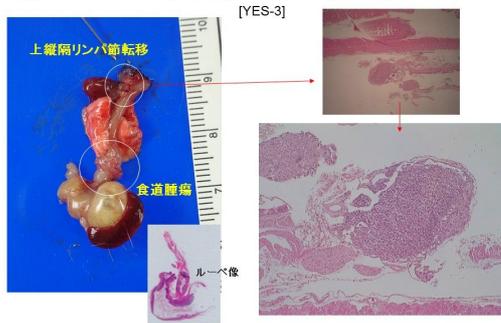


同所移植の結果(移植後2ヵ月)



粘膜下に腫瘍を形成

縦隔リンパ節転移形成(移植後2ヶ月)



しかし、癌腫の生育にばらつきがあり感受性試験まで至っていない。

臨床研究:

食道癌患者 172 症例の臨床データと Biomarker を比較し、SPSS(Ver.16.0)を使用し無再発生存期間 Recurrence free survival (以下、RFS)、疾患特異的生存期間 Cause specific survival (以下、CSS)、全生存期間 Overall survival (以下、OS) などの予後調査や、抗癌剤の効果判定との関連を統計的に検討した。

(1) 手術群と術前化学療法群において RFS, CSS とともに ALDH1 陽性群が陰性群より有意差を持って不良であった(図1)。

(2) 抗癌剤の効果判定において、陽性群陰性群の間で差はなく、抗癌剤の効果予測因子とはなりえなかった。

(3) Stage II/III 症例において、ALDH1 発現により二群に分け、各群での手術の有無による予後への影響を検討したところ ALDH1 陰性群では、手術施行群が非施行群より OS が良好であった。それに対し、ALDH1 陽性群では手術施行群が、非施行群より OS がより不良であり、手術の効果が低いことが示唆された(図2)。

以上の結果を Annals of Surgical Oncology 20(1): 209-2017. 2013

に発表した。

図 1

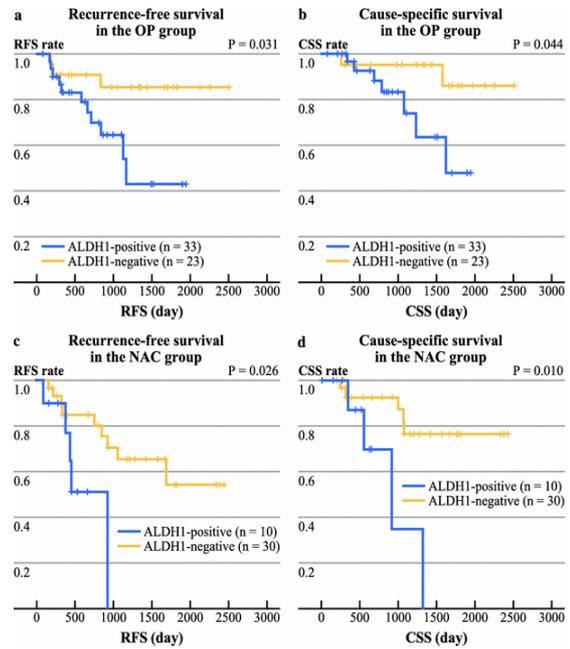
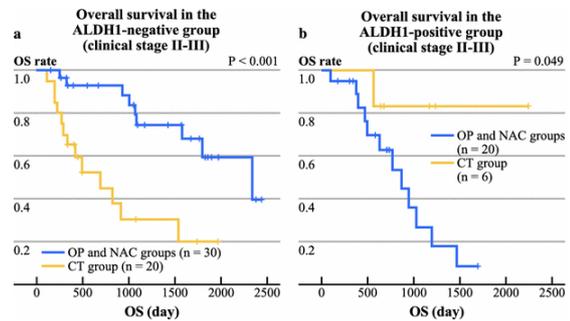
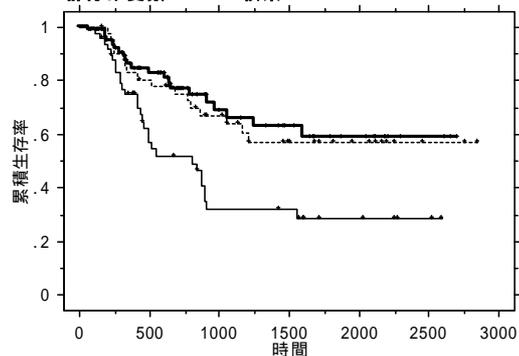


図 2



(4) CXCL12, CXCR4 の高発現は発現していないものに対して有意に予後不良であった (p=0.0015) (図A)。

A CXCR4 CSS (P=0.0017)



CSS CXCR4 (P=0.0017)

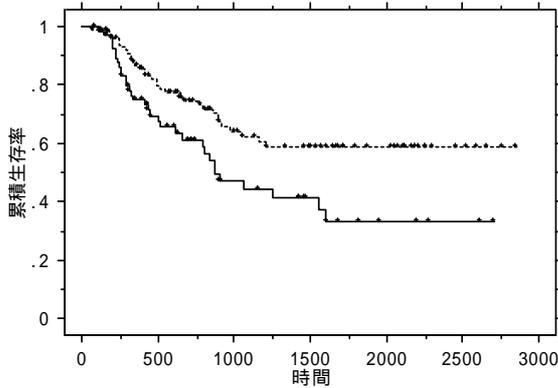
— CXCR4 positive with cytoplasmic and nuclear (n=49)

— CXCR4 positive with only cytoplasm (n=81)

----- CXCR4 negative (n=42)

(5) CXCR7 の高発現も予後不良傾向を認めた ($p=0.01$) (図 B, C)。

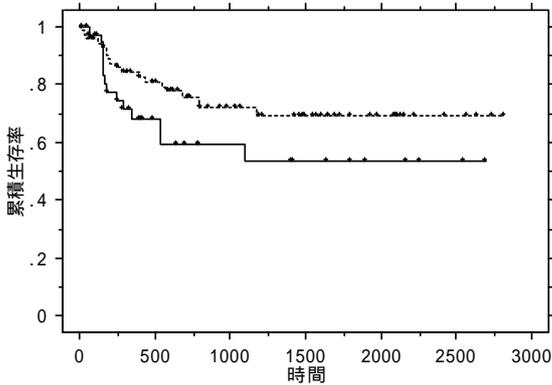
B CXCR7 CSS ($P=0.0103$)



CSS CXCR7 ($P=0.0103$)

— CXCR7 positive (n=69)
 - - - CXCR7 negative (n=103)

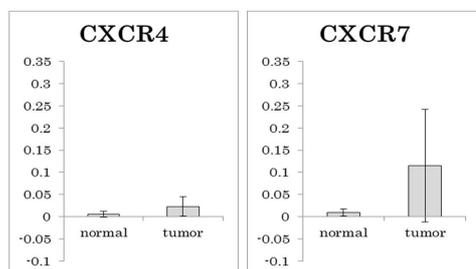
C CXCR7 RFS ($P=0.0992$)



RFS CXCR7 ($P=0.0992$)

— CXCR7 positive (n=40)
 - - - CXCR7 negative (n=73)

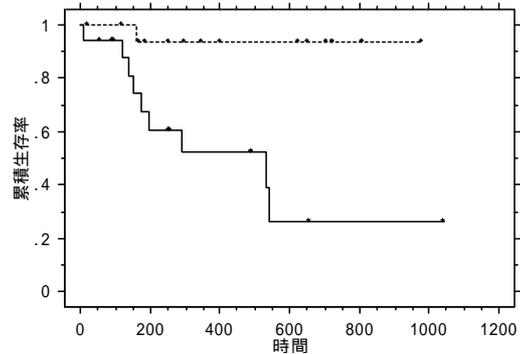
(6) 172 名中 52 例の RT-PCR による検討で mRNA レベルでの CXCR4 ならびに CXCR7 は正常組織に比べ癌種で増加していた ($p<0.0001$)。



(7) 無再発生存は mRNA レベルでの CXCL12 ($P=0.002$) と CXCR4 ($P=0.0115$) により予測可能であった (図 A B)。mRNA における CXCR4 発現は予後に影響していた ($P=0.0383$)。

無再発生存は mRNA レベルでの CXCL12 ($P=0.002$) と CXCR4 ($P=0.0115$) により予測可能であった (図 C, D)。

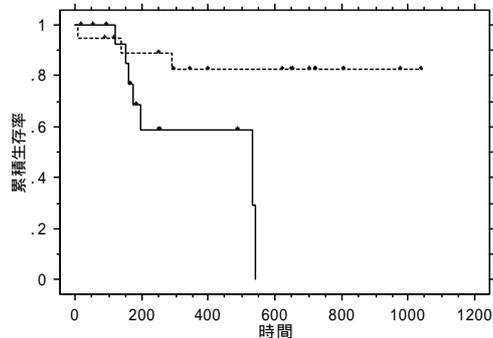
A RFS CXCL12 ($P=0.002$)



RFS CXCL12 ($P=0.002$)

— CXCL12 high (n=18)
 - - - CXCL12 low (n=17)

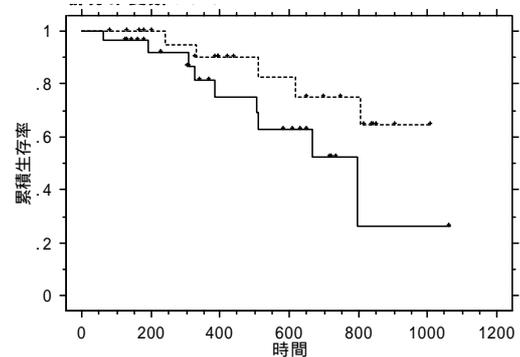
B RFS CXCR4 ($P=0.0115$)



RFS CXCR4 ($P=0.0115$)

— CXCR4 high (n=16)
 - - - CXCR4 low (n=19)

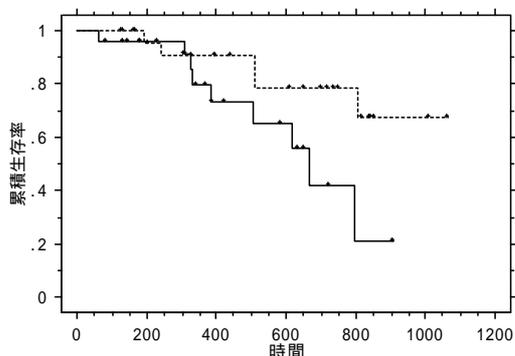
C CSS CXCL12 ($P=0.0897$)



CSS CXCL12 ($P=0.0897$)

— CXCL12 high (n=27)
 - - - CXCL12 low (n=25)

D CSS CXCR4 (P=0.0383)



CSS CXCR4 (P=0.0383)

— CXCR4 high (n=26)
 - - - - - CXCR4 low (n=26)

以上の結果を Ann Surg Oncol に投稿中である。

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3件)

Yoshida T, Tangoku A, Furukita Y, Nishino T, Takechi H, Kawakami Y, Morimoto M, Morishita A, Fujiwara S, Inoue S, Minato T, Goto M, Yamamoto Y, Yuasa Y, Yamai H, Seike J, Miyoshi T. Long-term survival for advanced esophageal cancer patients with an esophago-bronchial fistula can be achieved by timely multimodality therapy. Esophagus, in press, 2015

Minato T, Yamamoto Y, Seike J, Yoshida T, Yamai H, Takechi H, Yuasa Y, Furukita Y, Goto M, Bando Y, Tangoku A. Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression is Associated with Poor Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Oncol, 査読有, 20(1), 2013, 209-217, DOI 10.1245/s10434-012-2535-8

Yamamoto Y, Yamai H, Seike J, Yoshida T, Takechi H, Furukita Y, Kajiura K, Minato T, Bando Y, Tangoku A. Prognosis of esophageal squamous cell carcinoma in patients positive for human epidermal growth factor receptor family can be improved by initial chemotherapy with docetaxel, fluorouracil, and cisplatin. Ann Surg Oncol, 査読有, 19(3), 2012, 757-765, DOI 10.1245/s10434-011-2071-y

[学会発表](計12件)

Nishino T, Yoshida T, Furukita Y, Takechi H, Yamamoto Y, Yuasa Y, Goto M,

Minato T, Inoue S, Fujiwara S, Sawada T, Kawakita N, Yamai H, Seiky J, Miyoshi T, Tangoku A.

Gender differences in clinicopathologic features and outcomes of esophageal cancer patients treated surgically, 14th World Congress of ISDE, 2014年9月22日-24日, The Westin Bayshore Hotel (Vancouver, Canada)

Tangoku A, Yoshida T, Furukita Y, Nishino T, Takechi H, Morishita A.

Timely multimodality can realize long survival for advanced esophageal cancer patients with esophago-bronchial fistula, 14th World Congress of ISDE, 2014年9月22日-24日, The Westin Bayshore Hotel (Vancouver, Canada)

西野豪志, 吉田卓弘, 森本雅美, 古北由仁, 武知浩和, 清家純一, 丹黒 章, 高齢者食道癌(75歳以上)に対する術前化学療法における問題点, 第52回日本癌治療学会学術集会, 2014年8月28日-30日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

古北由仁, 丹黒 章, 森下敦司, 森本雅美, 坪井光弘, 西野豪志, 武知浩和, 吉田卓弘, 清家純一, 食道癌治療における血清 p53 抗体価測定の意義, 第52回日本癌治療学会学術集会, 2014年8月28日-30日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

古北由仁, 丹黒 章, 森下敦司, 森本雅美, 坪井光弘, 西野豪志, 梶浦耕一郎, 武知浩和, 吉田卓弘, 清家純一, 食道切除・再建術におけるリスク評価と治療成績向上に向けた対策 食道切除・再建術における E-PASS スコアの有用性と術後合併症の軽減を目指した試み, 第69回日本消化器外科学会総会, 2014年7月16日-18日, 郡山市民文化センター, ホテルハイツ, 郡山総合体育館(福島県郡山市)

古北由仁, 丹黒 章, 森下敦司, 森本雅美, 坪井光弘, 西野豪志, 武知浩和, 吉田卓弘, 清家純一, 当科における切除不能食道癌に対する治療戦略, 第68回日本食道学会学術集会, 2014年7月3日-4日, 東京ドームホテル(東京都文京区)

西野豪志, 吉田卓弘, 森下敦司, 古北由仁, 山本洋太, 武知浩和, 丹黒 章, 女性の食道癌は男性よりも予後良好である 食道癌切除症例の臨床病理学的特徴と予後におよぼす性差, 第114回日本外科学会学術集会, 2014年4月3日-5日, 国立京都国際会館, グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)

古北由仁, 丹黒 章, 森下敦司, 森本雅美, 坪井光弘, 西野豪志, 梶浦耕一郎, 山本洋太,

武知浩和、吉田卓弘、清家純一、食道癌化学療法におけるエイコサペンタエン酸強化栄養剤の導入効果、第114回日本外科学会学術集会、2014年4月3日-5日、国立京都国際会館、グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)

西野豪志、丹黒章、池田真由美、古川尊子、後藤正和、山本洋太、古北由仁、梶浦耕一郎、武知浩和、清家純一、食道扁平上皮癌に対する術前DFP療法(weekly DOC+low-dose FP)の有効性、第68回日本消化器外科学会総会、2013年7月17日-19日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)

西野豪志、山本洋太、後藤正和、古北由仁、武知浩和、吉田卓弘、清家純一、丹黒章、食道扁平上皮癌に対する術前DFP療法(weekly DOC+low-dose FP)の有効性、第67回日本食道学会学術集会、2013年6月13日-14日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

山本洋太、坂本晋一、西野豪志、後藤正和、古北由仁、武知浩和、吉田卓弘、清家純一、丹黒章、食道がん治療におけるHER-family蛋白発現と治療効果・予後との関連の検討、第38回日本外科系連合学会学術集会、2013年6月6日-7日、ハイアットリージェンシー東京(東京都新宿区)

Yamamoto Y, Yamai H, Seike J, Yoshida T, Yuasa Y, Furukita Y, Kajiura K, Goto M, Takechi H, Bando Y, Tangoku A.
PROGNOSIS OF ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN PATIENTS POSITIVE FOR HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR FAMILY CAN BE IMPROVED BY INITIAL CHEMOTHERAPY WITH DOCETAXEL, FLUOROURACIL AND CISPLATIN, 13rd World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2012年10月15日-17日, Venice Lido Congress Center(Italy, Venice)

〔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：
出願年月日：
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

丹黒章(TANGOKU, Akira)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：10197593

(2) 研究分担者

井本逸勢(IMOTO, Issei)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：30258610

川上行奎(KAWAKAMI, Yukikiyo)
徳島大学・病院・特任講師
研究者番号：00596249

吉田卓弘(YOSHIDA, Takahiro)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：00380105

古北由仁(FURUKITA, Yoshihito)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：20563810

西野豪志(NISHINO, Takeshi)
徳島大学・病院・医員
研究者番号：80645193

山本洋太(YAMAMOTO, Yota)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：50522273

後藤正和(GOTO, Masakazu)
徳島大学・病院・特任助教
研究者番号：00437659

(3) 連携研究者

()

研究者番号：