

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19897

研究課題名(和文)食道癌における酸化ストレス損傷のメカニズム解明と革新的治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of oxidative stress damage in esophageal cancer and development of innovative treatment

研究代表者

中島 雄一郎 (NAKASHIMA, Yuichiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40733564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌の手術検体においてMTH1(MutT-homologue 1)mRNA発現レベルは正常組織に比較して癌組織において高かった。免疫組織化学染色ではMTH1高発現は深い壁深達度と静脈侵襲、高度な進行癌例と正に相関しており、MTH1高発現例は低発現例に比較して予後不良であった。さらにMTH1高発現は独立した予後不良因子であった。

一方、8-oxo-2'-deoxyguanosine(8-oxo-dG)発現は臨床病理学的因子や予後と相関しなかった。これらの結果から、MTH1過剰発現は食道扁平上皮癌の予後予測因子となり、さらに治療標的分子となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression of MTH1 and the accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine(8-oxo-dG) in 84 patients with esophageal cancer. MTH1 mRNA expression was higher in cancerous tissues than in the corresponding normal epithelium. Immunohistochemical analysis showed that high MTH1 expression was significantly associated with deeper tumor invasion and venous invasion, advanced cancer stage, and poor overall survival and disease-specific survival compared with low MTH1 expression. Furthermore, high MTH1 expression was an independent predictor of poor disease-specific survival. In contrast, 8-oxo-dG accumulation was not associated with any clinicopathological factor and poor prognosis. These results suggest that MTH1 overexpression is a predictor of esophageal cancer progression and poor prognosis and that MTH1 can serve as a therapeutic target for treating patients with esophageal cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：酸化ストレス 食道癌 MTH1 8-oxo-dG

1. 研究開始当初の背景

生命体において酸素は生体維持に必須のエネルギー源であるが、酸素の一部はその代謝過程で活性酸素またはその関連物質 (Reactive oxygen species; ROS) に変化する。過剰な ROS は細胞内の DNA やタンパク質を損傷する酸化ストレスとなり、各種疾患や細胞死を誘導する (Szatrowski TP et al. *Cancer Res* 1991)。核酸の酸化損傷の中でも、プリン塩基の酸化によって生じる 8-オキシグアニン (8-oxoG) や 2-ヒドロキシアデニン (2-OH-A) は謝った塩基対を形成する高い変異原性を有する。8-oxoG のゲノム DNA 中への蓄積は、DNA 中のグアニンの直接酸化と、ヌクレオチドプール内の dGTP の酸化で生じた 8-オキシ-2'-デオキシグアノシン三リン酸 (8-oxo-dGTP) が DNA ポリメラーゼにより DNA へ取り込まれることにより生じる。一方、DNA 中のアデニンの直接酸化では 2-OH-A はほとんど生成されないが、ヌクレオチドプール内の dATP の酸化により 2-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン三リン酸 (2-OH-dATP) が生じ、DNA へ取り込まれることで DNA 中に蓄積する。8-OHdG はシトシンと同程度の割合でアデニンと対合できるため、DNA の複製の際に G:C T:A もしくは A:T C:G トランスポージョン変異を引き起こす。これらの DNA の突残変異が修復されなければ、変異が蓄積して細胞死や発癌リスクの上昇に関連すると考えられている。生物は酸化ヌクレオチドの蓄積による細胞障害を抑制するための防御機構を有している (図 1) (Nakabeppu Y *Int J Mol Sci* 2014)。MTH1 (MutT-homologue 1, NUDT1) は大腸菌 MutT の相同体としてヒトで同定された酸化プリンヌクレオチド三リン酸分解酵素であり、ヌクレオチドプール中の 8-oxo-dGTP や 2-OH-dATP を 8-oxo-dGMP、2-OH-dAMP へ変換し、DNA やミトコンドリアへの酸化ヌクレオチドの組み込みを防止する。DNA 中でシトシンと対合したグアニンが直接酸化され生じた 8-oxoG には 8-oxoG DNA グリコシラーゼ (OGG1 遺伝子産物) が DNA からこれを除去することにより DNA 中の 8-oxoG を抑制している。MUTYH は DNA 中の 8-oxoG に対して誤って取り込まれたアデニンとグアニンに対合した 2-OH-A を除去する。細胞内では紫外線やエネルギー代謝によって ROS は常に生成されており、細胞は過度の酸化障害を防ぐために複数の抗酸化機構を有している。癌細胞は通常よりも強い酸化ストレス環境下で生存していることが報告されており、この適応機構は放射線や抗癌剤に対する耐性獲得の原因の一つであると考えられている。

本邦を含む東アジア地域は食道癌の好発地域として知られており、食道腺癌を主とする欧米と異なり、本邦では食道癌全体の 90% 以上は食道扁平上皮癌である。食道癌はいまだに進行癌として発見される頻度が高く、消

化器癌の中では、膵癌や胆管癌などと並んで予後不良な疾患であり、胃癌、大腸癌を含む消化管癌の中でも、食道癌の予後は極めて悪い。食道癌は悪性度の高い癌腫であり、その発癌メカニズムの解明や予後指標因子の確立、さらには新規治療の開発が急がれる。食道癌の発癌リスクとして、喫煙と飲酒は確立したリスク因子として知られている。当施設での症例対照研究では、喫煙指数 (Brinkman index) が 1000 以上の大量喫煙者では食道癌の発癌リスクは 3.9 倍、飲酒指数が 100 以上の大酒家では発癌リスクは 4.5 倍、大量喫煙者かつ大酒家の場合にはそのリスクは約 50 倍であった (Morita M et al. *Int J Clin Oncol* 2010)。喫煙や飲酒は生体への酸化ストレスを惹起する要因として知られており、組織中の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG との相関を検討した報告が存在する。食道癌と同様に喫煙を発癌リスクとする肺組織において、喫煙指数と 8-OHdG 発現量は正の相関を示すとされている (Asami S et al. *Carcinogenesis* 1997)。我々は食道においても同様に検討し、大量喫煙者で食道癌組織中の 8-OHdG 蛋白発現量の亢進と、酸化ストレス修復酵素である OGG1 蛋白の発現低下が観察された (Kubo N et al. *Dis Esophagus* 2014)。

近年、酸化ストレスにより損傷されたデオキシヌクレオチド (dNTP) が癌を促進し、酸化ストレスにより損傷した塩基の DNA への取り込みを防止する MTH1 の活性が形質転換細胞の生存に不可欠であることが明らかとなり、MTH1 阻害剤により大腸癌の治療効果が *in vivo* で示された (Huber KVM et al. *Nature* 2014, Gad H et al. *Nature* 2014)。

2. 研究の目的

食道癌の酸化ストレス修復酵素である MTH1 発現に着目し、飲酒や喫煙量等の酸化ストレス因子や酸化ストレスマーカーである 8-OHdG 発現や OGG1 等の他の酸化ストレス修復酵素、さらには臨床病理学的因子や生命予後との関連を検討し、その発現意義を解明する。さらに、MTH1 阻害薬による腫瘍制御を *in vitro*、*in vivo* にて検討し、新たな分子標的治療薬としての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 食道癌臨床検体における MTH1 発現と酸化ストレスマーカーとの関連の検討
食道扁平上皮癌の臨床検体において、免疫組織化学染色にて MTH1 蛋白発現を検討する。少数の臨床検体を用いて抗 MTH1 モノクローナル抗体にて試験的に染色したところ、MTH1 蛋白発現は正常細胞では観察されない一方で、癌細胞においてのみ観察され、MTH1 蛋白発現陽性例では核と細胞質に染色性を認められた。さらに、染色分布を観察すると、癌組織中のほぼ全ての癌細胞に均質に MTH1 蛋白の発現を認めるもの (Homogeneous expression)

と、癌組織の一部にのみ染色性を認めるもの (Heterogenous expression)、そしてほとんど染色性を認めない症例 (Negative/ Weak expression) とに分類した (図 3)。今後さらに症例数を増やして MTH1 蛋白の発現およびその発現分布について検討を進める予定である。我々は以前に、食道扁平上皮癌において核酸の酸化ストレスマーカーであり、DNA 中のグアニンの直接酸化と、ヌクレオチドプール内の dGTP の酸化で生じる 8-オキソ-2'-デオキシグアノシン三リン酸 (8-OHdG) の発現 (図 4A) と、DNA 中の 8-OHdG を除去修復する 8-OHdG DNA glycosylase (OGG1) の発現 (図 4B) について検討した (Kubo N et al. Dis Esophagus 2014)。食道正常組織に比べて食道扁平上皮癌組織中では、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG 発現量は上昇し、その一方で酸化ヌクレオチドを除去修復する OGG1 発現は癌組織中で低下していることが示された。本検討においても同様に、食道扁平上皮癌の臨床検体を用いて 8-OHdG 発現と OGG1 蛋白発現を免疫組織化学染色にて観察し、MTH1 蛋白発現とこれらの蛋白発現との関連を検討する。

(2) 食道癌臨床検体における MTH1 発現と臨床病理学的因子や予後との関連の検討
MTH1 蛋白発現と臨床病理学的因子について検討し、特に喫煙や飲酒などの酸化ストレスの原因と考えられている因子との関連を検討する。また、術後長期予後について検討することで、MTH1 蛋白発現の予後因子としての検討を追加する。

(3) ヒト食道癌細胞株における MTH1 発現と酸化ストレスマーカー発現の検討

当科が保有するヒト食道扁平上皮癌細胞 (TE1, TE2, TE3, TE5, TE8, TE10, TE12, TE13, TE14, TE15) において、抗 MTH1 モノクローナル抗体を用いて Western blotting を施行し、MTH1 蛋白発現を複数の食道癌細胞株に確認した一方で、線維芽細胞である MRC5 株においては MTH1 発現は低レベルであった (図 4)。臨床検体と同様に、各種酸化ストレスマーカーの発現を食道癌細胞株において観察し、各々の相関について検討する。さらに、培養液に過酸化水素水 (H₂O₂) を負荷することで酸化ストレスを加え、そのストレス応答の程度を MTH1 発現との各細胞株で観察する。

(4) ヒト食道癌細胞株における MTH1 発現抑制による酸化ストレス耐性への影響の検討

MTH1 発現レベルの高い細胞株 (TE12, TE14) に対して、MTH1 に対する siRNA を用いた発現抑制、または TH287, TH588 による MTH1 阻害を行い、H₂O₂ 負荷下での酸化ストレス反応 (OGG1 発現、8-OHdG, comet assay) を観察する。

(5) ヒト食道癌細胞株のマウス皮下移植モデルにおける MTH1 阻害薬の腫瘍制御の検討

ヌードマウスへ MTH1 高発現食道扁平上皮癌細胞株を皮下移植する Xenograft モデルを

作成する。このマウスに MTH1 阻害薬を投与し、腫瘍中の酸化ストレス反応 (OGG1 発現、8-OHdG, comet assay)、腫瘍量を計測して治療効果判定を行う。

以上の検討により、Huber らが提唱した MTH1 阻害薬を用いた新規治療戦略としての有用性を食道扁平上皮癌において考察する (図 5; Huber KVM et al Nature 2014)

4. 研究成果

食道扁平上皮癌の手術検体において MTH1 mRNA 発現レベルは正常組織に比較して癌組織において高かった。免疫組織化学染色では MTH1 高発現は深い壁深達度と静脈侵襲、高度な進行癌例と正に相関しており、MTH1 高発現例は低発現例に比較して予後不良であった。さらに MTH1 高発現例は独立した予後不良因子であった。

一方、8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) 発現は臨床病理学的因子や予後と相関しなかった。これらの結果から、MTH1 過剰発現は食道扁平上皮癌の予後予測因子となり、さらに治療標的分子となり得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)

Akiyama S, Saeki H, Nakashima Y, Iimori M, Kitao H, Oki E, Oda Y, Nakabeppu Y, Kakeji Y, Maehara Y. Prognostic impact of MutT homolog-1 expression on esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Med. 2017 Jan;6(1):258-266.

〔学会発表〕(計 4 件)

秋山 真吾, 佐伯 浩司, 北尾 洋之, 中島 雄一郎, 杉山 雅彦, 園田 英人, 大垣 吉平, 沖 英次, 掛地 吉弘, 前原 喜彦 食道扁平上皮癌における酸化ヌクレオチド浄化因子 MTH1 発現の意義の検討 第 71 回日本消化器外科学会総会 (2016 年 7 月 14 日 徳島)

秋山 真吾, 佐伯 浩司, 北尾 洋之, 枝廣 圭太郎, 是久 翔太郎, 谷口 大介, 工藤 健介, 堤 亮介, 中司 悠, 西村 章, 田尻 裕匡, 堤 智崇, 由茅 隆文, 笠木 勇太, 杉山 雅彦, 中島 雄一郎, 大垣 吉平, 園田 英人, 沖 英次, 掛地 吉弘, 前原 喜彦 食道扁平上皮癌における酸化ヌクレオチド浄化因子 MTH1 発現の生物学的意義と治療標的としての可能性 第 116 回日本外科学会定期学術集会 (2016 年 4 月 15 日 大阪)

秋山 真吾, 佐伯 浩司, 北尾 洋之, 中司 悠, 田尻 裕匡, 堤 智崇, 由茅 隆文, 笠木 勇太, 杉山 雅彦, 中島 雄一郎, 大垣 吉平, 園田 英人, 沖 英次, 掛地 吉弘, 前原 喜彦

彦 食道扁平上皮癌における MTH1 発現のバイオマーカーとしての意義 第 26 回日本消化器癌発生学会総会 (2015 年 11 月 20 日 米子)

(4)研究協力者

秋山 真吾, 佐伯 浩司, 北尾 洋之, 中司 悠, 田尻 裕匡, 堤 智崇, 由茅 隆文, 笠木 勇太, 杉山 雅彦, 中島 雄一郎, 大垣 吉平, 園田 英人, 沖 英次, 掛地 吉弘, 前原 喜彦 食道扁平上皮癌における MTH1 発現の意義の検討 第 53 回日本癌治療学会学術集会 (2015 年 10 月 29 日 京都)

〔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

中島 雄一郎 (NAKASHIMA, Yuichiro)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 40733564

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :