

令和元年6月12日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10510

研究課題名(和文)食道癌に対する個別化治療、予後予測を可能とするN型糖鎖マーカーの検索

研究課題名(英文) Search for N-type sugar chain markers that enable personalized treatment and prognosis for esophageal cancer

研究代表者

内門 泰斗 (Uchikado, Yasuto)

鹿児島大学・附属病院・特例准教授

研究者番号：30464465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌患者と健常者とを判別できた血漿中のN型糖鎖の変化に注目し、食道癌患者の治療に対する効果を予測するマーカーとならないか研究を進めた。48名の血漿中のN型糖鎖を測定した。その結果、手術前後、根治的化学放射線療法前後、治療効果での有無で変化のあった糖鎖を認めた。また、治療前の内視鏡検査時の生検で上皮間葉移行を起こしている食道癌は効果が乏しい傾向にあった。手術時に郭清されたリンパ節の微小転移の有無が治療効果と関係しており、糖鎖の変化が効果予測となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌患者に対する治療の前後で血漿中のN型糖鎖の変化を測定することができた。実際に治療効果で変化のある糖鎖も指摘できたことで、どの糖鎖の組み合わせがより治療効果を反映しているかを判定し、治療前の生検での免疫生化学検査も組み合わせることにより、今後、食道癌患者の治療を行うにあたり、血液検査によって、治療前に効果をより正確に予測することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We focused on N-glycans in plasma that distinguish between esophageal cancer patients and healthy individuals. We investigated whether we could predict the effect on the treatment of esophageal cancer patients. The N-glycans in the plasma of 48 patients with esophageal cancer were measured.

As a result, we found sugar chains that changed before and after surgery, before and after radical chemoradiotherapy, and with or without therapeutic effects. Moreover, as a result of examining the biopsy sample of the endoscopy before treatment, the esophageal cancer causing the epithelial-mesenchymal transition had a poor therapeutic effect. The presence or absence of micrometastases in the dissected lymph nodes was associated with therapeutic effects. In other words, it was suggested that changes in sugar chains could be predictive of effects.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 個別化治療 N型糖鎖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

消化器癌の中でも、食道癌はリンパ節転移と他臓器浸潤をきたしやすい悪性度の高い癌種である (Cancer. 97:1616-23, 2003), 手術・化学放射線療法・化学療法による集学的治療を行うことが重要である。近年の診断技術の向上, 新たな治療方法の開発により患者の予後は改善してきたが, 個別治療法の選択, その治療効果の判定, 再発予測や予後予測は, 困難である。治療では, 内視鏡的治療の発達, 手術に術前化学放射線療法・術前化学療法などを加えた集学的治療の発達により, 治療成績の向上しているが, 高度進行・再発食道癌の予後は依然不良で, 治療開始前より治療効果予測や再発を予測可能とすることも重要である。治療前からの効果予測可能な信頼できる腫瘍マーカーは確立されていないのが現状である。そこで, 食道癌患者の血液内の糖タンパク質の糖鎖に着目し, 血漿中の糖鎖を網羅的に解析し, 食道癌の新たな判定方法として, 糖鎖マーカーを検索し, 食道癌患者の血漿から, 遊離 N 型糖鎖を精製分離, MALDI-TOF MS による質量分析を行い, 得られたデータを多変量解析し, 食道癌患者と健常者との 2 群間で, 有意に変化している N 型糖鎖を同定した。さらに糖鎖を 5 つに絞り込み健常者と食道癌患者の半数症例との間で判別モデルを構築し, 残り半分の癌患者のモデルの Accuracy は, 82% で高率に判別可能であった。

### 2. 研究の目的

本研究では, 化学療法・化学放射線療法を行った食道癌患者の血漿中の N 型糖鎖を測定する。さらに, 微小転移・血中遊離癌細胞, EMT 関連蛋白の発現を検索し, 治療前後での治療効果, 再発, 予後についての解析を行う。さらに継続的経過観察が行われる症例で, 経時的な同一患者の糖鎖の変化についても検索することにより, 治療前の糖鎖発現から効果判定, 再発予測, 再発の早期診断, 予後予測が可能となるか検討を行う。また, 近年研究が進んできた薬剤耐性や自己複製能と同時に分化能を有する癌幹細胞の存在との関連性についても検索する。つまり, 食道癌に対する化学療法, もしくは化学放射線療法前の治療効果予測および予後予測を可能とする特異度の高い糖鎖腫瘍マーカーシステムの確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 食道癌症例の治療前後での経時的な血漿の糖鎖の発現パターンの解析

同意の得られた化学療法・化学放射線療法を行う食道癌症例を対象とし, 術前・術後・根治療法のいずれの治療も対象とした。治療前に得られた糖鎖発現パターンと治療を行って行く中で糖鎖発現パターンを解析した。経過観察の中で, 治療効果別に, また, 再発症例について, 糖鎖パターンを比較検討した。

方法: 血液の採取; 対象者の血液を採取し, 得られた検体は連結可能匿名化を行った後, -80℃ で凍結保存。

血液サンプルの作製・ラベル化; 血漿を N - グリコシダーゼ F 及びトリプシンにより処理を行い, その溶液を糖鎖補足ビーズ (BlotGlyco® for MALDI (住友ベークライト株式会社製)) により処理し, 遊離した糖鎖の捕捉, 及びラベル化を行った。

糖鎖分析の結果解析; ビーズに捕捉された糖鎖を精製・分離し, MALDI-TOF MS 測定し, Autoflex III smartbeam TOF/TOF (Bruker Daltonics 社製) を用い, データの収集・解析する。得られたマススペクトルから各糖鎖の定量化し, 糖鎖の存在量の総シグナル量を計算して, それぞれの糖鎖の比率で補正をした。

治療効果判定・予後予測のための統計解析; 統計解析ソフト (SIMCA P+ ver.12, Umetrics 社製) を使用し, 治療前から経時的にサンプルの糖鎖発現パターンの T - test を行い, 有意差 ( $p < 0.01$ ) を示す糖鎖を特定する。特定された糖鎖から, 治療効果の有無で共通する糖鎖発現パターンを解析し, また, 再発症例の経時的変化から, 再発症例に共通する糖鎖発現パターンを解析した。

#### (2) EMT 関連蛋白の発現や, 血中遊離癌細胞, 微小転移と血漿中の糖鎖発現パターンの解析

治療前生検標本の EMT 関連蛋白の発現や血中遊離癌細胞, またリンパ節微小転移と血漿中の糖鎖発現パターンについて検討した。

方法: 治療前の食道癌生検標本による EMT 関連蛋白の発現解析; 治療前の内視鏡検査で得られた原発巣の生検標本で, EMT 関連蛋白の発現 (Snail, Slug, Twist, TGF- $\beta$ , N-cadherin) を免疫組織学手法で解析を行った。

治療経過時の血中遊離癌細胞と, 切除症例のリンパ節微小転移の検索; RT-PCR を用いて血中遊離癌細胞の検出を行った。血液サンプルは, 糖鎖発現用と同じ日に採取する。切除症例のリンパ節微小転移を cytokeratin (AE1/AE3) 抗体を利用した免疫組織学的手法により行った。

EMT, 血中遊離癌細胞, 微小転移に関連する糖鎖の検索; (1), (2) で得られた結果をもとに, EMT 関連蛋白の高発現例, また血中遊離癌細胞陽性例, 微小転移陽性例における糖鎖発現パターンを解析し, 陰性例と比較検討し, 関連する糖鎖を検索した。

### 4. 研究成果

(1)症例集積：H28-H30 年度末までの症例数は、48 例であった。症例の内訳は、壁深達度 T1；10 例、T2；5 例、T3；2 1 例、T4；1 2 例で、リンパ節転移 N0；16 例、N1；22 例、N2；10 例で、ステージ ；6 例、 ；7 例、 ；35 例であった。治療の内訳は、内視鏡治療；3 例、手術 39 例、根治化学放射線治療；6 例であった。術前治療を行った症例は、32 例であった。

(2)N 型糖鎖の発現の変化：手術の前後で差を認めた糖鎖は 6 種類で認められた。根治的化学放射線療法の前後で差を認めた糖鎖は 4 種類で認められた。治療効果の有無での差を認めた糖鎖は、5 種類認めた。

(3)治療前の生検標本での EMT 関連蛋白の発現解析：5 例に行われ、Snail；2 例、Slug；2 例、Twist；1 例、TGF- ；0 例、N-cadherin；1 例で陽性で、いずれかが陽性であった症例は、治療効果が乏しい傾向にあった。

(4)切除症例のリンパ節微小転移の免疫組織学的解析：10 例に行われ、微小転移は 2 例に認め、明らかなリンパ節転移のあった症例に認めた。微小転移の有無で治療効果と関連を認めた。

(5)治療前後での生検標本からのスフェア形成：治療前の生検標本 5 例のうち 1 例から形成可能であった。治療後については、生検で採取可能な癌細胞数が極端に少なく形成することはできなかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Sasaki K, Uchikado Y, Natsugoe S.  
Neoadjuvant chemoradiotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil (DCF-RT) for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma.  
Cancer Chemother Pharmacol. 83, 581-587, 2019. 10.1007/s00280-018-03764-4. 査読あり
2. Shimonosono M, Sasaki K, Uchikado Y, Natsugoe S.  
Molecular pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma: Identification of the antitumor effects of miR-145-3p on gene regulation.  
Int J Oncol. 54, 673-688, 2019. 10.3892/ijo.2018.4657. 査読あり
3. Higo N, Uchikado Y, Sasaki K, Owaki T, Natsugoe S.  
Expression of SOX9 Is Related to Prognosis in Patients with Oesophageal Squamous Cell Carcinoma.  
In Vivo. 32, 835-838, 2018. 10.21873/invivo.11316. 査読あり
4. Kijima T, Sasaki K, Uchikado Y, Natsugoe S.  
Three-Dimensional Organoids Reveal Therapy Resistance of Esophageal and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Cells.  
Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 7, 73-91, 2018. 10.1016/j.jcmgh.2018.09.003. 査読あり
5. Arigami T, Uchikado Y, Sasaki K, Owaki T, Natsugoe S.  
Primary Tumor Score Based on Tumor Depth and Length Predicts Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma.  
Anticancer Res. 38, 5447-5452, 2018. 10.21873/anticancer.12876. 査読あり
6. Yanagi M, Sasaki K, Uchikado Y, Omoto I, Natsugoe S.  
Effect of Neoadjuvant Chemoradiotherapy on Lymph Node Micrometastases in Thoracic Esophageal Cancer.  
Anticancer Res. 38, 893-900, 2017. 査読あり
7. Osako Y, Omoto I, Sasaki K, Uchikado Y, Kita Y, Natsugoe S.  
Regulation of SPOCK1 by dual strands of pre-miR-150 inhibit cancer cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma.  
Journal of Human Genetics. 62, 935-944, 2017. 10.1038/jhg.2017.69 査読あり
8. Noda M, Uchikado Y, Omoto I, Sasaki K, Kita Yoshiaki, Owaki T, Natsugoe S.  
Correlation Between Biomarker Candidate Proteins with the Effect of Neoadjuvant Chemoradiation Therapy on Esophageal Squamous Cell Carcinoma.  
Annals of Surgical Oncology. 25, 449-455, 2017. 10.1245/s10434-017-6271-y 査読あり
9. Sasaki K, Uchikado Y, Omoto I, Kita Y, Natsugoe S.  
Role of 18F-FDG-PET/CT in Esophageal Squamous Cell Carcinoma After Neoadjuvant Chemoradiotherapy.  
Anticancer Res. 37, 859-864, 2017. 10.21873/anticancer.11390 査読あり

10. Tanabe K, Kita Y, Uchikado Y, Natsugoe S.  
Filamin C promotes lymphatic invasion and lymphatic metastasis and increases cell motility by regulating Rho GTPase in esophageal squamous cell carcinoma.  
Oncotarget. 24, 6353-6363, 2017. 10.18632/oncotarget.14087 査読あり
11. Desaki R, Kita Y, Uchikado Y, Natsugoe S.  
As a Novel Prognostic Marker, Cysteine/histidine-rich 1 (CYHR1) is a Therapeutic Target in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma.  
Ann Surg Oncol. 24, 586-593, 2017. 10.1245/s10434-015-5031-0 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 内門泰斗, 尾本至, 佐々木健, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 夏越祥次  
頸部食道癌に対する集学的治療の重要性。  
第 72 回日本食道学会学術集会, 2018 年
2. 内門泰斗, 尾本至, 佐々木健, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 夏越祥次  
気縦隔併用非開胸食道切除術は, 根治度を上げ, 低侵襲化に寄与したか?  
第 73 回日本消化器外科学会学術集会, 2018 年
3. Uchikado Y, Omoto I, Sasaki K, Kita Y, Natsugoe S  
Does a mediastinoscope-assisted esophagectomy contribute to curability and minimal invasive surgery?  
16th World Congress of the ISDE (国際学会), 2018 年
4. 内門泰斗, 尾本至, 佐々木健, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 夏越祥次  
胸部食道癌の頸部吻合再建における頸部ドレーンの抜去時期について。  
第 16 回日本消化器外科学会大会, 2018 年
5. 内門泰斗, 尾本至, 佐々木健, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 夏越祥次  
cT4 を除く Stage , の進行食道癌に対して DCF 療法を併用した術前化学放射線療法の効果  
第 41 回日本リンパ学会総会, 2017 年
6. 内門泰斗, 尾本至, 佐々木健, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 夏越祥次  
サルベージ手術の術後合併症予防, 再発予測  
第 71 回日本食道学会学術集会, 2017 年
7. 内門泰斗, 尾本至, 佐々木健, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 夏越祥次  
サルベージ手術における治療成績  
第 15 回日本消化器外科学会大会, 2017 年
8. 内門泰斗, 尾本至, 佐々木健, 喜多芳昭, 夏越祥次  
術前化学放射線療法において Docetaxel を加えた Low dose CF 併用化学療法はリンパ節転移の治療効果に貢献する  
第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2016 年
9. Uchikado Y, Omoto I, Sasaki K, Kita Y, Natsugoe S.  
The outcome of colon reconstruction in esophagectomy of esophageal cancer  
15th World Congress of the ISDE(国際学会), 2016 年

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：佐々木 健  
ローマ字氏名：SASAKI KEN  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：医歯学域附属病院  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：00418849

研究分担者氏名：喜多 芳昭  
ローマ字氏名：KITA YOSHIAKI  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：医歯学域附属病院  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：30570692

研究分担者氏名：大脇哲洋  
ローマ字氏名：OOWAKI TETSUHIRO  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：医歯学域医学系  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：50322318

研究分担者氏名：夏越 祥次  
ローマ字氏名：NATSUGOE SHOJI  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：医歯学域医学系  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：70237577

研究分担者氏名：尾本 至  
ローマ字氏名：OMOTO ITARU  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：医歯学域附属病院  
職名：助教

研究者番号 ( 8 桁 ): 90721217

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。