

令和元年5月10日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16551

研究課題名(和文)低酸素環境による食道癌化学療法耐性におけるマイトファジーの意義

研究課題名(英文)The role of mitophagy in drug resistance under hypoxia in esophageal cancer

研究代表者

益池 靖典(Masuike, Yasunori)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20781701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本をはじめとする東アジア圏で罹患数が多い食道扁平上皮癌について、一般に癌細胞が曝露されていると考えられる低酸素環境と、細胞の自浄機能の一つで2016年にノーベル医学・生理学賞を受賞したことで話題となったオートファジーとの関連性を調べる研究を実施した。大阪大学医学部附属病院消化器外科で手術を受けた食道癌患者159例の臨床切除検体について低酸素環境、オートファジーに関わる因子の発現を調べた。また、食道癌細胞を用いて、低酸素環境下でオートファジーに関わる因子が誘導されるか調べた。その結果、低酸素環境は細胞死などに関わるミトコンドリアに対するオートファジーを惹起してい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

本研究により、食道扁平上皮癌においては低酸素環境でのミトコンドリア選択的オートファジーが誘導されている可能性が示唆された。今後、低酸素環境を阻害する薬剤やミトコンドリア選択的オートファジーを阻害する薬剤の開発がすすめば、食道癌患者の予後を改善させることにつながると考えられる。また、低酸素環境はあらゆる他の癌種にも共通するものであることから、他癌種の治療開発においても同様に有用なエビデンスであり、全てのがんの死亡率の減少に大きく貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：We researched esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), which is frequently diagnosed in Eastern Asia. We focused on hypoxia and autophagy. Hypoxia is known as cancer related microenvironment. Autophagy is a self-degradative process and become popular after Dr. Osumi won the Nobel Prize in 2016 with clarifying the mechanism of autophagy. We collected 159 ESCC samples from patients who had surgically resection at Osaka University Hospital and investigated the expressions of factors related to hypoxia and autophagy. We also investigated the expressions in ESCC cell lines with or without hypoxic condition. The result suggested that hypoxia promotes selective autophagy to mitochondria, which is strongly related with apoptosis.

研究分野：癌

キーワード：食道扁平上皮癌 治療抵抗性 マイトファジー 低酸素 ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

消化器癌の中で悪性度の高い癌の一つである食道癌の治療成績は手術手技や周術期管理の向上に加え、化学療法の進歩などにより着実に向上してきているが、現在でも診断例全体の5年生存率は37.2%と、他癌に比して予後不良な癌であり、新規治療法の開発が望まれている。進行食道癌に対しては、標準治療として術前化学療法（NAC）後の手術療法が広く実施されているが、NAC非奏効例は予後不良であり、化学療法抵抗性を改善することが治療成績の向上につながると考えられる。

### 2. 研究の目的

予後不良な食道癌の新たな治療戦略へつなげるため、今回の研究で食道扁平上皮癌の化学療法抵抗性メカニズムにおける低酸素環境とミトファジーの関連性を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 食道扁平上皮癌臨床検体における低酸素マーカー及びPink-1発現解析と臨床病理学的情報・予後との相関：

当院で2000年～2011年に根治切除術を施行した進行食道扁平上皮癌159例の切除サンプルを用いて、低酸素マーカー及びPink-1の蛋白発現状況と治療効果を含めた臨床病理学的情報・予後との相関を検討した。また、化学療法の有無と低酸素マーカー及びPink-1の発現状況に相関があるか検討した。

(2) 食道扁平上皮癌臨床検体における低酸素マーカー及びPink-1発現解析と両者の染色局在の相関：

上記の食道扁平上皮癌159例の切除サンプルの連続切片を用いて、低酸素マーカーの染色局在とPink-1の染色局在の間に相関があるか検討した。

(3) 食道扁平上皮癌細胞株における低酸素環境下のWarburg効果・ミトファジー誘導について(in vitro解析)：

食道扁平上皮癌細胞株パネルを用いて、低酸素環境におけるHIF-1 $\alpha$ とPink-1の発現、また両者の発現の相関を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮癌臨床検体における低酸素マーカー及びPink-1発現解析と臨床病理学的情報・予後との相関：

低酸素マーカーであるHIF-1 $\alpha$ の免疫染色を102例に対して行い、陽性率は66.7%(n=68)であった。HIF-1 $\alpha$ の発現と臨床病理学的特徴には関連は見られず、Pink-1発現との相関も見られなかった(p=0.138, 一致率55.7%, n=57)。(図2)

他の低酸素マーカーであるGLUT-1では、139例について免疫染色を行い、陽性率は66.2%(n=92)であった。症例全体としてGLUT-1発現と組織学的治療効果(p=0.007)、リンパ管侵襲(p=0.049)、静脈侵襲(p=0.029)に関連が見られた。しかしながら、Pink-1発現との相関は見られなかった(p=0.072, 一致率59.0%, n=82)。(図3)

同じく低酸素マーカーであるCA9については、102例の免疫染色を行い、陽性率は49.0%(n=50)であった。CA9発現と臨床病理学的情報との関連はなく、Pink-1発現との相関も見られなかった(p=0.843, 一致率48.0%, n=49)。(図4)

(2) 食道扁平上皮癌臨床検体における低酸素マーカー及びPink-1発現解析と両者の染色局在の相関：

局所の染色評価では、HIF-1 $\alpha$ 陽性部のPink-1陽性率は83.3%と高値であり、局所的に低酸素環境がミトファジーを誘導している可能性が示唆された。GLUT-1及びCA9については、局所的なPink-1発現との相関は見られなかった。(図5)

図1

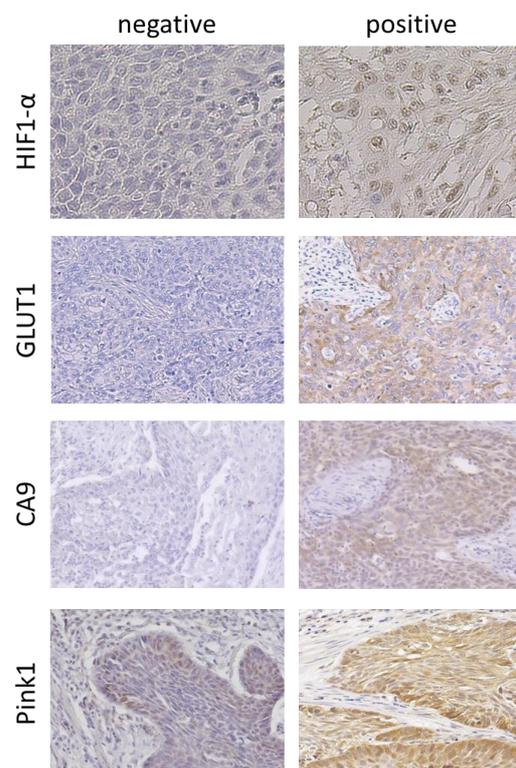


図 2

		HIF-1α positive (n=68)	HIF-1α negative (n=34)	p value
Age	Median(range)	65 (58-71)	63 (58-68.3)	p=0.863
Gender	Male/Female	59/9	28/6	p=0.564
NAC	DCF/FAP	9/59	10/24	p=0.061
Histology	poor/wel, mod	13/55	10/24	p=0.315
Lymph invasion	-/+	11/57	7/27	p=0.591
Vascular invasion	-/+	36/32	23/11	p=0.203
Clinical response of tumor	PD, NC/PR	34/34	19/15	p=0.675
Pathological response of tumor	0, 1a/1b, 2	50/18	29/5	p=0.216
pT	0-2/3, 4	26/42	8/26	p=0.182
pN	0/1-3	15/53	11/23	p=0.336
pStage	I, II/III, IV	28/40	14/20	p=1.000

	Pink-1 positive	Pink-1 negative
HIF-1α positive	34 (50.0%)	34 (50.0%)
HIF-1α negative	11 (32.4%)	23 (67.6%)

Fisher p = 0.138

図 3

		GLUT-1 positive (n=92)	GLUT-1 negative (n=47)	p value
Age	-64/65-	44/48	30/17	0.105
Gender	Male/Female	79/13	39/8	0.628
NAC	DCF/FAP	16/76	11/36	0.497
Histology	poor/wel, mod	24/68	11/36	0.837
Lymph invasion	-/+	15/77	15/32	0.049
Vascular invasion	-/+	48/44	34/13	0.029
Clinical response of tumor	PD, NC/PR	44/48	24/23	0.724
Pathological response of tumor	0, 1a/1b, 2	70/22	25/22	0.007
cT	0-2/3, 4	15/77	10/37	0.490
cN	0/1-3	9/83	6/41	0.577
cStage	I, II/III, IV	13/79	13/34	0.067
pT	0-2/3, 4	27/65	20/27	0.133
pN	0/1-3	25/67	16/31	0.435
pStage	I, II/III, IV	34/58	24/23	0.146

	Pink1 positive	Pink1 negative
GLUT-1 positive	55 (59.8%)	37 (40.2%)
GLUT-1 negative	20 (42.6%)	27 (57.4%)

Fisher p = 0.072

図 4

		CA9 positive (n=50)	CA9 negative (n=52)	p value
Age	-64/65-	28/22	25/27	0.436
Gender	Male/Female	41/9	46/6	0.411
NAC	DCF/FAP	17/33	8/44	0.038
Histology	poor/wel, mod	15/35	12/40	0.503
Lymph invasion	-/+	7/43	15/37	0.092
Vascular invasion	-/+	31/19	32/20	1.000
Clinical response of tumor	PD, NC/PR	22/28	20/32	0.688
Pathological response of tumor	0, 1a/1b, 2	31/19	36/16	0.533
cT	0-2/3, 4	6/44	10/42	0.417
cN	0/1-3	4/46	4/48	1.000
cStage	I, II/III, IV	6/44	9/43	0.579
pT	0-2/3, 4	19/31	17/35	0.679
pN	0/1-3	16/34	13/39	0.512
pStage	I, II/III, IV	19/31	23/29	0.552

	Pink1 positive	Pink1 negative
CA9 positive	24 (48.0%)	26 (52.0%)
CA9 negative	27 (51.9%)	25 (48.1%)

Fisher p = 0.843

図 5

	Pink-1 positive	Pink-1 negative
HIF-1α positive	50(83.3%)	10(16.7%)
HIF-1α negative	51(56.7%)	39(43.3%)

Fisher p < 0.01

	Pink-1 positive	Pink-1 negative
GLUT-1 positive	43 (64.2%)	24 (35.8%)
GLUT-1 negative	17 (60.7%)	11 (39.3%)

Fisher p = 0.82

	Pink-1 positive	Pink-1 negative
CA9 positive	32 (58.2%)	23 (41.8%)
CA9 negative	10 (50.0%)	10 (50.0%)

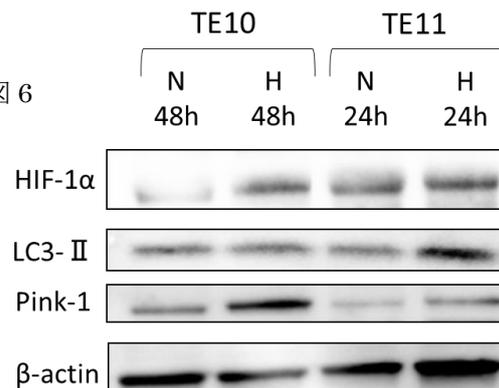
Fisher p = 0.60

(3) 食道扁平上皮癌細胞株における低酸素環境下の Warburg 効果・マイトファジー誘導につ

いて(in vitro 解析):

食道扁平上皮癌細胞下部 TE10、TE11 について低酸素環境における Pink-1 及びオートファジーマーカーである LC3 の発現について Western Blotting 法で調べたところ、低酸素曝露下で Pink-1 及び LC3 の誘導が示唆された。(図 6)

図 6



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔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：

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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。