

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～2008

課題番号：19591572

研究課題名（和文）

進行食道癌化学放射線療法感受性に対する予後規定因子の検索およびその臨床応用

研究課題名（英文）

Clinical application and exploration of prognostic factors to chemoradiotherapy sensitivity in esophageal cancer patients after neoadjuvant therapy

研究代表者

藤原 由規 (FUJIWARA YOSHINORI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：10258155

研究成果の概要：

BMI1 は、hedgehog(Hh) pathway の Downstream に位置し、癌幹細胞の増殖、血液幹細胞、神経細胞、腸管細胞の self-renewal に重要な役割を果たすことが知られている。近年の私どもの報告では、Hh signal 活性化は、進行食道癌の早期再発が予測されることを報告してきた。しかしながら術前化学放射線療法(以下CRTと略する)を行った食道扁平上皮がんにおけるBMI1 発現の臨床的意義については明らかにされていない。食道扁平上皮がんと診断され、術前 CRT を行った 78 名の患者を検討した。その結果、24 名の患者は BMI1 陽性であった。BMI1 陽性患者の予後は、そうでない患者に比べ有意に不良であった(mean DFS time :16.8 vs 71.2 months; 3-yr DFS: 13.3% vs49.9%, p=0.002; OS time 21.8 vs 76.6 months; 3-yr OS 16.2% vs 51.7%, p=0.0005)。p16 と BMI1 発現の相関性は認めなかった。今回の研究は、①BMI1 発現は、進行食道癌 CRT 後切除患者の早期再発と予後の Predictor となりえる。②Hh pathway における BMI1 signal の活性化は、進行食道癌 CRT 後の癌再発と進行の promotion する可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：癌幹細胞、Hh signal、食道癌、化学放射線療法

1. 研究開始当初の背景

食道癌の悪性度は高く、多くの患者が癌により死亡することが知られている。日本は、欧米諸国に比べ、扁平上皮がんが多いことが知られている。さらに、食道癌は、粘膜下層に浸潤すると脈管侵襲、リンパ管侵襲が30-40%に認められその悪性度の高さが知られている。5年生存率は、20-40%であり、根治手術が行われたとしても術後に再発、転移を起こすことが知られている。進行食道癌の予後向上のためには、Multidodal treatmentの確立が重要である。われわれは、1996年度よりT3, T4進行食道がんに対して術前化学放射線療法(CRTと略する)を導入し、手術と組み合わせてその切除度を高め、遠隔再発を抑えて予後が向上することを報告してきた(Fujiwara et al, 2005)。しかしながら、術前CRTに対する利点は明らかではない。約25%の患者さんが病理学的CR(Complete response)するものの残りの75%の患者さんは、放射線抵抗性を示し、リンパ節再発、遠隔転移を起こすことが知られている(Coia et al, 2000; Iyer et al, 2004)。それゆえに、これらの治療法を行った後の再発を予測するBiomarkerの検索が必要である。近年、癌幹細胞の概念が提唱されている。そのがん幹細胞は腫瘍細胞の一部の集団として存在し、自己複製能、不均一性、多分化能を示す。そのより悪性度の高いCancer progenitor cellは、種々の治療法に抵抗し生き残ることが知られている(Reya et al, 2001)。この癌幹細胞は、種々のがんで同定されており、Breast(Al-Hajj et al, 2003), lung (Kim et al, 2000), colon(O'Brien et al, 2007), pancreas(Li et al, 2007)が今日まで報告されている。Bmi1(B-cell-specific Monoclonal murine leukaemia virus integration site 1)は、Eμ-myc導入マウスにおいて、collaborating oncogeneを評価しているときにレトロウイルス導入の突然変異で同定されました(van Lohuizen et al, 1991, Haupt et al, 1991)。Bmi1は、PcG(Polycomb group) familyに属するたんぱく質で、造血、細胞増殖の調整、および老化現象に関与している転写抑制因子である(Pirrota et al, 1998)。それは、細胞の成長停止、細胞の老齢化およびApoptosisを起こすことができるP16とp19をコード化するINK4Aを抑制することにより細胞の自己複製能を維持することが知られている(Jacobs et

al, 1999, and 1999, Smith et al, 2003)。PcG蛋白は、その結合部位のまわりでヒストンH3のリジン27でのメチル化で標的遺伝子のクロマチンをマークすることにより染色体構造を変更することが知られている(Spivakov et al, 2007)。近年、Bmi1は、人乳がん幹細胞において hedgehog (Hh) pathwayのGli-1と同様に正常細胞とがん細胞の自己複製のKey regulatorであることが知られている(Liu et al, 2006)。さらに、近年のわれわれの研究では、進行食道癌CRT後手術症例の解析では、Hh signalの活性化は、癌の再発を早期に予測することができ、予後が悪いことを報告した(Yoshikawa et al, 2008)。Bmi1は、髄芽腫のHh伝達経路の下位に位置するために、食道癌CRT後の悪性度の高い細胞の性質を反映する可能性がある(Leung et al, 2004)。

2. 研究の目的

食道癌CRT後の患者において、Hh伝達経路の下流に位置するBmi1の役割を解析したデータは存在しない。本研究は、retrospectiveに進行食道癌CRT後の食道扁平上皮癌組織におけるBmi1蛋白の発現を評価することによりその臨床的意義、予後との相関性を検討した。

3. 研究の方法

対象患者および治療方法：

78名、食道扁平上皮がんの患者(平均年齢62歳、65名:男性、13名:女性)を対象とした。術前CRTは、5-FU:500mg/m² x 5日、Day1-5、CDDP:15-20mgX5日、day1-5、放射線照射は2 Gy/回 x 20回=40Gy(総量)であった。放射線はlinear accelerator (Mevatron KD2, Siemens, Germany)を使用した。放射線終了後4-7週で、右開胸食道切除、2-3領域リンパ節郭清を行った。Follow up情報は、Office chart、カルテより得た。本プロトコールの本学の倫理委員会の承認は得ている。

術前評価：

放射線終了後2-3週で、re-stagingを行う。すなわち、内視鏡、造影CT、食道造影で、病変の再評価を行う。RECIST分類に準じて効果判定を行う。内視鏡検査にて完全に腫瘍が消失しており、転移巣も消失したときにときにCR(Complete response)と診断した。

免疫組織学的染色：

切除後の標本はホルマリン固定し、パラフ

インで固定後、縦切りにした。抗原性回復のために、切片は 98°C、10 mmol/L sodium citrate (pH 6.0) で 20 分間加熱しました。ついで、それらは ヒト Bmi1 mouse monoclonal antibody (Upstate, Lake Placid, NY, USA)、ヒト Gli-1 mouse monoclonal antibody (C-18, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、ヒト p16^{INK4A} mouse monoclonal antibody (F-12, Santa Cruz Biotechnology) を使用して incubate され、Envision kit (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) により視覚化した。スライドは、ヘマトキシリンで対比染色を行い、固定する。正常マウス IgG は primary 抗体として negative control として用いた。スライドは、2 人の病理医により評価された。核内 Bmi1 発現は、5 段階に評価された。no specific staining or <5% of the tumour cells (-); ≥5% to <35% of the tumour cells (+); ≥35% to <65% of the tumour cells (++) and ≥65% tumour cells (+++).

統計解析：

OS (Overall survival) は、治療開始から生存が確認された日までとした。DFS (Disease-free survival) は、治療後、生検に癌が存在しない期間とした。単変量解析では、グループ間の生存率の差を検定した。生存率は Kaplan-Meier 法を用い、Log-rank test で検定を行った。統計解析は、STATISTICA statistical software, version 06J を使用した。

4. 研究成果

Patient and tumour characteristics

全例、食道扁平上皮癌であった。75 名の患者が胸部食道がんであった。TNM 分類では、Stage II が 30 名 (38.5%)、Stage III が 32 名 (41.0%)、Stage IV が 16 名 (20.5%) に認められた。診断時、24 名の患者 (43.6%) にリンパ節転移を認めた。全病変は、深達度 T3, T4 であった。3/4 の患者は、腫瘍の長径は 6-8cm であった。M+ 患者は 12 名であった。3 名の患者は経過中に肝臓に転移した。Follow up 中、17 名 (21.8%) の患者が局所再発、残存腫瘍であった。10 名の患者 (12.8%) が頸部、腹腔動脈周囲のリンパ節に転移した。14 名の患者 (17.9%) が遠隔転移をおこした。41 名の患者 (52.6%) が経過中に死亡した。

BMI1 positivity predicts early recurrence and poor prognosis

28 名の患者が、病理学的 CR (Complete response) であった。Bmi1 免疫染色は、食道扁平上皮癌の核内に認められた。Bmi1 発現は 26 名の患者に認められたが、24 名の患者には認められなかった。Gli-1 発現 (+) の患者、全員に Bmi1 発現を認めた。Bmi1 (+) group では、24 名のうち 18 名 (75%) に再発を認めた。

7 名の患者が局所再発で、11 名の患者が遠隔転移を認めた。一方、Bmi1 (-) group、残存腫瘍 (-) group では、24 名の患者に再発を認めた。局所再発 16 名、遠隔再発 8 名であった。遠隔再発は、Bmi1 (+) 患者に多く認められた。単変量解析では、リンパ節転移、遠隔転移、腫瘍深達度が予後規定因子であった ($p < 0.001$)。さらに、CRT の効果は、有意な予後規定因子であった ($p < 0.001$)。腫瘍の免疫組織学的染色にて、Bmi1 (+) 患者の予後は、そうでない患者に比べて有意に不良である。Bmi1 (+) group は、16.8 ± 4.5 months (95% CI 7.9-25.7 months)、Bmi1 (-) group は 71.2 ± 8.9 months (95% CI 53.9-88.6 months) であった ($p = 0.002$)。OS は、Bmi1 (+) group は、21.8 ± 4.7 months (95% CI 158.1-615.3 months)、Bmi1 (-) group は 76.6 ± 8.6 months (95% CI 59.8-93.4 months) であった ($P = 0.0005$)。1 年、3 年生存率は、DFS に関しては、Bmi1 (+) group vs Bmi1 (-) group では、53.3% vs 77.8%、13.3% vs 49.9% であった。OS は、59.3% vs 81.2%、16.2% vs 51.7% であった。

Correlation between BMI1 and p16^{INK4A}

p16^{INK4A} は、核内、細胞質内に染色された。55.2% の患者が Negative で、25.6% の患者が弱陽性、19.2% の患者が強陽性であった。統計学的に、p16^{INK4A} 陽性と Bmi1 陽性は相関性を認めなかった ($p = 0.7662$)。

考察

われわれは、すでに進行食道扁平上皮癌 CRT 後患者における CXCR4 発現、Hh signal の活性化が早期の再発を起こし、その予後が不良であることを報告してきた (Koishi *et al*, 2006, Yoshikawa *et al*, 2008)。われわれの所見は、幹細胞 renewal 因子は、種々の治療に反応することにより、少なくとも部分的に、しかし重要に、腫瘍細胞の表面の周りの微小環境 (ニッチ) のもとで再発、転移を起こすことを提唱している。さらに、近年の研究では、Hh signal の活性化に沿った Bmi1 蛋白の発現は、CRT 後の予後不良患者の信頼できる Biomarker として示されている。Glinsky らは、前立腺、乳腺、肺、卵巣、膀胱癌、リンパ腫の治療の後に発癌遺伝子由来の 11Bmi1 の発現は、5 年以内に再発を起こす可能性が高いといわれている。そして、CD44+/CD24- 血液由来人前立腺がん (転移前駆細胞集団) が Bmi1 と Ezh2 の高発現をすることが知られている (Glinsky, 2008)。考え合わせると、これらのデータは、Hh signal の活性化は、種々の臨床的な致死、治療耐性の癌の原因となること可能性を強く示唆するものである。興味深いことは、本研究での Bmi1+ 患者の 70.8% が同時に CD44 陽性となっていることである (データ示さず)。最終的には、癌 progenitor 細胞の幹細胞マーカーのネットワークは、癌の再燃、治療抵抗性の

原因となるかもしれない。注目すべきことに、現在まで食道扁平上皮癌 CRT 後の臨床的治療戦略としては特定のものはない。CRT 後患者の Bmi1、Gli-1 発現は重要な情報であり、かつ治療抵抗性の subgroup の患者の層別化に需要である。積極的な化学療法あるいは Hh-PcG chromatin-silencing pathways の Blocker を用いる臨床研究よりも QOL を重視する何人かの患者がいるかもしれない。近年の食道癌治療の進歩にもかかわらず、臨床医は、食道癌術後の CRT 抵抗癌細胞の治療に日夜取り組んでいるのが現状である。すなわち、現在の治療法は、癌幹細胞の不活性化を行うには不十分であり、新たな治療戦略を確立させる必要がある。Sims-Mourtada らは、in vitro で Hh 由来の化学療法抵抗性が、Hh の Blocker により抑制されることを突き止めた (Sims-Mourtada *et al*, 2007)。癌幹細胞による治療抵抗性の分子 Mediator が確立されたとき、Hh-PcG 経路に絞ったその抑制剤の臨床研究に発達するであろう、そして術後再発高 Risk 患者の治療に有用となるだろう。本研究は、Bmi1 陽性と陰性群に差を認めなかった。一方、melanoma において P16^{INK4A} による Bmi1 の regression は、転移の頻度を上昇させる報告がある (Mihic-Probst *et al*, 2007)。さらに、P16^{INK4A} 遺伝子発現 (主に頻繁な P16^{INK4A} プロモーターメチル化に起因する) の欠損は、食道癌患者の予後を不良にすることが知られている (Takeuchi *et al*, 2004)。この矛盾した結果は、治療に起因するかもしれない。P16^{INK4A} の活性化メカニズムは、がん細胞およびニッチにおいてより上流の Bmi1 により直接自己複製と分化能を調節しているのかもしれない。このように、CRT 後の食道扁平上皮がんにおいて、Bmi1 による P16 の抑制は明らかではない。むしろ、Hh 伝達経路における Bmi1 および Gli-1 の活性化が癌の進行を助けていると考えられる。

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 1 件)

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 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.

② 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.

③ 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.

④ 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.

⑤Yoshikawa 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 CXC chemokine receptor 4 (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. 43st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, USA, Jun 1-5, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

辻村 亨 (TSUJIMURA TOHRU)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：20227408

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

(3) 連携研究者

該当なし