

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17696

研究課題名（和文）食道癌間質における癌関連線維芽細胞由来分子による転移・浸潤促進機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of metastasis/invasion promotion mechanism by cancer-associated fibroblast-derived molecules in esophageal cancer stroma

研究代表者

菅家 康之（Kanke, Yasuyuki）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30866223

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では食道癌における癌間質の役割と癌関連線維芽細胞CAFに由来するVCAN、POSTN、LUMの臨床的意義に迫り、微小環境バイオマーカーとしての価値を追求し個別化医療への道を開くことが本研究の目的である。食道扁平上皮癌（ESCC）手術後症例においてCAF関連分子、VCAN、POSTN、およびLUMの発現を調査し、食道切除術を受けた106人のESCC患者を対象とした。癌間質でのVCAN、POSTN、またはLUMの高発現症例では、無再発生存期間および全生存期間が有意に低下していた。またVCANまたはLUMの高い発現は、患者における無増悪生存期間の独立した予後因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌間質におけるVCAN、POSTN、またはLUMの高発現レベルは、ESCC症例の無再発生存期間および全生存期間の低下と有意に関連していた。また間質VCANまたはLUMの高発現は、無増悪生存期間の独立した予後因子であった。本研究は、特にVCANおよびLUMの間質発現が、術後ESCC患者における再発予測のバイオマーカーとして臨床的に有用である可能性があることを示した。今後、根治切除術を受けた食道扁平上皮癌症例において、現在の術後補助化学療法の適応となりうる集団から、より再発リスクの高い集団での治療を選択できうる可能性を示した。今後さらなる研究を進めることで実臨床での応用を期待する。

研究成果の概要（英文）：The present study aimed to investigate the expression of Cancer-associated fibroblasts (CAFs) related molecules, VCAN, POSTN and LUM, in cancer stroma, to provide prognostic stratification for patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) after surgery. A total of 106 patients with ESCC who underwent curative esophagectomy without preoperative chemotherapy or radiotherapy were enrolled. The expression of VCAN, POSTN and LUM was examined and the prognostic value was assessed. Compared with a low expression level, a high expression level of VCAN, POSTN or LUM in the cancer stroma was significantly associated with worse relapse free survival and overall survival times in patients with ESCC. High stromal VCAN or LUM expression was an independent prognostic factor for RFS in the patients. The present study demonstrated that stromal expression of VCAN and LUM in particular may have clinical utility as a prognostic biomarker for poor RFS in postoperative patients with ESCC.

研究分野：消化管癌、消化器外科

キーワード：食道癌 癌関連線維芽細胞 癌間質

1. 研究開始当初の背景と2. 研究の目的

近年、癌研究において癌細胞のみならず癌間質が発育、浸潤、転移に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。癌間質は線維芽細胞、血管内皮細胞や血球・免疫細胞などの骨髄由来の炎症・免疫関連細胞、細胞外基質などで構成されるが、なかでも癌間質における線維芽細胞は癌関連線維芽細胞：Cancer-associated fibroblast (CAF)と呼ばれ注目されている。癌間質は癌細胞の生存や増殖を育む微小環境(Tumor microenvironment :TME)として認識され、浸潤や転移、血管新生を促進するとともに組織内の heterogeneity を生み出し治療抵抗性を惹起する。またTMEにおけるNF- κ Bなどの転写因子やサイトカインが炎症依存的な発癌を促進されることもよく知られている。そのため間質は個々の癌の臨床的な特徴を規定しうる重要な因子である。当研究室はこれまでに、癌間質が発癌や癌の進展と不可分な関係にあることを報告してきた。また近年の癌浸潤・転移研究(Colon Cancer Cell 2012)や癌間質研究(Colon Nat Genet 2015)により、癌間質でのTGF- β の発現が浸潤・転移を促進していることが解明されている。TGF- β は本来、正常組織細胞により産生され癌細胞の増殖抑制に働くが、癌細胞のゲノム異常により徐々にTGF- β 経路が不活化され、TGF- β の制御から逸脱していく。加えて、癌の進行に伴いTGF- β 産生はparadoxicalに増加していく。間質細胞が機能的TGF経路を保持していることと併せて考えると、これはTGF- β シグナルの意義が上皮から癌間質に移っていくことを反映するものと思われる(Cancer cell 2012)。多くの大腸癌において進行とともにTGF- β 経路が不活化されており、当科では大腸癌間質のCAFに由来するVCANの発現が転移、浸潤および根治切除後の再発に関与しているという報告をしてきた(Carcinogenesis, 2016)(Fig3B)。大腸癌と同様に食道癌においてもTGF- β 経路が不活化されており、VCANの予後予測バイオマーカーとしての有用性が期待できる。POSTNはTGF- β 2またはTGF- β 3によって誘導されており、癌幹細胞の維持や転移の抑制系の機能を阻害すると報告されている。また、Wntリガンドを誘導し、癌幹細胞においてWntシグナルを増強させる。すなわち間質においてのPOSTNの発現は癌幹細胞性や転移、進展の促進に働き、Wnt/ β -cateninシグナルを増強させている(Nature 2012)。POSTNは、ESCCにおいて過剰発現を認めており、予後予測マーカーとしての有用性を期待できるが、臨床的意義の追求は未だなされていない。LUMもCAFに由来する糖たんぱく質で、乳癌、膵癌、肝細胞癌、大腸癌において浸潤、転移を促進するとされている。特に大腸癌においてはリンパ節転移と有意に正の相関をする。膵腺癌において、LUMはTGF- β 経路を介して発現を抑制されると報告されている(Clin Cancer Res 2016)。食道疾患においては、Barrett食道、食道腺癌と同様に、ESCCにおいてもmRNAの過剰発現を認めている。ESCCにおいてVCAN、POSTNと同様に予後予測マーカーとしての有用性を期待できるが、臨床的意義の追求はされていない。そこで、当院での手術症例に関して、VCAN、POSTN、LUM発現の有無がその予後予測に有用かどうかを検討した。

3. 研究の方法

対象

2004年7月～2019年7月までの15年間における福島県立医科大学消化管外科学講座での食道癌手術は304症例であった。病理組織学に扁平上皮癌と診断された症例の中で、異なる癌腫が混在する症例は除外した。扁平上皮癌のみの221症例から術前治療介入(化学療法か放射線療法、または、その両方)を施行していない106症例を対象とした。病期分類は食道癌取扱い規約第11版に従った。摘出標本内に連続しない2病変および3病変を認めた症例がそれぞれ2症例ずつあった。それらに関しては、最も深達度の深い病変を評価対象とした。臨床学的・病理学的な最終確認は2019年10月であり、主要評価項目は無再発生存期間とし、平均追跡期間は51.9か月であった。

免疫染色

患者から切除した腫瘍組織は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)し、永久標本とした。VCANの染色には、Primary rabbit polyclonal anti-VCAN antibody (HPA004726, Prestige Antibodies® Powered by Atlas Antibodies, Sigma-Aldrich, Co. LLC, St. Louis, MO)を用いた。まず、クエン酸緩衝液10mMに105℃でオートクレーブしたのちに回収し、間質に発現したVCANを免疫染色したのち、染色の強さ(なし：0点、弱：1点、強：2点)と広がり(間質の0～5%：0点、5～25%：1点、25%以上：2点)の2項目に関して、複数人で評価して、合計点0～2点をVCAN low、3点以上をVCAN highと定義した。

統計分析

統計解析には、 χ^2 乗検定、Mann-Whitney U 検定を用いてVCAN highとVCAN lowの2群間の有

有意差を検定した。累積生存曲線に関しては、Kaplan-Meier 法を用いた。両群間の有意差は log-rank 検定をおこなった。単変量および多変量解析には Cox 比例ハザード分析を用いた。Graphpad Prism v6.0 (Graphpad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)と R v3.1.1 (A language and environment for statistical computing. R Development Core Team, Vienna, Austria.)を使用し、p 値は 0.05 未満を有意差ありと判断した。

4. 研究成果

間質 VCAN の免疫染色を評価した結果、合計点 3 点以上の VCAN high 群に分けられたのは 56 症例で、2 点以下の VCAN low 群は 50 症例であった。それぞれのグループに関して、患者背景を Table1 に示した。VCAN high グループの年齢平均は 65.7 ± 8.17 歳であり、VCAN low グループでは 63.8 ± 8.19 歳であった ($p=0.2324$)。男女比はそれぞれ 48 : 8 と 45 : 5 であった ($p=0.7077$)。術前補助療法は両群で導入していない。術後補助療法は VCAN high 群において 13 例に補助化学療法を、2 症例に補助放射線療法を施行した。一方、VCAN low 群では 5 例に補助化学療法を施行したのみであった。どちらの群も 40 症例以上には術後補助療法は導入されなかった ($p=0.2111$)。局在は全体的に中部下部食道に多い傾向がみられたが、両群に有意差を認めなかった。深達度は VCAN low 群に比較して VCAN high 群で有意に深い傾向を認めた ($p=0.0085$)。しかし、リンパ節転移では両群で有意差を認めなかった ($p=0.1256$)。病理学的ステージにおいて、VCAN high 群で有意に進行が認められた ($p<0.0001$)。

全ステージを対象に、全生存期間および無再発生存期間を Kaplan-Meier 法で解析をおこなった。どちらも VCAN high 群で有意に低下を認めた(それぞれ $p=0.0017$, $p<0.0001$, Fig.1)。各ステージ別の無再発生存期間についても Kaplan-Meier 法で解析をおこなった(Fig.2)。ステージの進行に伴い VCAN high 群に属する症例数が増加する傾向を認めたが、各々のステージにおいて VCAN high 群の予後が増悪する傾向が認められた(Stage0: $p=0.6650$, Stage 1: $p=0.075$, Stage 2: $p=0.0237$, Stage 3: $p=0.2880$)。

これらの結果から、間質 VCAN(high vs low)、腫瘍深達度(T1 vs T2-4)、リンパ節転移(N(-) vs N(+))、年齢、性別を説明変数として、無再発生存期間に関して Cox 比例ハザード回帰分析を用いて、単変量および多変量解析をおこなった(Table2)。単変量解析では間質 VCAN、深達度、リンパ節転移の有無が有意差を認めた ($p<0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.004$)。しかし、多変量解析では間質 VCAN および深達度のみが有意差を認め、互いに独立した予後規定因子を同定された ($p=0.01218$, $p<0.0001$)。

近年の先行研究で、癌関連微小環境における癌間質の役割が重要視されてきている。間質での TGF- β の産生は、癌の進行に伴い増加を認め、CAF に由来する TGF- β の発現が癌細胞増殖、血管新生、浸潤、転移および根治切除後の再発に関与していると報告されている。これまで他の消化器癌において、TGF- β の一種である間質 VCAN の発現の有無は予後規定因子となり得る可能性を指摘されている。しかし、食道癌に対する間質 VCAN 発現の有無による予後予測を検討した報告は未だない。

そこで当科での術前治療介入を施行していない食道癌手術症例に関して、間質 VCAN の発現が予後規定因子となり得るかを検討した。その結果、Kaplan-Meier 法、Cox 比例ハザード回帰分析による単変量および多変量解析によって、腫瘍深達度と間質 VCAN 発現の有無が、それぞれ単独で予後に影響を与える因子として規定できた。術後摘出標本における間質 VCAN 発現の有無を検討することは、術後再発の高リスク群を鑑別する上で有用と考えられ、術後補助療法施行に対する重要な示唆を与えると考えられた。

今後、他の組織型や術前治療介入後の症例に関しても検討を重ねることが必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamauchi Naoto, Kanke Yasuyuki, Saito Katsuharu, Okayama Hirokazu, Yamada Shoki, Nakajima Shotaro, Endo Eisei, Kase Koji, Yamada Leo, Nakano Hiroshi, Matsumoto Takuro, Hanayama Hiroyuki, Watanabe Yohei, Hayase Suguru, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Mimura Kosaku, Momma Tomoyuki, Oki Shinji, Hashimoto Yuko, Kono Koji	4. 巻 21
2. 論文標題 Stromal expression of cancer-associated fibroblast-related molecules, versican and lumican, is strongly associated with worse relapse-free and overall survival times in patients with esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 ページ記載なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12706	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅家 康之, 山内 直人, 齋藤 勝治, 岡山 洋和, 山田 匠希, 中嶋 正太郎, 花山 寛之, 渡辺 洋平, 齋藤 元伸, 佐瀬 善一郎, 門馬 智之, 三村 耕作, 大木 進司, 橋本 優子, 河野 浩二
2. 発表標題 食道扁平上皮癌間質でのCAF関連分子の発現は予後に関連する
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内直人、加瀬晃志、遠藤英成、菅家康之、岡山洋和、齋藤元伸、佐瀬善一郎、門馬智之、大木進司、河野浩二
2. 発表標題 食道扁平上皮癌手術症例における間質VCAN発現の予後バイオマーカーとしての有用性の検討
3. 学会等名 第75回消化器外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内直人、菅家康之、加瀬晃志、遠藤英成、松本拓朗、花山寛之、渡辺洋平、岡山洋和、早瀬傑、齋藤元伸、佐瀬善一郎、三村耕作、大木進司、河野浩二
2. 発表標題 食道扁平上皮癌手術症例における間質でのTGF- β 関連分子の発現による予後バイオマーカーとしての有用性の検討
3. 学会等名 第29回癌病態治療研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内直人、菅家康之、加瀬晃志、仲野宏、松本拓朗、花山寛之、渡辺洋平、岡山洋和、早瀬傑、齋藤元伸、佐瀬善一郎、三村耕作、大木進司、河野浩二
2. 発表標題 食道扁平上皮癌症例におけるCAFs関連分子発現の予後バイオマーカーとしての検討
3. 学会等名 第58回癌治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内直人、菅家康之、加瀬晃志、仲野宏、遠藤英成、松本拓朗、花山寛之、渡辺洋平、岡山洋和、早瀬傑、齋藤元伸、佐瀬善一郎、三村耕作、大木進司、河野浩二
2. 発表標題 食道扁平上皮癌における間質のCAFs関連分子発現による予後予測因子としての有用性の検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅家 康之、山内 直人、齋藤 勝治、岡山 洋和、山田 匠希、中嶋 正太郎、山田 怜央、仲野 宏、松本 拓朗、花山 寛之、渡辺 洋平、早瀬 傑、齋藤 元伸、佐瀬 善一郎、三村 耕作、門馬 智之、大木 進司、橋本 優子、河野 浩二
2. 発表標題 食道扁平上皮癌における間質のCAFs関連分子発現は予後に関連する
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会122回
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------