

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 28 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791946

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるケモカインレセプターと癌幹細胞マーカー

研究課題名(英文) Chemokine receptor and cancer stem cell markers in head and neck carcinoma

研究代表者

宇和 伸浩 (uwa, nobuhiro)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：90412048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：最終的に上咽頭癌とCD44の発現に検討対象を絞り、上咽頭癌に対する放射線化学療法施行例でどのCD44variant isoformが 予後規定因子となるか 上咽頭癌の治療において重要なポイントとなる原発巣の放射線化学療法への抵抗性に関与する因子となるかを検討した。患者背景なども含めた多変量解析を行った結果、CD44v3の高発現が疾患特異的生存率の低下に有意に関与すること、CD44v6の高発現が原発巣の治療抵抗性に関与することを見出した。これらの結果を元に更に検討を加えると上咽頭癌治療において個別の治療強度設定が可能になったり、分子レベルをターゲットにした治療に発展する可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：The oncogenic mechanism of CD44 and the clinical/prognostic significance of CD44 expression in nasopharyngeal carcinoma (NPC) still remain to be clarified. This study aimed to demonstrate the significance of CD44 expression as a prognostic factor in NPC. A total of 42 patients were examined who received concurrent chemo-radiotherapy as the initial treatment. We evaluated the expressions of CD44 variant isoforms CD44v3, CD44v4, CD44v5, CD44v6, and CD44v7 in NPC patients, followed by their association with CCRT failure and the disease specific survival. The disease-specific survival rate was significantly poorer in patients with a high expression of CD44v3. The patients with a high expression of CD44v6 particularly showed a clinically incomplete response to CCRT at the primary site. A thorough analysis of CD44v3 and CD44v6 expression in NPC may be markedly beneficial for the determination of effective treatment strategies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：上咽頭癌 CD44 予後因子 放射線化学療法

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌全体の5年生存率は低く、いまだに約50%である。又、解剖学的な特徴により、治療後の患者の生活の質の低下をもたらすことが多い。治療に抵抗性を示す腫瘍も多く、治療法の選択に難渋することも事実である。癌細胞にケモカインレセプターが発現し、転移先にケモカインが発現することで癌の転移が成立することが考えられる。また、近年、乳癌の研究によって癌細胞の供給源である癌幹細胞の概念が提唱され、種々の癌において癌幹細胞を中心とした発癌や治療抵抗性について論じられており急速に関心を集めている領域である。頭頸部癌におけるケモカインレセプターの発現と癌の転移能との関連性や、癌幹細胞を中心とした発癌の機序や治療抵抗性、転移能との関連性に関する研究はまだ十分に進められていない。

2. 研究の目的

どのケモカインレセプターや癌幹細胞マーカーの発現が頭頸部癌の予後因子となるか、また、放射線、化学療法の治療効果との関連があるか、腫瘍の転移能と関連があるかを明らかにして、今後の頭頸部癌治療の発展に貢献することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌症例から採取した生検標本や手術標本のパラフィン切片を用いて当院の分子病理学教室の協力を得て免疫染色を行った。ケモカインレセプターのマーカーとして抗CXCR3抗体、抗CXCR4抗体、癌幹細胞のマーカーとして抗CD44抗体、抗BMI-1抗体、抗NANOG抗体、などの抗体を用いた。免疫染色の結果によりケモカインレセプター、癌幹細胞マーカーの発現を評価し、発現の程度により分類し臨床病期、病理学的病期、予後との比較、治療抵抗性などとの関連を比較検討した。

(2) まず平成23年度はこれまでに当院で診断、治療を行った頭頸部癌症例のうちどのような疾患を中心に研究を推進するかを検討した。その結果、上咽頭癌、早期舌癌、下咽頭癌を中心に検討を行うこととした。各疾患毎にまずはランダムに症例を15~20例抽出し各々の癌幹細胞マーカーと、ケモカインレセプターの発現をみた。その結果、特に上咽頭癌でCD44(この時点ではまず抗panCD44抗体を使用して評価を行った)、CXCR3の発現が症例ごとに異なり、腫瘍の転移能、治療抵抗性、予後と関連する可能性があることが指摘された。

(3) 次いで平成24年度には上咽頭癌を対象を絞り、更にCD44 standard formやCD44 variant isoform全てを認識する抗panCD44抗体ではなく、更に詳細に検討を行うためCD44 variant isoformの各々の抗体を用いて

CD44variant isoformの発現が上咽頭癌の予後や治療成績に関連しているか免疫染色を行い検討した。

(4) 更に平成25年度にはCD44 variant isoformの発現と上咽頭癌の臨床データの比較についての統計学的な検討を重ねた。

4. 研究成果

(1) 上咽頭癌に対して当科で初回根治治療として放射線化学療法を行った42例(男性35例、女性7例、年齢中央値59歳、観察期間中央値55.5か月、放射線治療の線量60~66Gy、カルボプラチン併用)を対象とした。臨床的T分類はT1:24例、T2:7例、T3:3例、T4:8例、臨床的N分類はN0:14例、N1:18例、N2:4例、N3:6例であった。初回治療時に遠隔転移を認めた症例はなかった。

(2) 42例中33例では初回放射線化学療法で腫瘍の残存は認めなかった。しかし初回治療後6例で原発巣残存、3例で頸部リンパ節転移の残存を認めた。また7例で経過中の原発巣再発、5例で経過中の頸部リンパ節再発を認めた。経過中遠隔転移を認めたものは4例(9.5%)のみであった。原発巣残存、再発を認めた13例で救済治療ができたのは6例(46.2%)であった。一方で頸部リンパ節転移の残存、再発を認めた8例では7例(87.5%)が頸部郭清術により救済できていた。

(3) これらの症例の初回治療前の生検標本を用いて抗CD44v3抗体、抗CD44v4抗体、抗CD44v5抗体、抗CD44v6抗体、抗CD44v7抗体を用いた免疫染色を行い、各々の抗CD44 variant isoform抗体について、癌細胞のうち50%以上が陽性であるものを高発現群、50%未満が陽性であるものを低発現群として2群に分けて臨床データとの比較を行った。例として図1にCD44v3における低発現例と高発現例を示す。

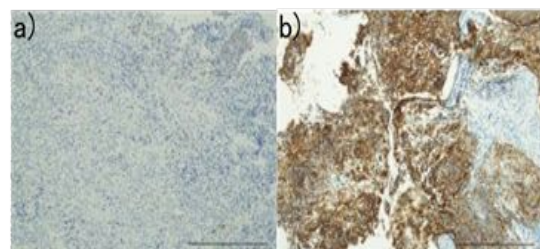


図1 a)CD44v3 低発現例、b)CD44v3 高発現例

(4) 放射線化学療法への原発巣の治療抵抗性(治療後原発巣の残存、再発)を年齢(60歳未満、60歳以上)、性別(男、女)、臨床T分類(T1+T2、T3+T4)、臨床N分類(N0、N1-3)、臨床病期分類(+、+), CD44v3(高発現、低発現)、CD44v4(高発現、低発現)、CD44v5(高発現、低発現)、CD44v6(高発現、低発現)、CD44v7(高発現、低発現)の発現の

項目に分けて表 1 のように検討した結果、Log-rank test による単変量解析では CD44v3 と CD44v6、CD44v7 の高発現が原発巣の放射線化学療法への治療抵抗性の関連因子として挙げられたが、単変量解析で P 値が 0.1 未満の項目を対象に多変量解析を行った結果、CD44v6 の高発現のみが原発巣の放射線化学療法への治療抵抗性に関与する因子となった。(P=0.0004)

		症例数	単変量解析 P値	多変量解析 P値
年齢	<60	21		
	≥60	21	0.0820	
性別	男性	35		
	女性	7	0.6132	
臨床T分類	T1-2	31		
	T3-4	11	0.2225	
臨床N分類	N0	14		
	N1-3	28	0.1634	
臨床病期分類	I-II	24		
	III-IV	18	0.8459	
CD44v3発現	高	10		
	低	32	<0.0001	
CD44v4発現	高	7		
	低	35	0.5128	
CD44v5発現	高	14		
	低	28	0.0946	
CD44v6発現	高	11		
	低	31	<0.0001	0.0004
CD44v7発現	高	8		
	低	34	0.0315	

表 1 単変量及び多変量解析による原発巣の放射線化学療法抵抗性の関連因子の分析

(5) 各々の CD44variant isoform 毎の 5 年疾患特異的生存率は CD44v3 高発現群:40.0%、CD44v3 低発現群:89.9%、CD44v4 高発現群:57.1%、CD44v4 低発現群:81.4%、CD44v5 高発現群:71.4%、CD44v5 低発現群:80.0%、CD44v6 高発現群:54.6%、CD44v6 低発現群:85.6%、CD44v7 高発現群:62.5%、CD44v7 低発現群:81.0%であった。CD44variant isoform の発現と疾患特異的生存率についてまず Log-rank test による単変量解析を行ったところ、CD44v3 と CD44v6 の高発現群が低発現群に比較して有意に疾患特異的生存率の低下が見られた。これらの結果に加えて、年齢 (60 歳未満、60 歳以上)、性別 (男、女)、臨床 T 分類 (T1+T2、T3+T4)、臨床 N 分類 (N0、N1-3)、臨床病期分類 (+ 、 +)、CD44v3 (高発現、低発現)、CD44v4 (高発現、低発現)、CD44v5 (高発現、低発現)、CD44v6 (高発現、低発現)、CD44v7 (高発現、低発現)の発現の項目を検討に加えて、単変量解析で P 値が 0.1 未満の項目を対象に多変量解析を行った結果、CD44v3 の高発現のみが上咽頭癌の予後不良因子となった。(P = 0.0021)(表 2)

		症例数	単変量解析 P値	多変量解析 P値
年齢	<60	21		
	≥60	21	0.0095	
性別	男性	35		
	女性	7	0.2793	
臨床T分類	T1-2	31		
	T3-4	11	0.7386	
臨床N分類	N0	14		
	N1-3	28	0.6623	
臨床病期分類	I-II	24		
	III-IV	18	0.7698	
CD44v3発現	高	10		
	低	32	0.0006	0.0021
CD44v4発現	高	7		
	低	35	0.4372	
CD44v5発現	高	14		
	低	28	0.6449	
CD44v6発現	高	11		
	低	31	0.0026	
CD44v7発現	高	8		
	低	34	0.1836	

表 2 単変量及び多変量解析による疾患特異的生存率との関連因子の分析

(6) 以上より、上咽頭癌の CD44v3 の高発現群は予後不良因子となり、CD44 v6 の高発現群は原発巣の放射線化学療法抵抗性に関与する因子となると考えられた。上咽頭癌症例において CD44v3、CD44v6 の発現を治療前に分析することは治療戦略を立てる上で有益であると推測される。現時点で得られている結果は以上である。

(7) 上咽癌は放射線化学療法に対する感受性が高い悪性腫瘍ではあるものの、原発巣が残存した場合には解剖学的理由から救済治療が困難である。又、上咽頭癌の放射線治療後の唾液腺障害による生涯に渡る口腔乾燥や、味覚障害、骨壊死などは患者の生活の質を大きく低下させるものである。上咽頭癌の予後予測因子、原発巣の放射線化学療法に対する治療抵抗性を治療前から推測することができれば個々の腫瘍に対する治療強度の決定が可能となる可能性もあり、治療効果、副作用、後遺障害の観点からも臨床的に有意義であると考えられる。また、上咽頭癌における CD44variant isoform の役割を明らかにすることは今後、分子レベルをターゲットにした治療の開発につながる可能性もあると考えられる。

(8) これらの結果に対して最終的な確認を行った上で今後、英文誌への論文投稿を予定している。

(9) ケモカインレセプターに関しては同じく上咽頭癌に対する放射線化学療法施行例 35 例について検討を行い、5 年疾患特異的生存率が CXCR3 高発現例では 52.0%、低発現例では 86.9%と Log-rank test で有意差を認めた (P<0.01)が、ケモカインレセプターの特徴である転移能との関連は見いだせなかった。

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)

[学会発表](計3件)

Sagawa, K., Uwa, N., Terada, T., Kida, K. and Sakagami, M. CD44 expression in biopsy specimens of patients with nasopharyngeal carcinoma is associated with prognosis. 117th American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Annual Meeting. 2013年9月29日~10月2日、Vancouver、Canada

佐川公介、宇和伸浩、寺田友紀、貴田紘太、阪上雅史、当科における上咽頭癌の治療成績および免疫染色を用いた予後因子の検討、第23回日本頭頸部外科学会、2013年1月24日~25日、鹿児島

佐川公介、宇和伸浩、寺田友紀、阪上雅史、当科における上咽頭癌症例の検討、第36回日本頭頸部癌学会、2012年6月7日~8日、島根

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇和 伸浩 (UWA, Nobuhiro)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：90412048

(2)研究協力者

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

佐川 公介 (SAGAWA, Kousuke)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：40441307

寺田 友紀 (TERADA, Tomonori)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00340977