

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390387

研究課題名(和文)腫瘍体積と導入化学療法に基づく下咽頭癌の個別化治療 - その予後因子の網羅的検索 -

研究課題名(英文) Individualized treatment for hypopharyngeal cancer according to metabolic tumor volume and induction chemotherapy

研究代表者

猪原 秀典 (INOHARA, Hidenori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00273657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：局所進行喉頭・下咽頭癌に対し喉頭温存を目指し化学放射線療法を施行した場合、原発巣の metabolic tumor volume が喉頭温存生存率・粗生存率と相関する独立した予後因子であり、その有用性はT分類よりも優れることを明らかにした。下咽頭癌手術摘出検体(F0)とその免疫不全マウス皮下移植腫瘍(F1)を用い、F0/F1間で発現量が変化する分子をプロテオーム解析し、glucose transporter 1 (GLUT1)を同定した。更に、GLUT1が放射線抵抗性に関与していることを明らかにした。これらの知見は、糖代謝を標的とすれば局所喉頭・下咽頭癌の治療成績の向上が図れることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have established that metabolic tumor volume of primary tumor is an independent prognostic factor of laryngectomy-free survival and overall survival in patients with locally advanced laryngeal or hypopharyngeal cancer who are treated with chemoradiotherapy in the setting of larynx preservation. On the other hand, we subcutaneously transplanted surgically excised specimens of hypopharyngeal cancer (F0) into immunodeficient mice, and allowed them to grow to mass (F1). We comprehensively analyzed proteins overexpressed in F1 compared with F0, and identified glucose transporter 1 (GLUT1). A series of in vitro experiments revealed that GLUT1 conferred radioresistance on cells. These results indicate that therapy targeting glucose metabolism will serve to improve clinical outcome of locally advanced laryngeal or hypopharyngeal cancer with radioresistance.

研究分野：医歯薬学

キーワード：下咽頭癌 喉頭癌 喉頭温存 化学放射線療法 metabolic tumor volume GLUT1

1. 研究開始当初の背景

局所進行下咽頭癌の従来の標準的治療は喉頭全摘を含む根治手術+術後照射であったが、現在では喉頭温存を目指して化学放射線同時併用療法が汎用されている。しかし、腫瘍が遺残・再発することも少なくない。そこで、腫瘍の遺残・再発のリスクが低い患者には化学放射線同時併用療法を行い、一方、そのリスクが高い患者には手術+術後照射を行うという個別化治療の実践が求められている。FDG PET/CT で観察される FDG の取込みが活発な部分の腫瘍体積が metabolic tumor volume (MTV) と定義されるが、我々はこれまでに下咽頭癌の原発巣 MTV が化学放射線同時併用療法の有用な予後因子であることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では切除可能な下咽頭進行癌を対象に、原発巣 MTV と導入化学療法に基づいて化学放射線同時併用療法と手術+術後照射に振り分ける個別化治療を行う。そして、網羅的タンパク質発現解析により予後因子の候補となるタンパク質を同定し、そのタンパク質が予後因子となることを確認する。低 MTV 症例に対しては、化学放射線同時併用療法を行い、CR 例と non-CR 例との間で比較を行う。高 MTV 症例に対しては、導入化学療法を行い responder に対しては化学放射線同時併用療法を行い、non-responder に対しては根治手術+術後照射を行う。化学放射線同時併用療法の CR 例と non-CR 例との間、そして化学放射線同時併用療法の CR 例と手術例との間でそれぞれ比較を行う。

3. 研究の方法

(1) 内視鏡下に採取する生検標本では網羅的タンパク質発現解析が困難であったことから、方針を変更した。手術摘出した下咽頭癌原発巣 (F0) を免疫不全マウスに移植し xenograft (F1) を作成し、F0 と F1 間で発現が異なる遺伝子・タンパクを iTRAQ 法により網羅的に解析することとした。これは F1 が成立するためには低酸素などの過酷な環境下での生着・増殖が必要であることから、F0-F1 間で発現が変化する因子は抗癌剤や放射線の治療抵抗性に関与している、即ち予後不良因子であるという仮説に基づくものである。実際、F0-F1 間では遺伝子発現パターンが大きく変化するが、F1-F2 間では遺伝子発現パターンの変動は認められない。F0-F1 の 4 ペアにおける解析を行い治療抵抗性因子を同定した。更に in vitro 実験系で、その治療抵抗性因子のノックダウン実験を行った。

(2) 当初計画した原発巣 MTV に基づく個別化治療の臨床試験を行うためには、更なるエビデンスの構築が必要と考えられた。そこで

先ず、頭頸部癌(上咽頭、中咽頭、下咽頭、喉頭)のどの部位に原発巣がある場合、化学放射線同時併用療法後の一次治療効果が MTV により予測可能であるか多変量解析により検討したところ、下咽頭癌および喉頭癌において MTV が極めて有用な独立した予測因子であることが判明した。そこで、局所進行喉頭・下咽頭癌では化学放射線療法が喉頭温存を目指して行われることから、対象を喉頭・下咽頭癌に拡張、原発巣 MTV が喉頭温存生存率、粗生存率における独立した予後因子となるか検討した。特に、近年では T4 症例は喉頭温存を目指す化学放射線療法の対象とするべきではないとの提言がなされている一方で、T4 の判定には甲状軟骨への浸潤の有無などが基準になるものの、軟骨浸潤の評価は正確性に乏しいこと、また inter-observer variation が強いことから、多変量解析では原発巣 MTV モデルと T 分類モデルの両者を構築し、どちらがより優れたモデルであるかを検討した。また、喉頭全摘を含む up-front surgery を行った局所進行喉頭・下咽頭癌において、原発巣 MTV が粗生存率と相関するか否かを検討を行った。

4. 研究成果

(1) 治療抵抗性因子の網羅的解析

iTRAQ 法によるプロテオーム解析により F0 と比べ F1 で発現が増大する分子群を同定した。その中で我々は、上述の如く糖代謝が予後と強く相関することから、glucose transporter 1 (GLUT1) に着目した。そして、頭頸部扁平上皮癌培養細胞株を用いた実験から以下の知見を得た。

siRNA で GLUT1 をノックダウンすると、グルコースの取込みが低下し増殖能も低下する。

GLUT1 阻害剤である phloretin でも同様の結果が得られる。

低酸素下では GLUT1 の発現が増強し、グルコースの取込みも増殖能も増大する。

放射線照射により増殖能が低下するが、phloretin 添加でより強い低下を認める。そして、この現象は正常酸素分圧下よりも低酸素分圧下でより顕著に認める。また、一連の増殖能の低下はアポトーシスを伴う。

これらの知見は、特に低酸素ストレス環境下でグルコースの取込みを抑制すると放射線の効果が増強することを示している。即ち、糖代謝を標的とした治療は放射線抵抗性の癌細胞を制御し得ることを示唆している。

しかし、GLUT1 は脳組織などで強く発現しており、その標的治療は重篤な合併症を惹起することが危惧される。そこで我々は、解糖系におけるグルコースの最終代謝産物である乳酸を細胞外に排出する

monocarboxylate transporter 4 (MCT4)に着目した。通常の好気性条件下の正常組織ではピルビン酸は乳酸ではなくアセチル CoA となり TCA サイクルに入るため、MCT4 の機能を抑制しても重篤な障害は生じないと考えたからである。一方、癌組織では好気性・嫌気性条件下にかかわらず解糖系が亢進している (Warburg 効果) ため、MCT4 の機能を抑制すると解糖系の亢進が障害され致死すると考えた。そこで我々は、頭頸部扁平上皮癌培養細胞株を用いて予備実験を行い、MCT4 に関し以下の知見を得た。

低酸素下では正常酸素下と比べ MCT4 の発現が増大する。

siRNA を用い MCT4 の発現をノックダウンすると、乳酸の細胞外への排出が低下する。

siRNA を用い MCT4 の発現をノックダウンすると、正常酸素下では有意な増殖能の低下を認めないが、低酸素下では著しい低下を認める。そして、この現象は放射線照射を併用するとより顕著に認められる。また、この増殖能の低下はアポトーシスを伴う。

これら一連の知見は、糖代謝の亢進が頭頸部扁平上皮癌の放射線抵抗性と相関しており、MCT4 を標的とした治療を併用することにより放射線の治療効果を劇的に向上し得ることを示唆するものであるが、MCT4 に関しては未だ予備実験の結果であり、off-target 効果ではなく on-target 効果であることの確認もこれからであることから、あくまで暫定的な結果である。

(2) 原発巣 MTV モデルと T 分類モデル

手術を選択した場合には喉頭全摘の適応となる化学放射線同時併用療法を行った喉頭・下咽頭癌 94 例について解析を行った。

まず MTV を規定するための SUV 閾値については標準的な値が確立されていないため、2.5 から 5.0 まで 0.5 間隔で ROC 解析を行い検討したところ、有意差は得られなかったものの 2.5 で最も高い AUC が得られたことから、SUV 閾値を 2.5 と決定した。また、原発巣 MTV を高低に二分する cut-off 値は 24.7 ml となった。

次いで、Cox 比例ハザードモデルによる解析を行った。多変量解析では N 分類 (N0 vs. N1-3) と部位 (喉頭 vs. 下咽頭) を調整した原発巣 MTV モデルと T 分類モデルの 2 種類を構築した。

喉頭温生存率については、原発巣 MTV モデルでは低 MTV を対照とすると、高 MTV におけるハザード比は 3.2 (95%信頼区間 1.6~6.6) P 値 0.002 であった。一方、T 分類モデルでは T2-3 を対照とすると、T4 におけるハザード比は 2.5 (95%信頼区間 1.2~4.9) P 値 0.01 であった。統計学的にも原発巣 MTV モデルの方が優れたモデルであ

った。また、3 年喉頭温生存率は低 MTV で 68%、高 MTV で 18%であるのに対し (P 値 0.0001 未満、図 1)、T2-3 で 60%、T4 で 28% (P 値 0.002、図 2) であった。

粗生存率については、原発巣 MTV モデルでは低 MTV を対照とすると、高 MTV におけるハザード比は 2.3 (95%信頼区間 1.0~5.0) P 値 0.04 であった。一方、T 分類モデルでは T2-3 を対照とすると、T4 におけるハザード比は 1.6 (95%信頼区間 0.6~3.7) P 値 0.28 であり、T4 は統計学的に有意な独立した予後不良因子ではなかった。統計学的にも原発巣 MTV モデルの方が優れたモデルであった。また、3 年喉頭温生存率は低 MTV で 75%、高 MTV で 40%であるのに対し (P 値 0.003) T2-3 で 70%、T4 で 55% (P 値 0.20) であった。

喉頭全摘を含む up-front surgery を行った局所進行喉頭・下咽頭癌における原発巣 MTV と粗生存率の相関については、中間解析を終了したところであり最終的な結果は未だであるが、原発巣 MTV は予後因子とはならなかった。

以上の結果から、今後は原発巣 MTV をバイオマーカーとした臨床試験を行うべきことが示唆された。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Hidenori Inohara. Volumetric PET/CT parameters predict local response of laryngohypopharyngeal cancer to chemoradiotherapy. IFHNOS 5th World Congress. Seoul, Korea. 2014.7.28.

Hidenori Inohara. Clinical significance of metabolic tumor volume in the treatment of locally advanced laryngohypopharyngeal cancer. 13th Asia-Oceania ORL-HNS Congress. Taipei, Taiwan. 2015.3.20. (招待講演) 花本 敦、猪原秀典. グルコース取り込み抑制と放射線照射による頭頸部癌への相乗効果. 第 38 回日本頭頸部癌学会、東京. 2014.6.13.

猪原秀典. 臨床セミナー 6: PET-CT で何が分かる. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会、東京. 2015.5.22

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪原秀典 (INOHARA, Hidenori)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00273657

(2) 研究分担者

藤堂 剛 (TODO, Tsuyoshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90163948

(3) 研究協力者

花本 敦 (HANAMOTO, Atsushi)

(4) 研究協力者

福角隆仁 (FUKUSUMI, Takahito)

図 1

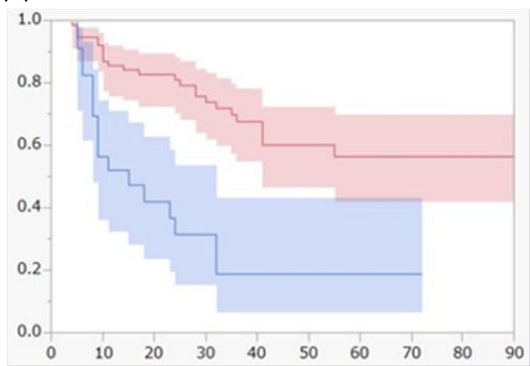


図 2

