

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460455

研究課題名(和文) SLCトランスポーター発現による胃癌化学療法の効果予測

研究課題名(英文) SLC transporter expression for predicting chemotherapeutic effectiveness in gastric cancer

研究代表者

鴨志田 伸吾 (KAMOSHIDA, SHINGO)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：70351020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：S-1/シスプラチンによる術前化学療法を施行した進行胃癌を対象として、OCT2の発現レベルと化学療法の効果との関連を解析した。OCT2高発現は非反応群よりも反応群に有意に多く、唯一の独立した効果予測因子であった。OCT2の発現レベルによって、胃癌におけるS-1/シスプラチン術前化学療法の効果を予測できる可能性が示唆された。

AFP産生胃癌と通常型胃癌におけるSLCトランスポーター発現レベルの違いを解析した。AFP産生胃癌におけるENT1、OAT2高発現症例は通常型胃癌よりも有意に多かった。AFP産生胃癌に対しては、ゲムシタピンと5-FU系抗癌剤による併用療法が効果的である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：First, we evaluated OCT2 expression in advanced gastric cancers (GCs) treated with neoadjuvant chemotherapy (NAC) with S-1/cisplatin. Expression levels of OCT2 were immunohistochemically assessed and correlated with pathologic response. The rate of high expression levels of OCT2 (OCT2High) was significantly higher in responders compared with non-responders. In addition, OCT2High was the sole independent predictor of response. These results suggest that OCT2High may represent a potential predictor of response to NAC with S-1/cisplatin in GC. Next, we evaluated expression levels of a panel of SLC transporters in α -fetoprotein (AFP)-producing GCs and conventional GCs. The rates of high expression levels of ENT1 (ENT1High) and OAT2 (OAT2High) were statistically higher in AFP-producing GCs compared with conventional GCs. These results suggest that patients with AFP-producing GC could potentially benefit from gemcitabine/fluoropyrimidine combination chemotherapy.

研究分野：腫瘍病理学、免疫組織化学、臨床細胞学

キーワード：胃癌 化学療法 効果予測 SLCトランスポーター 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

HER2 過剰発現が確認された切除不能進行・再発胃癌に対する分子標的薬トラスツズマブの適応が承認されたため、化学療法前に HER2 検査を実施し、陽性・陰性を分けて治療方針が決定されるようになった。HER2 陽性例に対してはカペシタピン+シスプラチン+トラスツズマブ、HER2 陰性例に対しては S-1 (5-FU 系抗癌剤)+シスプラチンが標準治療として推奨されている。しかし、S-1 やシスプラチンの投与を直接的に判定する基準はないため、HER2 陰性胃癌の中には S-1+シスプラチン療法に抵抗性の症例が必ず存在する。逆に、これらの症例の中には、他の抗癌剤に感受性を示す症例が含まれる可能性がある。胃癌化学療法の個別化を進展させるためには、トラスツズマブ以外の抗癌剤を選択投与するための適応判定法を確立し、抗癌剤をどう組み合わせるべきかを考えることが極めて重要である。

抗癌剤が効果を発揮するためには、癌細胞内に十分量が到達しなければならない。薬剤を細胞の内外へ輸送するトランスポーターは、排出型 ATP binding cassette (ABC) トランスポーターと取込型 solute carrier (SLC) トランスポーターに分類される。ABC トランスポーター (MDR1、MRP や BCRP) の発現と抗癌剤抵抗性との関連について検討した論文は莫大な数に達している。しかし、ABC トランスポーターは多種の抗癌剤を同時に排出するため、個別化治療のためのバイオマーカーとしては理想的ではない。一方、SLC トランスポーターの中には比較的限定された抗癌剤を取り込む (抗癌剤の種類に特異性が比較的高い) ものが少なくない。

しかしながら、ヒト癌組織における SLC トランスポーター発現を免疫組織化学染色により評価した報告は非常に少なく、ましてや臨床材料を対象として化学療法の効果との関連性について解析した報告は希少である。我々の研究室では、最近、大腸癌および乳癌のホルマリン固定パラフィン切片を対象として、SLC トランスポーターの発現が化学療法の効果に対する独立した予測因子であることを報告した。これらの研究結果から、SLC トランスポーターが化学療法感受性予測因子の有力候補であると期待される。

2. 研究の目的

申請時における当初の研究目的は以下の内容であった。S-1+シスプラチンによる術前化学療法を施行された胃癌の化学療法前生検材料と化学療法後手術材料を対象に、SLC トランスポーターの免疫組織化学染色を実施し、組織型分類、臨床病理学的所見、化学療法の組織学的効果、術後予後 (無再発期間および全生存期間) との関連性を解析する。5-FU、シスプラチンそれぞれを基質とする

SLC トランスポーターの発現と化学療法の効果が相関するかを確認するだけでなく、化学療法に抵抗性を示した症例におけるトランスポーター群の発現パターンにも注目する。次いで、HER2 陰性の切除不能進行・再発症例について、SLC トランスポーターの発現と臨床病理学的所見、無増悪期間および全生存期間との関連性を明らかにする。最後に、術後補助化学療法施行症例を対象として、SLC トランスポーターの発現と臨床病理学的所見、無再発期間および全生存期間との関連性を解析する。

しかしながら、術前化学療法施行胃癌の検討後、病理組織切片作製や臨床データ整理に中心的役割を果たしていた研究協力者が所属施設を異動することになったため、当初計画していた切除不能進行・再発症例及び術後補助化学療法施行症例を対象とした研究を実施することが難しくなった。そこで、新たな研究協力者とともに、特殊型胃癌における SLC トランスポーター発現様式の特徴を明らかにする研究を実施した。以下、術前化学療法施行胃癌を対象とした研究、特殊型胃癌を対象とした研究に分けて記載する。

(1) SLC トランスポーターによる胃癌術前化学療法の反応性予測

本邦における胃癌術前化学療法は臨床試験でのみ認可されているが、S-1+シスプラチン療法及びパクリタキセル+シスプラチン療法の有効性が報告されている。しかし、術前化学療法に反応しない患者では手術開始が遅れる危険性があるため、適切な治療戦略を選択するための効果予測因子が必須である。ところが、われわれが知る限りでは S-1+シスプラチン療法、パクリタキセル+シスプラチン療法の効果を予測する因子に関する研究はごく少数ないし皆無である。

Organic cation transporter 2 (OCT2) はシスプラチンおよびオキサリプラチンの取込みと殺細胞効果を決定する重要因子である。我々の研究グループは、最近、5-FU/ロイコポリン/オキサリプラチン (FOLFOX) を基礎とするファーストライン治療を受けた転移性大腸癌患者を対象とした研究で、OCT2 高発現が無増悪期間延長と有意に相関することを報告した。しかし、胃癌における OCT2 の臨床病理学的意義は未だ解明されていない。そこで本研究では、S-1+シスプラチンないしパクリタキセル+シスプラチンによる胃癌術前化学療法に対する反応性予測における OCT2 発現の意義について、免疫組織化学的に評価した。

(2) AFP 産生胃癌における SLC トランスポーターの発現様式

-フェトプロテイン (AFP) 産生胃癌は高頻度に肝転移を伴い、予後不良な高悪性度腫瘍である。また、AFP 産生胃癌は標準化学療法 (5-FU 系抗癌剤+シスプラチン) に奏効し

ないことが多い。したがって、AFP 産生胃癌には独自の化学療法レジメンが必要と考えられる。そこで本研究では、AFP 産生胃癌に対するより効果的な化学療法レジメンを探索することを目的として、AFP 産生胃癌における代表的 SLC トランスポーター群の発現レベルを通常型胃癌と比較解析した。検索した SLC トランスポーター群は equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1; 取込基質はゲムシタピンなど)、organic anion transporter 2 (OAT2; 取込基質は 5-FU など)、OCT2 (既述)、organic cation transporter 6 (OCT6; 取込基質はドキシソルピシン) および organic anion-transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3; 取込基質はパクリタキセル) の 5 種である。

3. 研究の方法

研究を実施するに先立って、入手したすべての抗 SLC トランスポーター抗体について、至適染色条件を設定した。そして、検討したすべての SLC トランスポーターが細胞膜 (抗体によっては細胞質も) に局在することを確認した。

(1) SLC トランスポーターによる胃癌術前化学療法の反応性予測

シスプラチンをベースとした術前化学療法 (S-1 + シスプラチンまたはパクリタキセル + シスプラチン) を受けた進行胃癌患者 56 例を対象とした。化学療法前生検材料と化学療法後手術切除材料を 10%ホルマリンで固定、パラフィン包埋後、3 μ m 厚の切片を作製した。病理組織学的所見と術前化学療法の効果を評価するため、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。術前化学療法の効果については、胃癌取扱い規約の組織学的効果判定基準に従い、grade 0 (無効)、grade 1 (1a および 1b; 軽度の効果)、grade 2 (かなりの効果) および grade 3 (完全奏効) に分類した。そして、grade 2 ないし 3 を示した症例を反応群、grade 0 ないし 1 の症例を非反応群とした。

免疫組織化学染色における抗原性賦活化は、1 mM EDTA 液 (pH 8.0) 中での圧力鍋処理 (10 分間) により行った。一次抗体として抗 OCT2 ウサギポリクローナル抗体を室温で一晩反応させた後、検出試薬としてヒストファイン・シンプルステイン MAX-PO を室温で 1 時間反応させた。その後、ジアミノベンチジン (DAB) 溶液で発色し、マイヤーのヘマトキシリン液で軽く核染色した。適切な陽性コントロールおよび陰性コントロールを同時に染色した。

細胞膜における染色強度と陽性細胞率をそれぞれ 0-3 にスコア化し、両スコアの和から総スコア (0-6) を算出した。そして、receiver operating characteristic (ROC) 曲線解析法を用いてカットオフ値を決定し、

総スコア 0-3 を OCT2 低発現、4-6 を OCT2 高発現とした。

(2) AFP 産生胃癌における SLC トランスポーターの発現様式

手術切除された AFP 産生胃癌 (20 例) と通常型胃癌 (130 例) の 10%ホルマリン固定パラフィン包埋組織を対象とした。治療効果に対する ENT1 発現の有意性については、抗体の違いによる影響が示唆されているため、ENT1 に限っては 2 種の抗体 (F-12 および SP120) を用意した。抗原性賦活化は、最適な加熱溶液中での圧力鍋処理 (10 分間) により行った。加熱溶液として、ENT1 (F-12) については 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0)、OCT6 および OATP1B3 については 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0)、ENT1 (SP120) および OCT2 については 1 mM EDTA 液 (pH 8.0)、OAT2 については 1 mM EDTA 含有 10 mM トリス塩基 (pH 9.0) を用いた。非特異反応ブロッキングの操作後、一次抗体 (ENT1 [F-12]) はマウスモノクローナル抗体、ENT1 [SP120] はウサギモノクローナル抗体、それ以外はウサギポリクローナル抗体) を室温で一晩反応させた。その後、OAT2 についてはノボリンクポリマー検出システムで、それ以外はヒストファイン・シンプルステイン MAX-PO で一次抗体を検出した。そして、DAB 溶液で発色し、マイヤーのヘマトキシリン液で軽く核染色した。

腫瘍細胞が細胞膜染色を示した場合を陽性とみなした。染色強度と陽性細胞率をそれぞれ 0-3 にスコア化し、両スコアの和から総スコア (0-6) を算出した。そして、ROC 曲線解析によりカットオフ値を決定し、カットオフ値未満を低発現、カットオフ値以上を高発現とした。

さらに、AFP と SLC トランスポーターとの二重免疫組織化学染色を施行し、細胞レベルの同時発現性について解析した。AFP をパーマブルーで青色に、SLC トランスポーターを DAB で茶色に発色させた。

4. 研究成果

(1) SLC トランスポーターによる胃癌術前化学療法の反応性予測

反応群に分類されたのは 31 例 (55%) で、残りの 25 例 (45%) は非反応群であった。化学療法前生検材料における OCT2 高発現は、56 例中 41 例 (73%) に認められた。全症例群を対象とした解析では、Laurén 分類の腸型 (組織分類の分化型) および OCT2 高発現が非反応群よりも反応群に多い傾向があったが、統計学的有意差は検出されなかった (それぞれ、 $P=0.09$ 、 $P=0.07$)。年齢、性別、腫瘍局在部位、HER2 発現および化学療法レジメンは治療効果と関連していなかった。

次に、S-1 + シスプラチン群 (28 例) とパクリタキセル + シスプラチン群 (28 例) に分けて解析した。S-1 + シスプラチン群では、

反応群における OCT2 高発現の頻度が非反応群に比べて有意に高かった (80%対 20%; $P=0.001$)。S-1+シスプラチン療法の反応性予測における OCT2 発現レベルの正確度は 82%であった。さらに多変量解析によって、OCT2 高発現が唯一の独立した反応性予測因子であることが証明された。反応群および非反応群の化学療法前生検材料における代表的な OCT2 免疫組織化学染色像を図 1 に供覧する。

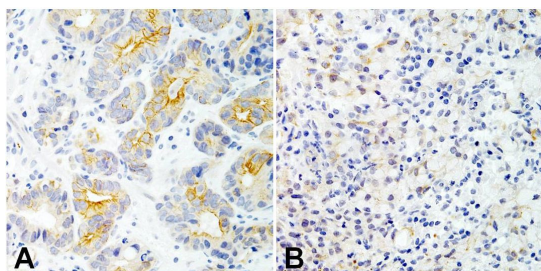


図 1. 代表的な OCT2 免疫組織化学染色像。反応群 (A) では多くの腫瘍細胞の細胞膜に強い陽性反応が確認されるのに対し、非反応群 (B) では陽性を示す腫瘍細胞がごく少数である。

これまで、胃癌に対する 5-FU 系抗癌剤の抵抗性予測因子として注目を集めてきたのが thymidylate synthase (TS; DNA 合成に必須で、5-FU の標的酵素) である。しかし、S-1+シスプラチン術前化学療法抵抗性における TS 高発現の意義については、統一した見解が得られていない。ましてや抵抗性よりも反応性を予測する因子を同定することの方が臨床的意義は高いと考えられる。そこで本研究では、シスプラチンの薬効決定因子とされている OCT2 に着目した。我々の知る限りでは、胃癌術前化学療法の反応性予測における SLC トランスポーター発現の役割を検討したのは本研究が初めてである。本研究の結果は、化学療法前生検材料における OCT2 高発現を証明することにより、S-1+シスプラチンによる胃癌術前化学療法の病理学的効果を予測できる潜在的可能性を示唆している。すなわち、OCT2 免疫組織化学染色が、S-1+シスプラチン術前化学療法に奏効する胃癌患者のスクリーニングに役立つかもしれない。しかし、本研究の結果は、大規模な予見的臨床研究によって正当化される必要がある。

一方、パクリタキセル+シスプラチン群においては化学療法の効果と関連する因子はまったく認められなかった。この結果はシスプラチンをベースとする術前化学療法の反応性予測因子は、レジメンごとに異なることを示唆している。パクリタキセルの効果がシスプラチンよりも強いために、パクリタキセルの併用によって OCT2 の予測可能性が弱められたと推測する。

本研究で得られたもう一つの所見として、OCT2 高発現は腸型 (分化型) に多く認められ

た ($P=0.03$)。胎児性幹細胞を用いた *in vitro* 研究において、分化した胎児性幹細胞における OCT2 mRNA の発現レベルが未分化細胞に比べて著明に増加していることが報告されている。しかし、胃癌細胞の分化過程における OCT2 発現のメカニズムについてはまったく解明されていない。

以上の成果は第 104 回日本病理学会総会で発表、また英文論文として Am J Cancer Res 誌に掲載された (Vol. 5, No. 7, pp. 2285-2293, 2015)。

(2) AFP 産生胃癌における SLC トランスポーターの発現様式

ENT1 (F-12)、ENT1 (SP120)、OAT2、OCT2、OCT6 および OATP1B3 の高発現は、それぞれ 84 例 (56%)、100 例 (67%)、39 例 (26%)、89 例 (59%)、55 例 (37%) および 6 例 (4%) に認められた。AFP 産生胃癌における ENT1 (F-12) および ENT1 (SP120) の高発現率は、通常型胃癌よりも有意に高かった (それぞれ 85%対 52%、 $P=0.007$; 95%対 62%、 $P=0.004$)。これらの結果から、AFP 産生胃癌に対してはゲムシタピンが有効である可能性が示唆される。同様に、OAT2 高発現率についても、AFP 産生胃癌の方が通常型胃癌よりも有意に高かった (80%対 18%、 $P=6.54E-8$)。この所見は、AFP 産生胃癌の化学療法においても 5-FU 系抗癌剤が骨格となることを示唆している。図 2 に、AFP 産生胃癌および通常型胃癌における ENT1、OAT2 の代表的免疫組織化学染色像を供覧する。

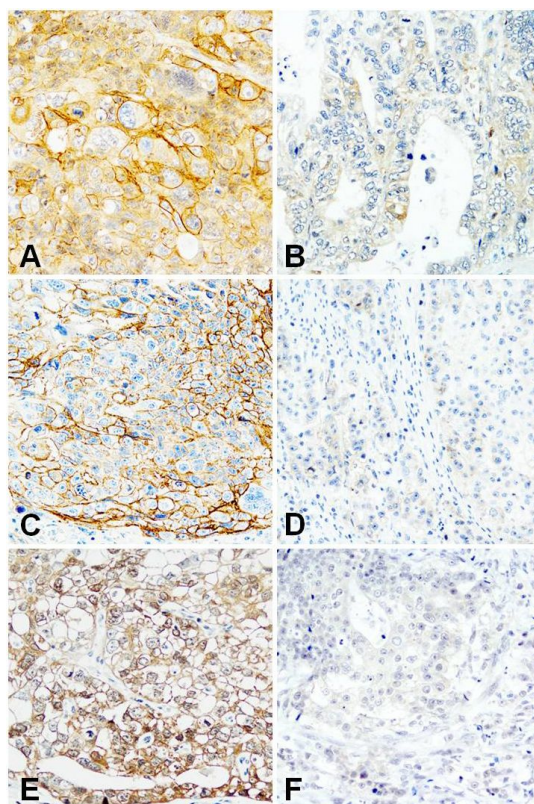


図 2. AFP 産生胃癌 (左列) および通常型胃癌 (右列) における代表的免疫組織化学染色像。A および B: ENT1 (F-12)、C および D:

ENT1 (SP120)、E および F : OAT2。AFP 産生胃癌における ENT1 と OAT2 の発現は、通常型胃癌と比較して明らかに強い。

進行胃癌に対しては、ゲムシタピン単独では有意な抗腫瘍効果を示さない。しかし、ゲムシタピンを 5-FU と組み合わせることによって、それぞれの効果を相乗的に増強させることが前臨床試験で示されている。さらに、ゲムシタピン + 5-FU 併用療法は進行胃癌患者あるいは進行大腸癌患者の腫瘍縮小効果や予後を有意に改善することが報告されている。そこで、ENT1 と OAT2 を組み合わせ解析した結果、それぞれ単独の解析結果よりも強い統計学的有意性が得られた。すなわち、AFP 産生胃癌の 65% が ENT1 (F-12) 高発現かつ OAT2 高発現を示したのに対し、通常型胃癌ではわずか 8% であった ($P=6.08E-8$)。同様に、ENT1 (SP120) 高発現かつ OAT2 高発現を示す症例は AFP 産生胃癌の 75%、通常型胃癌の 8% であった ($P=4.93E-10$)。これらの結果は、ENT1 高発現かつ OAT2 高発現が AFP 産生胃癌を最も特徴づける発現様式であること、AFP 産生胃癌に対してはゲムシタピンと 5-FU 系抗癌剤による併用療法の効果が期待できることを示唆している。今後、多くの AFP 産生胃癌症例を含めた大規模前向き研究が期待される。

本研究ではさらに、ENT1 (F-12)、ENT1 (SP120)、OAT2 および OCT6 の発現強度が、非腫瘍部上皮よりも腫瘍組織で高いことが明らかになった。正常胃組織に比べて、胃癌組織では ENT1 mRNA 発現が増強していることが過去の研究で明らかにされているが、胃癌における OAT2 および OCT6 の発現に関する報告は見当たらない。われわれの所見は、ENT1、OAT2 および OCT6 の発現増強が胃癌の発生・進展に関連している可能性を示唆しているが、それらのメカニズムや生物学的意義を解明するためには今後の追及が求められる。AFP 産生胃癌に関するこれらの成果は第 104 回日本病理学会総会で発表、また英文論文として Histopathology 誌に受理された (現在、印刷中)。

二重免疫組織化学染色によって得られた所見として、多くの症例で AFP と ENT1 の局在に異同性を認めたが、AFP と OAT2 はしばしば同時発現していた。これらの結果は、AFP 陽性細胞と陰性細胞では、SLC トランスポーターの発現パターンがしばしば異なることを示唆しており、また、より有効な治療効果を得るには複数の抗癌剤を併用すべきことを裏付けていると考えられる。この成果は第 105 回日本病理学会総会で発表した。

(3) 以上の研究成果を要約すると、化学療法前生検材料における OCT2 高発現は、S-1 + シスプラチンによる胃癌術前化学療法の潜在的効果予測因子である、ENT1 高発現かつ OAT2 高発現が AFP 産生胃癌を最も特徴づ

ける発現様式であり、そのためゲムシタピンと 5-FU 系抗癌剤による併用療法の効果が期待される。

最後に、日本学術振興会学術研究助成基金助成金のご援助に厚くお礼を申し上げます。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Ayano Naka, Risa Takeda, Michiko Shintani, Naoki Ogane, Yoichi Kameda, Toru Aoyama, Takaki Yoshikawa, Shingo Kamoshida, Organic cation transporter 2 for predicting cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy response in gastric cancer, American Journal of Cancer Research, 査読有, Vol. 5, No. 7, 2015, pp. 2285-2293

Takaaki Shimakata, Shingo Kamoshida, Jumpei Kawamura, Naoki Ogane, Yoichi Kameda, Emmy Yanagita, Tomoo Itoh, Risa Takeda, Ayano Naka, Kuniko Sakamaki, Yurie Hayashi, Sadahito Kuwao, Immunohistochemical expression profiles of solute carrier transporters in alpha-fetoprotein-producing gastric cancer, Histopathology, 査読有、印刷中

[学会発表](計3件)

島方 崇明、鴨志田 伸吾、河村 淳平、大金 直樹、亀田 陽一、柳田 絵美衣、伊藤 智雄、竹田 梨沙、中 彩乃、桑尾 定仁、 α -fetoprotein 産生胃癌における equilibrative nucleoside transporter 1 発現の特徴、第 105 回日本病理学会総会、2016.5.13、仙台国際センター(宮城県)(発表確定)

島方 崇明、鴨志田 伸吾、中 彩乃、竹田 梨沙、河村 淳平、傳田 珠美、川井 健司、桑尾 定仁、胃肝様腺癌における薬剤取込トランスポーター発現様式、第 104 回日本病理学会総会、2015.5.2、名古屋国際会議場(愛知県)

中 彩乃、竹田 梨沙、大金 直樹、亀田 陽一、青山 徹、吉川 貴己、鴨志田 伸吾、胃癌における OCT2 および OATP1B3 の発現と術前化学療法の効果、第 104 回日本病理学会総会、2015.4.30、名古屋国際会議場(愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鴨志田 伸吾 (KAMOSHIDA, Shingo)
神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：70351020

(2) 研究分担者

新谷(田中) 路子 (SHINTANI [TANAKA],

Michiko)
神戸大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号：40207147

(3) 連携研究者

吉川 貴己 (YOSHIKAWA, Takaki)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神
奈川県立がんセンター・消化器外科・医長
研究者番号：30336573

(4) 研究協力者

中 彩乃 (NAKA, Ayano)
竹田 梨沙 (TAKEDA, Risa)
大金 直樹 (OGANE, Naoki)
亀田 陽一 (KAMEDA, Yoichi)
青山 徹 (AOYAMA, Toru)
島方 崇明 (SHIMAKATA, Takaaki)
河村 淳平 (KAWAMURA, Jumpei)
傳田 珠美 (DENDA, Tamami)
川井 健司 (KAWAI, Kenji)
桑尾 定仁 (KUWAO, Sadahito)
柳田 絵美衣 (YANAGITA, Emmy)
伊藤 智雄 (ITOH, Tomoo)
坂巻 久仁子 (SAKAMAKI, Kuniko)
林 友里恵 (HAYASHI, Yurie)