

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462031

研究課題名(和文) 食道癌の治療効果予測・再発予測に関する新規N型糖鎖マーカーの開発

研究課題名(英文) The development of the new N-type sugar chain marker for the prediction of therapeutic effect and recurrence prediction in the patients with esophageal cancer

研究代表者

内門 泰斗 (Uchikado, Yasuto)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・特例准教授

研究者番号：30464465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：化学療法、化学放射線療法を行った食道患者の87例より、治療前に血漿中のN型糖鎖の発現を検索した。また、治療後には、42例について検索し、治療前後でN型糖鎖の発現パターンを解析した。その結果、再発、予後については観察期間が短く、予測不可能であったが、治療効果については、5糖鎖の発現を用いて効果予測が可能であった。Spheroid colony assayによる食道癌細胞株の癌幹細胞の培養液の糖鎖解析を行い、特徴的な発現は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We searched the expression of the N-type sugar chains in the plasma of 87 patients with esophageal cancer before chemotherapy or chemoradiotherapy. In addition, we searched for 42 cases, the analysis of the expression pattern of the N-type sugar chain before and after the treatment. As a result, the therapeutic effect was possible the prediction of effect using the expression of 5 sugar chains. However, the recurrence and prognosis was unpredictable, because of short observation. We could not prove that the characteristic expression of a sugar chain analysis by the culture of cancer stem cells of esophageal cancer cell lines in spheroid colony assay.

研究分野：医歯薬学

キーワード：N型糖鎖 食道癌 化学療法 化学放射線療法

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の中でも、食道癌はリンパ節転移と他臓器浸潤をきたしやすい悪性度の高い癌種であり、手術・化学放射線療法・化学療法による集学的治療を行うことが重要である。近年、診断・治療技術の向上により、治療成績の向上を認めるようになってきているが、高度進行・再発食道癌の予後は依然不良である。より早期の段階での治療開始が、治癒率の向上や治療低侵襲につながることは論を待たないが、治療開始後の治療効果判定や再発を予測可能とすることも重要であり、そこで、より簡便で効率のよい治療効果判定や再発予測の診断方法の開発が急務である。その方法の一つとして、腫瘍マーカーの測定があげられる。現在、食道癌の腫瘍マーカーには、SCC および CEA が使用されるが、食道癌特異的腫瘍マーカーは存在しないこと、癌の存在以外の要因で上昇し、その陽性率も 30%にとどまり、測定結果を信頼できる腫瘍マーカーは確立されていない。

2. 研究の目的

食道癌に特異度が高い血漿中の糖鎖マーカーを特定し、化学療法、化学放射線療法の治療効果判定および予後予測を可能とする糖鎖腫瘍マーカーシステムの確立を目的とする。

3. 研究の方法

目的を達成するために、以下の調査研究を行った。

(1) 食道癌患者を、化学療法・化学放射線療法の治療前後、治療後も経時的に採血を行い、血漿の糖鎖の発現パターンを解析し、再発・予後、治療効果について検索した。

対象者の血液を採取し、得られた検体は連結可能匿名化を行った後、 -80°C で凍結保存。血漿を N-グリコシダーゼ F 及びトリプシンにより処理を行い、その溶液を糖鎖補足ピーズ (BlotGlyco® for MALDI) により処理し、遊離した糖鎖の捕捉、及びラベル化を行った。ピーズに捕捉された糖鎖を精製・分離し、MALDI-TOF MS 測定し、Autoflex III smartbeam TOF/TOF (Bruker Daltonics 社製) を用い、データの収集・解析する。得られたマススペクトルから各糖鎖の定量化し、糖鎖の存在量の総シグナル量を計算して、それぞれの糖鎖の比率で補正をする。統計解析ソフト (SIMCA P+ ver.12, Umetrics 社製) を使用し、治療前から経時的にサンプルの糖鎖発現パターンの T-test を行い、有意差 ($p < 0.01$) を示す糖鎖を特定。特定された糖鎖から、治療効果の有無で共通する糖鎖発現パターンを解析し、また、再発症例の経時的変化から、再発症例に共通する糖鎖発現パターンを解析した。特定された糖鎖から、治療効果の判別が可能か 1 例ずつ検証した。

(2) 生検標本による原発巣の血中遊離癌細胞、EMT 関連蛋白の発現について検索し、切

除症例については、病理組織学的因子と微小転移と血漿中の糖鎖発現について検索した。

治療前の内視鏡検査で得られた原発巣の生検標本で、EMT 関連蛋白の発現 (Snail, Slug, Twist, TGF- β , N-cadherin) を免疫組織学的手法で解析を行った。CellSearch System® および RT-PCR を用いて血中遊離癌細胞の検出を行った。血液サンプルは、糖鎖発現用と同じ日に採取する。切除症例のリンパ節微小転移を cytokeratin (AE1/AE3) 抗体を利用した免疫組織学的手法により行った。次に EMT 関連蛋白の高発現例、また血中遊離癌細胞陽性例、微小転移陽性例における糖鎖発現パターンを解析し、陰性例と比較検討し、関連する糖鎖を検索した。

(3) 食道癌細胞株から癌幹細胞を分離、また治療抵抗株を樹立、それらの糖鎖発現を検索した。Spheroid colony assay で得られた消化器癌の細胞株からのスフェア形成能をもつ癌幹細胞を分離抽出し、その培養液の糖鎖を分離し解析した。食道癌細胞株 TE3, TE8 を用いて、血清無添加培地に Epidermal growth factor : EGF と Basic fibroblast growth factor : bFGF のみを加え、2 週間培養し、球状のコロニー形成を観察し、形成されたものを分離した。分離した細胞に CDDP、もしくは 5 FU を加え、培養し耐性株を作成した。

4. 研究成果

(1) 化学療法、化学放射線療法を行った食道癌患者の 87 例より、治療前に血漿中の N 型糖鎖の発現を検索した。また、治療後に採血可能であった 42 例について検索し、治療前後で N 型糖鎖の発現パターンを解析した。その結果、治療前の血液の血漿における糖鎖の発現において、5 糖鎖の発現を用いて治療の効果予測が可能であった。5 糖鎖の発現を認めた症例においては、完全奏功 (CR)、部分奏功 (PR)、安定 (SD) の症例が多く含まれており、進行 (PD) の症例においては、5 糖鎖の発現をほとんど認められなかった。5 糖鎖の発現パターンで治療効果予測が可能か 87 例を一例ずつ検証したところ、Sensitivity 80%、Specificity 100%、Accuracy 82% であった。再発を認めた 5 例において、再発のない症例との治療前の糖鎖の発現は、優位な差を認めなかった。治療前後での再発 5 例と無再発 37 例との糖鎖発現パターンでは、糖鎖の変化にばらつきが多く予測可能な糖鎖の発見には至らなかった。今後、症例を重ね再発症例数が増えた場合には、治療前の糖鎖発現パターンにより再発予測可能となり、糖鎖パターンによる個別化治療を目指すものである。

(2) 上記 87 例の生検標本の免疫組織染色による EMT 関連たんぱく質の発現検索を行い、Snail 発現陽性例 21 例 (24.1%)、Slug 発現陽性例 13 例 (14.9%)、Twist 発現陽性例 16 例 (18.4%)、TGF- β 発現陽性例 24 例 (27.6%)、N-cadherin 発現陽性例 21 例 (24.1%) であっ

た。また Snail 発現と Slug 発現の陽性例において、優位に PD の症例が多く治療効果が低かった。Twist, TGF- β , N-cadherin の発現と治療効果は関連を認めなかった。治療前の治療効果を認めた 5 糖鎖の発現パターンとの関連性について検索したが、関連を認めなかった。切除標本とリンパ節微小転移検索を行い、切除標本における組織学的 CR もしくは PR の症例でリンパ節微小転移を認めない症例 26 例において、5 糖鎖のすべての発現パターンを有する用例が優位に多かった。切除標本の組織学的 SD の症例やリンパ節微小転移を認めた症例 31 例においては、5 糖鎖の発現を認めなかった。治療前 5 糖鎖すべて発現を認めた症例において治療効果が高い結果であった。

(3) Spheroid colony assay による食道癌細胞株 TE3, TE8 の癌幹細胞を分離培養し、耐性株の樹立を試みたものの樹立には至らなかった。その培養液の糖鎖解析を行ったが、特徴的な糖鎖発現は認めなかった。

今回の研究成果から、食道癌患者における血清中の糖鎖発現を利用することで、治療効果の判定に利用できる可能性が示唆された。

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 12 件)

(1)内門泰斗, 夏越祥次: リンパ節郭清 up to date 特集 食道癌. 消化器外科, 38 巻, Page1263-1269, 2015. (査読なし)

(2)Okumura H, Uchikado Y, Omoto I, Motomura M, Kita Y, Sasaki K, Noda M, Arigami T, Uenosono Y, Baba K, Mori S, Kijima Y, Nakajo A, Kurahara H, Maemura K, Sakoda M, Owaki T, Ishigami S, Natsugoe S. Ferredoxin Reductase Is Useful for Predicting the Effect of Chemoradiation Therapy on Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2015 Dec;35(12):6471-6474.

<http://ar.iiarjournals.org/content/35/12/6471>. (査読あり)

(3)Okumura H, Uchikado Y, Matsumoto M, Omoto I, Sasaki K, Kita Y, Arigami T, Uenosono Y, Nakajo A, Owaki T, Mori S, Ishigami S, Natsugoe S. Clinical significance of mediastinoscope-assisted transhiatal esophagectomy in patients with esophageal cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2015 Aug;400(6):699-706. doi: 10.1007/s00423-015-1330-y. (査読あり)

(4)Nabeki B, Ishigami S, Uchikado Y, Sasaki K, Kita Y, Okumura H, Arigami T, Kijima Y, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. Interleukin-32 expression and Treg infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2015

May;35(5):2941-2947.

<http://ar.iiarjournals.org/content/35/5/2941>. (査読あり)

(5)Okumura H, Uchikado Y, Omoto I, Kita Y, Sasaki K, Arigami T, Uenosono Y, Matsushita D, Hiraki Y, Owaki T, Ishigami S, Natsugoe S. The usefulness of neoadjuvant chemoradiation therapy for locally advanced esophageal cancer with multiple lymph-node metastases. *Ann Surg Oncol.* 2014 Sep;21(9):2845-9.

doi:10.1245/s10434-014-3688-4. (査読あり)

(6)Sakurai T, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Owaki T, Kita Y, Setoyama T, Omoto I, Kijima Y, Ishigami S, Natsugoe S. Endoglin (CD105) is a useful marker for evaluating microvessel density and predicting prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2014 Jul;34(7):3431-8.

<http://ar.iiarjournals.org/content/34/7/3431>. (査読あり)

(7)Omoto I, Matsumoto M, Okumura H, Uchikado Y, Setoyama T, Kita Y, Owaki T, Kijima Y, Shinchi H, Ishigami S, Ueno S, Natsugoe S. Expression of vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor receptor-3 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2014 Apr;7(4):1027-1032. doi: 10.3892/ol.2014.1823 (査読あり)

(8)Okumura H, Uchikado Y, Matsumoto M, Owaki T, Kita Y, Omoto I, Sasaki K, Sakurai T, Setoyama T, Nabeki B, Matsushita D, Ishigami S, Hiraki Y, Nakajo M, Natsugoe S. Prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma patients treated with neoadjuvant chemoradiation therapy. *Int J Clin Oncol.* 2013 Apr;18(2):329-34. doi: 10.1007/s10147-012-0383-y. (査読あり)

(9)Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Nakajo A, Ishigami S, Okumura H, Kijima Y, Ueno S, Natsugoe S. Clinical significance of lymph node micrometastasis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2013 Feb;20(2):515-21. doi: 10.1245/s10434-012-2355-x. (査読あり)

(10)Kita Y, Okumura H, Uchikado Y, Sasaki K, Omoto I, Matsumoto M, Setoyama T, Tanoue K, Mori S, Owaki T, Ishigami S, Ueno S, Kajiya Y, Natsugoe S. Clinical significance of ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2013 May;20(5):1646-52. doi: 10.1245/s10434-012-2796-2. (査読あり)

(11)Ishigami S, Arigami T, Uchikado Y,

Setoyama T, Kita Y, Sasaki K, Okumura H, Kurahara H, Kijima Y, Harada A, Ueno S, Natsugoe S. IL-32 expression is an independent prognostic marker for gastric cancer. Med Oncol. 2013 Jun;30(2):472. doi: 10.1007/s12032-013-0472-4. (査読あり)

(12) Ishigami S, Arigami T, Setoyama T, Okumura H, Sasaki K, Uchikado Y, Kurahara H, Kijima Y, Nishizono Y, Nakajo A, Natsugoe S. Clinical-pathological implication of human leukocyte antigen-F-positive gastric adenocarcinoma. J Surg Res. 2013 Oct;184(2):802-6. doi: 10.1016/j.jss.2013.04.003. (査読あり)

〔学会発表〕(計 9件)

(1) 内門泰斗, 奥村浩, 尾本至, 喜多芳昭, 恵浩一, 大脇哲洋, 有上貴明, 上之園芳一, 石神純也, 夏越祥次: 80歳以上の超高齢食道癌患者に対する治療法をどう選択するか? . 第70回日本消化器外科学会総会, 浜松, 7月17日, 2015.

(2) 内門泰斗, 奥村浩, 松本正隆, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 尾本至, 瀬戸山徹郎, 有上貴明, 上之園芳一, 石神純也, 喜島祐子, 盛真一郎, 夏越祥次: ハイリスクの食道癌に対する外科治療の選択. 第115回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 4月18日, 2015.

(3) Yasuto Uchikado, Hiroshi Okumura, Masataka Matsumoto, Tetsuhiro Owaki, Yoshiaki Kita, Itaru Omoto, Takaaki Arigami, Yosikazu Uenosono, Sumiya Ishigami Shoji Natsugoe. : The blood flow evaluation of gastric tube by ICG fluorescence method and laser Doppler method in esophagectomy for esophageal cancer. 14th World Congress of the ISDE, Vancouver Canada, September 24, 2014.

(4) 内門泰斗, 奥村浩, 尾本至, 松本正隆, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 瀬戸山徹郎, 有上貴明, 上之園芳一, 盛真一郎, 喜島祐子, 石神純也, 夏越祥次: 食道・頭頸部重複癌の治療に関する検討. 第52回日本癌治療学会学術集会, 横浜, 8月30日, 2014.

(5) 内門泰斗, 奥村浩, 尾本至, 大脇哲洋, 柳政行, 松本正隆, 瀬戸山徹郎, 喜多芳昭, 佐々木健, 石神純也, 夏越祥次: T1bN0 食道癌に対する治療について. 第68回日本食道学会学術集会, 横浜, 7月3日, 2014.

(6) 内門泰斗, 奥村浩, 佐々木健, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 松本正隆, 尾本至, 瀬戸山徹郎, 有上貴明, 上之園芳一, 石神純也, 盛真一郎, 上野真一, 夏越祥次: 超高齢者の食道癌に対する根治的放射線療法について. 第75回日本臨床外科学会総会, 名古屋市, 11月23日, 2013.

(7) 内門泰斗, 奥村浩, 佐々木健, 大脇哲洋, 松本正隆, 喜多芳昭, 瀬戸山徹郎, 尾本至,

石神純也, 夏越祥次: 食道癌の右開胸手術後における胸水中のトリグリセライド測定の意義. 第68回日本消化器外科学会総会, 宮崎市, 7月19日, 2013.

(8) 内門泰斗, 奥村浩, 上之園芳一, 佐々木健, 松本正隆, 喜多芳昭, 大脇哲洋, 瀬戸山徹郎, 尾本至, 石神純也, 夏越祥次: 食道ESDに対するデバイスの工夫. 第67回日本食道学会学術集会, 大阪市, 6月13日, 2013.

(9) 内門泰斗, 奥村浩, 松本正隆, 大脇哲洋, 佐々木健, 喜多芳昭, 尾本至, 瀬戸山徹郎, 有上貴明, 上之園芳一, 石神純也, 喜島祐子, 盛真一郎, 上野真一, 夏越祥次: 超高齢者の食道癌に対する外科治療の選択. 第113回日本外科学会, 福岡市, 4月12日, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内門 泰斗 (UCHIKADO YASUTO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
特例准教授
研究者番号: 25462031

(2) 研究分担者

奥村 浩 (OKUMURA HIROSHI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号: 10398282

大脇 哲洋 (OWAKI TETSUHIRO)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号: 50322318

夏越 祥次 (NATSUGOE SHOUJI)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号: 70237577

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUHITO)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号: 70250917

石神 純也 (ISHIGAMI SUMIYA)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号: 90325803