

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26460648
研究課題名(和文) 発癌過程におけるRB1CC1, p62/SQSTM1異常と臨床適用

研究課題名(英文) Clinical application of p62/SQSTM1 in cancers

研究代表者
岡部 英俊 (Okabe, Hidetoshi)
滋賀医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：70079713
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)：頭頸部癌、下咽頭癌における臨床病理学的解析で、p62/SQSTM1の過剰が放射線治療抵抗性のマーカーになり、治療選択の良い指標となることを実証した。放射線治療下の下咽頭癌では、p62過剰がNrf2-Keap1経路を介してROS抵抗性を惹起しており、放射線細胞死抵抗性となっていることが明らかとなった。一方で、CDDP化学療法環境下では治療抵抗性はp62過剰に左右されず、p62過剰の見られる放射線治療抵抗性症例では放射線治療よりも化学療法、外科治療を優先すべきことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypopharyngeal carcinoma is one of the worst prognostic malignancies among head and neck carcinomas. Therefore, a good biomarker should be identified to predict the best therapeutic option before starting the treatment. In cell models, p62/SQSTM1 levels affected the Nrf2-Keap1 pathway, ROS levels, GSH/GSSG ratios and cell growth, especially under irradiation rather than under CDDP exposure, which was toxic despite p62/SQSTM1 status. In a clinical cohort of hypopharyngeal carcinomas, high levels of p62/SQSTM1 significantly predicted poor prognosis (log-rank test, Chi-square value = 6.750, p = 0.0094) and maximum critical risk (Cox proportional hazard ratio = 4.405, p = 0.0086), especially in the radiotherapy group. Therefore, when p62/SQSTM1 is elevated in the biopsy section, hypopharyngeal carcinoma should be treated with surgical and/or chemotherapeutic options.

研究分野：臨床病理診断

キーワード：p62/SQSTM1 RB1CC1 biomarker

1. 研究開始当初の背景

Autophagy 経路の異常と癌化については確定的な見解はなかった。本経路の特異的なカーゴ分子である p62/SQSTM1 (sequestosome1、以下、p62) は caspase8 apoptosis 経路と NFκB survival 経路、両経路の調節をするハブ機能を持ち、その蓄積は Nrf2-Keap1 系を調節することで、酸化ストレス細胞死抵抗性を亢進させると報告されている (Komatsu, et al. Nat Cell Biol 2010)。一方で、p62 の蓄積自身が組織の酸化ストレスを上昇させ、DNA damage を増加させ、更なる genome instability ~ 癌化を促進させると云われている (Mathew, et al. Cell 2009)。我々は、研究開始当時、肺癌、頭頸部癌に於いても、早期の癌病変から p62 の蓄積が認められ、臨床経過指標となり得ることを見出し、口腔内癌については本内容を報告することができた (Inui, et al. PLoS One 2013)。本研究では、肺癌、頭頸部癌、等の酸化ストレス過剰組織における p62 経路の異常を検討し、臨床経過との関連を系統的に解析したいと考えた。更に Nrf2 経路や酸化ストレス状態を評価することによって、p62 の異常と癌化進展の関連について解析したいと考えた。

2. 研究の目的

発癌過程における p62 経路の異常を検討することで、autophagy と癌化の関わりという医学上の一つの hot topic 解明に貢献して行く。同時に、臨床の病理学、検査医学にも貢献して行く。肺癌や頭頸部癌など酸化ストレス過剰の組織の発癌過程における解析を遂行することで、当該組織の発癌における p62 経路異常、特に早期発癌における意義を解明できると考えている。肺癌では早期癌の検出が重大且つ困難な課題となっているが、血清学的に p62 検出 (異常蓄積) が可能となるべく取り組むことによって、早期肺癌の検出限界を改善させ、臨床医学に大きな貢献ができ

るようにする。

3. 研究の方法

発癌過程における p62 経路異常を免疫組織化学的手法にて検討し、早期発癌過程における本経路の異常の意義を検証する。肺癌、頭頸部癌など酸化ストレス抵抗性の高い組織に於ける発癌過程に特に注目し、当該組織での p62 経路異常、酸化ストレス抵抗性との関連等、癌進展における意義、臨床における意義を明らかにしたい。

早期肺癌症例の p62 検出 (異常蓄積) を血清学的に可能にする検査系を立ち上げる挑戦を進め、肺癌の早期発見検出限界を大きく改善できるよう、取り組む。

(1) 肺癌、頭頸部癌における p62/SQSTM1 のバイオマーカー的評価

一般病院でも汎用的な診断検査であり得ることが我々の一つの重要なテーマでもあり、この観点から免疫組織化学的手法をベースとしたバイオマーカー的意義の評価を行う。併行評価するマーカーとして、抗酸化ストレス分子である Nrf2 等を予定している。より効率的に研究を推進する為、研究ではこれまでに作成してきた Tissue microarray (TMA) を用いて p62、及び、各分子の免疫染色を遂行する。肺癌、頭頸部癌症例の各種臨床データと関連させ統計解析を行いながら、迅速に、各々の蛋白発現の意義、予後との関連性等について検討する。

(2) 肺癌、頭頸部癌症例における血清内 p62/SQSTM1 検出への挑戦

肺癌や頭頸部癌患者の血清中で、ELISA 等、臨床検査学的な汎用手法にて p62 の検出を試みる。

4. 研究成果

肺癌、頭頸部癌に於いて、p62/SQSTM1 の発現レ

ベルのスコアリングを行ったところ、p62 が強く発現している症例は他に比べて特に治療成績不良で、p62 は肺癌予後不良のバイオマーカーになり得ると考えられた。口腔扁平上皮癌では、p62 は癌細胞のグルタチオン誘導に寄与し、放射線治療抵抗性を惹起した。臨床病理評価に於いても p62 蓄積を認める症例は予後不良であり、p62 は新規の臨床病理的バイオマーカーになると示唆された。下咽頭癌における解析では、p62 の過剰が放射線治療抵抗性のマーカーになり、治療選択の良い指標となることを実証できた。放射線治療下の下咽頭癌では p62 の過剰は Nrf2-Keap1 経路を介して ROS 抵抗性を惹起しており、放射線細胞死抵抗性となっていることが示唆された。一方で、CDDP 化学療法環境下では治療抵抗性は p62 過剰に左右されず、p62 過剰の見られる症例では放射線治療よりも化学療法、外科治療を優先すべきことが明らかになった。

p62/SQSTM1 の蓄積から、がんの代謝環境が大きく変わることが示唆されたので、腎癌、骨肉腫において代謝変化の解析を行った。腎癌では glucose 飢餓時、骨肉腫では酸性環境下、どちらもがん細胞生存には危急な状態で、治療実施時に起こる変化であるが、このような環境下でも、がん細胞は自身の mitochondria 機能や epigenome 状態を最大限利用し、生き延びることが明らかとなった。このような危急状況で生存するがん細胞を根絶するには、mitochondria や epigenome をターゲットとした multi-modal treatments が必要で、これを実施することで、がん細胞を根絶できる可能性を明らかにできた。

尚、肺癌、頭頸部癌患者さんからの血清学的 p62 検出の試みは上手く行かなかった。今後の課題である。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Isono T, Chano T, Kitamura A, Yuasa T. Glucose deprivation induces G2/M transition-arrest and cell death in N-GlcNAc2-modified protein-producing renal carcinoma cells. **PLoS One**. 9(5): e96168. 2014. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0096168.
2. Zhao L, Xu YH, Qin H, Abe S, Akasaka T, Chano T, Watari F, Komatsu N, Chen X. Platinum on nanodiamond: A promising prodrug conjugated with stealth polyglycerol, targeting peptide, and acid-responsive antitumor drug. **Adv Funct Mater**. 24(34): 5348-5357. 2014. 査読有り doi: 10.1002/adfm.201304298
3. Kita H, Okamoto K, Kushima R, Kawauchi A, Chano T. Dimethyl sulfoxide induces chemotherapeutic resistance in the treatment of testicular embryonal carcinomas. **Oncol Lett**. 10(2): 661-666. 2015. 査読有り <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4509453/>
4. Takagi A, Kume S, Kondo M, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Chano T, Matsusaka T, Nagao K, Adachi Y, Chan L, Maegawa H, Uzu T. Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation. **Sci Rep**. 6: 18944. 2016. 査読有り doi: 10.1038/srep18944.
5. Lemma S, Avnet S, Salerno M, Chano T, Baldini N. Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells. **PLoS One**. 11(2): e0149481. 2016. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0149481.
6. Isono T, Chano T, Yonese J, Yuasa T.

- Therapeutic inhibition of mitochondrial function induces cell death in starvation-resistant renal cell carcinomas. **Sci Rep.** 6: 25669. 2016. 査読有り doi: 10.1038/srep25669.
7. **Chano T**, Avnet S, Kusuzaki K, Bonuccelli G, Sonveaux P, Rotili D, Mai A, Baldini N. Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells. **Am J Cancer Res.** 6(4): 859-875. 2016. 査読有り <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859889/>
 8. Avnet S, Lemma S, Cortini M, Pellegrini P, Perut F, Cesari V, Zini N, Kusuzaki K, **Chano T**, Grisendi G, Dominici M, De Milito A, Baldini N. Altered pH gradient at the plasma membrane of osteosarcoma cells is a key mechanism of drug resistance. **Oncotarget.** 7(39): 63408-63423. 2016. 査読有り doi: 10.18632/oncotarget.11503.
 9. Isono T, **Chano T**, Yoshida T, Kageyama S, Kawauchi A, Suzaki M, Yuasa T. Hydroxyl-HIF2- α is potential therapeutic target for renal cell carcinomas. **Am J Cancer Res.** 6(10): 2263-2276. 2016. 査読有り <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088290/>
 10. Avnet S, Di Pompo G, **Chano T**, Errani C, Ibrahim-Hashim A, Gillies RJ, Donati DM, Baldini N. Cancer-associated mesenchymal stroma fosters the stemness of osteosarcoma cells in response to intratumoral acidosis via NF- κ B activation. **Int J Cancer.** 140(6): 1331-1345. 2016. 査読有り doi: 10.1002/ijc.30540.
 11. Massa A, Perut F, **Chano T**, Woloszyk A, Mitsiadis TA, Avnet S, Baldini N. The effect of extracellular acidosis on the behaviour of mesenchymal stem cells in vitro. **Eur Cell Mater.** 33: 252-267. 2017. 査読有り doi: 10.22203/eCM.v033a19.
 12. Di Pompo G, Lemma S, Canti L, Rucci N, Ponzetti M, Errani C, Donati D, Gillies R, **Chano T**, Baldini N, Avnet S. Intratumoral acidosis fosters cancer-induced bone pain through the activation of the mesenchymal tumor-associated stroma in bone metastasis from breast carcinoma. **Oncotarget.** 2017. Apr 13; Epub ahead of print. 査読有り [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=17091&pubmed-linkout=1](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=17091&pubmed-linkout=1)
 13. Arai A, **Chano T**, Ikebuchi K, Hama Y, Ochi Y, Tameno H, Shimada T. p62/SQSTM1 levels predicts radiotherapy resistance in hypopharyngeal carcinomas. **Am J Cancer Res.** 2017. 7(4): 881-891. 査読有り <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5411795/>
- 〔学会発表〕(計 2 件)
1. **Chano T**. Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells. (Keynote lecture) ISCaM2015 (2nd Annual Meeting of the International

Society of Cancer Metabolism), San Servolo, Venice, Italy, 2015.9.16-19.

2. Chano T, Avnet S, Kusuzaki K, Mai A, Baldini N. Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells. EORS 2016 (European Orthopaedic Research Society). Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italy, 2016.9.14-16.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：癌の検査方法、癌細胞増殖阻害剤、抗癌剤及び抗癌剤のスクリーニング方法

発明者：茶野徳宏

権利者：滋賀医科大学

種類：特許

番号：特願 2015-123952

出願年月日：2015年6月19日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 英俊 (OKABE Hidetoshi)

滋賀医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：70079713

(2) 研究分担者

茶野 徳宏 (CHANO Tokuhiro)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40346028

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし

研究者番号：