

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：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461971

研究課題名(和文)食道癌術前補助化学療法抵抗性の分子機構における酸化ストレス系シグナル異常の解明

研究課題名(英文)Oxidative stress signaling as the molecular mechanism of chemo-resistance in esophageal cancer

研究代表者

小杉 伸一 (KOSUGI, Shin-ichi)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：90401736

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)：食道癌における化学療法抵抗性の分子機構を酸化ストレス系シグナルの観点から解明を試みた。酸化ストレス系の下流に位置する分子であるNQO1の腫瘍組織内発現は病理学的治療効果との関連はなかったが、独立した予後不良因子であった。またNQO1発現を調節するNrf2発現との間に有意な相関関係は認められなかった。一方、非腫瘍性扁平上皮のNQO1発現は臨床的治療効果と相関し、発現陰性は独立した予後良好因子であった。非腫瘍性扁平上皮のNQO1発現は、治療抵抗性や予後の予測に有用なバイオマーカーになりうる。

研究成果の概要(英文)：We sought to elucidate the molecular mechanism of chemo-resistance in esophageal cancer from the viewpoint of oxidative stress signaling. In esophageal cancer cells, expression of NQO1, a downstream molecule of the pathway, had no significant association with histological response to preoperative chemotherapy but was an independent unfavorable prognostic factor. In addition, NQO1 expression had no significant correlation with expression of Nrf2, although it is a central molecule of the pathway and regulates NQO1 expression under physiological conditions. On the other hand, NQO1 expression in nontumorous squamous epithelium had significant association with clinical response to preoperative chemotherapy and was an independent favorable prognostic factor. NQO1 expression in nontumorous squamous epithelium could be a promising biomarker to predict treatment outcomes after preoperative chemotherapy followed by esophagectomy.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道外科学 食道癌 術前補助化学療法 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、進行食道癌に対する 5-FU と CDDP を用いた術前補助化学療法の有効性が証明され、標準治療と位置付けられた。しかし、一部には腫瘍の縮小が得られない、術後早期に再発を来すといった治療抵抗性の症例が存在する。過去にわれわれは、臨床病理学的な背景として、周囲臓器浸潤を伴う、頸部・胸部・腹部にわたるリンパ節転移を有する、壁内転移を有する高度進行食道癌では術前補助化学療法に抵抗性を示し、予後は極めて不良であることを報告してきた

(Kosugi S et al. *Scand J Gastroenterol* 2005, Kosugi S et al. *Ann Surg Oncol* 2011)。しかしながら、術前補助化学療法抵抗性の分子機構については明らかにされておらず、これを解明することは治療抵抗症例を選択する診断技術や新規治療標的の開発にとって必要不可欠である。

(2) Nrf2 は酸化ストレスに対して様々な細胞防御遺伝子の発現を活性化させる中心的な転写因子である。正常細胞において、Nrf2 は Keap1-Cul3 E3 ligase によるユビキチン化によりプロテアソーム系で速やかに分解される。一方、酸化ストレス下の細胞では、Keap1 の不活性化による Nrf2 の蓄積が、NQO1 などの抗酸化タンパク質の発現を誘導し、酸化ストレスに対する抵抗性の獲得に寄与している。

(3) この Nrf2 活性化は 5-FU や CDDP の化学療法抵抗性の分子機構として注目されている。悪性腫瘍における Nrf2 活性化の原因は、Nrf2 や Keap1 遺伝子変異による Nrf2 タンパク質の過剰蓄積である。また近年では、p62 の S351 リン酸化が Keap1 をオートファジー系による分解に導き、Nrf2 を活性化することや、rapamycin が p62 のリン酸化を抑制し、Nrf2 の活性化を阻害することが報告された。

(Ichimura Y, Komatsu M et al. *Mol Cell* 2013)

(4) 以上より、われわれは「食道癌腫瘍組織における p62-Keap1-Nrf2 シグナル異常は術前補助化学療法抵抗性や食道切除後の予後に関与し、治療前生検検体を用いた

p62-Keap1-Nrf2 シグナル異常の評価は、治療抵抗性や予後の予測に有用である。そして同シグナルは化学療法抵抗性を克服する治療標的となる」という仮説をたて、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食道癌における術前補助化学療法抵抗性の分子機構を p62-Keap1-Nrf2 シグナルの観点から解明し、治療抵抗性や予後の予測に有用な新規バイオマーカーや新規治

療薬を開発することであり、研究期間内に以下の諸点を解明する。

(1) 外科切除検体における腫瘍組織内 p62-Keap1-Nrf2 シグナル異常の解析: 術前補助化学療法後の外科切除検体を用いて p62, Keap1, Nrf2, Nrf2 によって転写調節を受ける NQO1 の発現を、それぞれのモノクローナル抗体による免疫組織化学染色によって検出する。各分子の発現と、臨床病理学的特徴、病理学的治療効果、食道切除後の再発や予後との関連性を明らかにする。

(2) 治療前生検検体における p62-Keap1-Nrf2 シグナル異常の解析: 過去に採取され保管されている治療前生検検体を用い、p62, Keap1, Nrf2, NQO1 の発現を免疫組織化学染色によって検出し、術前補助化学療法抵抗性や予後との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 術前補助化学療法後に外科切除が施行された食道癌症例を用いて p62, Keap1, Nrf2, Nrf2 によって転写調節を受ける NQO1 の発現を、それぞれのモノクローナル抗体による免疫組織化学染色によって検出する。腫瘍組織内の染色陽性細胞の割合 (0-100%) と染色強度 (0: なし, 1: 弱, 2: 中, 3: 強) を調べ、染色陽性細胞の割合 × 染色強度を NQO1 発現スコアとし、90 以上を NQO1 高発現例とする (図 1)。各分子の発現と臨床病理学的特徴、病理学的治療効果、患者予後の関係について統計学的な解析を行う。

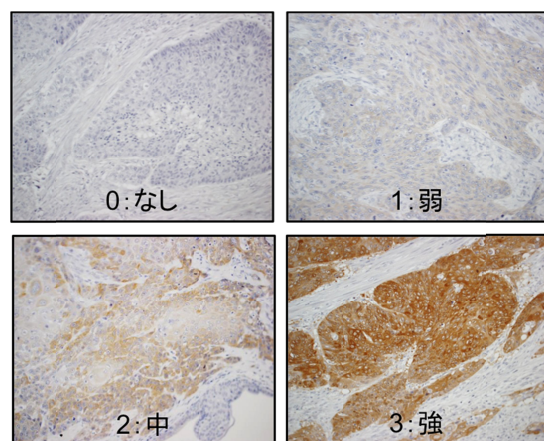


図 1: 腫瘍組織内の NQO1 染色強度

(2) 食道癌症例の治療前生検検体に対して、p62, Keap1, Nrf2, NQO1 のモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法により、各分子の腫瘍組織における発現を検出する。各分子の発現と病理学的治療効果や患者予後との相関について統計学的な解析を行う。

(3) NQO1 の発現を調節する因子としては、Nrf2 の他に NQO1 遺伝子多型の影響が報告されている。NQO1 C609T を有する場合、NQO1

タンパク質分解が亢進し、非腫瘍性扁平上皮における発現が低下していることが明らかにされている。そこで、非腫瘍性扁平上皮のNQO1発現に着目して、術前補助化学療法抵抗性や癌再発との関連について解析を行う。

4. 研究成果

(1) 腫瘍組織内のNQO1発現について、術前補助化学療法後食道切除症例(39例)の切除検体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、39例中18例(46%)がNQO1高発現例であった。NQO1高発現例は下部食道癌に多く(56%, $P=0.04$)、全例外膜浸潤陽性(T3)であった($P<0.01$)が、その他の臨床病理学的因子(年齢, 性別, 病理学的リンパ節転移, 分化度, 脈管侵襲, 術前補助化学療法のコース数, 病理学的治療効果)との関連はなかった。NQO1高発現例の2年無再発生存率は31.1%であり、NQO1低発現例の79.9%と比較して有意に不良であった(図2: $P<0.01$)。他に単変量解析で有意な予後因子は、組織学的壁深達度(T2以下87.5% vs. T3以上48.7%, $P=0.04$)、脈管侵襲(陽性28.2% vs. 陰性80.9%, $P<0.01$)、病理学的治療効果(Grade 1a以下43.4% vs. Grade 1b以上75.0%, $P=0.03$)であった。多変量解析ではNQO1高発現(ハザード比12.8, 95%信頼区間2.91-56.4, $P<0.01$)、病理学的リンパ節転移(ハザード比4.05, 95%信頼区間1.22-13.6, $P=0.02$)、病理学的治療効果(ハザード比0.17, 95%信頼区間0.04-0.73, $P=0.02$)が独立した予後不良因子であった。

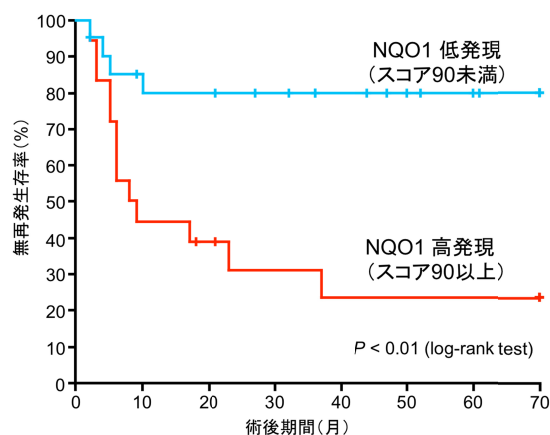


図2: 腫瘍組織内のNQO1発現と術後再発

同様に、術前補助化学療法後食道切除症例(39例)の切除検体を用いて、NQO1の転写調節を行っているNrf2の免疫組織化学染色を行った。NQO1陰性例と陽性例の間でNrf2染色強度に明らかな差は認められなかった。抗Nrf2抗体の染色は39例全例に認められた。症例ごとのNrf2染色強度はほぼ同一であり、染色強度を評価する客観的な基準を設定できるほど

の差は認められなかった。以上より今回の解析対象においては、NQO1発現とNrf2発現の間に有意な相関関係は認められないと結論づけた。

(2) 腫瘍組織内のNQO1発現について、治療前生検検体(17検体)を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、NQO1発現と癌再発との間に有意な相関を見出せなかった。

(3) 術前補助化学療法後食道切除症例(43例)の切除検体を用いて、非腫瘍性扁平上皮の免疫組織化学染色を行った(図3)。非腫瘍組織の基底細胞(矢印)や血管内皮細胞(矢頭)が抗NQO1抗体で染色されない場合を陰性とする、22例(51%)が陰性であった。陰性例では、術前補助化学療法後に原発腫瘍が消失あるいは表在癌化する例が41%に認められたが、陽性例では5%に認めるのみであった($P<0.01$)。全体としては、陰性例の46%と陽性例の10%で原発腫瘍の縮小が得られた($P=0.02$)。

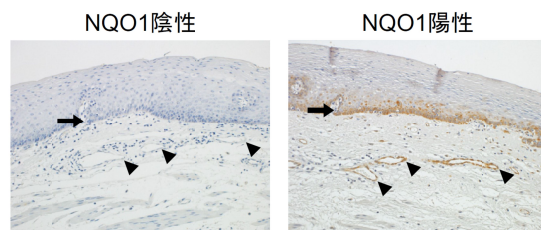


図3: 非腫瘍性食道扁平上皮におけるNQO1発現

陰性例の3年無再発生存率は76%であり、陽性例の48%と比較して有意に良好であった($P=0.02$, 図4)。多変量解析でも非腫瘍性扁平上皮のNQO1発現陰性は独立した予後良好因子であった(ハザード比0.30, $P=0.04$)。

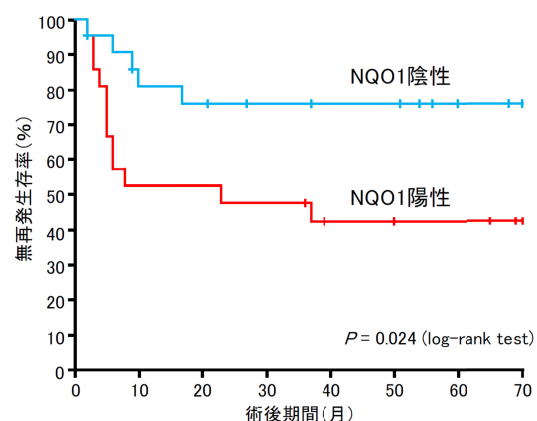


図4: 非腫瘍性食道扁平上皮のNQO1発現と術後再発

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ichikawa H, Kosugi S, Hirose Y, Matsuda Y, Ishikawa T, Hanyu T, Usui K, Muneoka Y, Nagahashi M, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Wakai T. Prognostic significance of NQO1 expression in esophageal squamous cell carcinoma after preoperative chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil followed by curative esophagectomy. *Int J Clin Exp Pathol* 2016;9:7393-7401. <http://www.ijcep.com> (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

Kosugi S, Ichikawa H, Hanyu T, Ishikawa T, Wakai T. Clinical significance of NQO1 expression in nontumorous squamous epithelium of esophageal cancer patients. 15th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus 2016.9.20 Singapore (Republic of Singapore)

Ishikawa T, Kosugi S, Ichikawa H, Hanyu T, Suzuki T, Wakai T. Expression of NQO1 in esophageal cancer cells after neoadjuvant chemotherapy. 14th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus 2014.9.24 Vancouver (Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小杉 伸一 (KOSUGI, Shin-ichi)
新潟大学・医歯学総合病院・特任教授
研究者番号：90401736

(2) 研究分担者

若井 俊文 (WAKAI, Toshifumi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：50372470

石川 卓 (ISHIKAWA, Takashi)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：70586940

羽入 隆晃 (HANYU, Takaaki)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：50719705

小山 諭 (KOYAMA, Yu)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：10323966

廣瀬 雄己 (HIROSE, Yuki)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：10737365

市川 寛 (ICHIKAWA, Hiroshi)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：50721875

(3) 連携研究者

小松 雅明 (KOMATSU, Masaaki)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：90356254