

## 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：26462006

研究課題名(和文) p62-Keap1-Nrf2 pathwayによる大腸癌抗癌剤耐性機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of drug resistance in colorectal cancer by p62-Keap1-Nrf2 pathway

研究代表者

亀山 仁史 (KAMEYAMA, Hitoshi)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40626420

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)：p62-Keap1-Nrf2経路はNQO1等の抗酸化ストレス蛋白を誘導している。NQO1は癌細胞においては抗癌剤耐性に関与することが知られている。本研究の目的は進行大腸癌におけるNQO1発現と予後の関連を明らかにすることである。KRAS野生型大腸癌において、NQO1陰性例はNQO1陽性例に比べ、病勢制御率が有意に良好であった。さらに、NQO1陰性例は無増悪再発期間、全生存期間も有意に良好であった。KRAS野生型進行大腸癌において、腫瘍におけるNQO1発現検索は、化学療法の効果または予後に関する有効な予測因子となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：p62-Keap1-Nrf2 pathway induce the antioxidants like NQO1. In cancer cells, NQO1 confers resistance against anticancer agents. The aim of this study was to evaluate the association between NQO1 expression and prognosis in patients with advanced colorectal cancer (CRC). Among the patients with KRAS wild CRC, NQO1-negative patients showed significantly better disease control rate than NQO1-positive patients. Moreover, NQO1-negative patients had longer progression-free survival and overall survival than NQO1-positive patients. NQO1 expression in the tumor may be a predictor of therapeutic efficacy and prognosis in patients with KRAS wild advanced CRC.

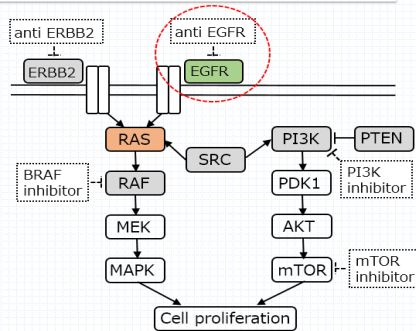
研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 抗癌剤耐性 NQO1 KRAS

### 1. 研究開始当初の背景

GTP 結合蛋白である KRAS は EGFR 以下のシグナルを伝達する。KRAS 遺伝子変異によって KRAS 蛋白が恒常的に活性化されると EGFR シグナルとは無関係に MAPK 経路が活性化されるため、抗癌剤不応性になると考えられている(下図)。KRAS 遺伝子測定は抗 EGFR 抗体薬の治療効果因子として大腸癌領域ではその地位を確立している。しかし変異のない野生型であっても奏効率の上乗せは 10-30% であり、個別化治療のバイオマーカーとしては限界がある。

#### EGFR-mediated signaling pathways



一方、Nrf2 は酸化ストレス応答の中心的役割を果たしている転写因子である。担癌状態においても、Nrf2 の関与が報告されており、肝細胞癌、肺癌、膵臓癌でもその関連性が示唆されている。Nrf2 の活性化により抗酸化蛋白質が誘導され、抗癌剤や放射線照射に対する抵抗性が獲得されると考えられている。また、酸化ストレス刺激による Nrf2 の核内移動に伴い、抗酸化蛋白質である NQO1 も発現亢進する。

われわれは肝内胆管癌において、NQO1 発現と Nrf2 発現の関連性を報告した。その中で、NQO1 低発現は腫瘍の分化に関与し、切除後の予後が不良であることを明らかにした (Wakai T, et al: *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4: 363-70)。

また小松らの報告により Keap1 mutation および p62 蛋白過剰蓄積が、Nrf2 活性化を介した癌細胞増殖に関連があることも明らかになっている (Komatsu M, et al: *J Cell Biol* 2011;193:275-84)。

以上より、大腸癌細胞における化学療法耐性機序には、Nrf2/NQO1 の発現が関与していることが推測される。KRAS 遺伝子変異が抗癌剤耐性に関与していることは明らかであるが、KRAS 野生型でも抗癌剤効果が得られない症例が存在する。したがって申請者らは「大腸癌抗癌剤耐性の機序には Oncogenic Ras-MEK-ERK 経路とは別経路として p62-Keap1-Nrf2 pathway が関与する」という仮説をたて、本研究を企画した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「KRAS 遺伝子変異とは独立した別経路『p62-Keap1-Nrf2 pathway』

が大腸癌の抗癌剤耐性に関与している」という仮説を病理学的、分子生化学的側面から解明し、大腸癌治療における新規バイオマーカーを探求することである。

### 3. 研究の方法

抗癌剤治療を施行した大腸癌切除例を対象とし、

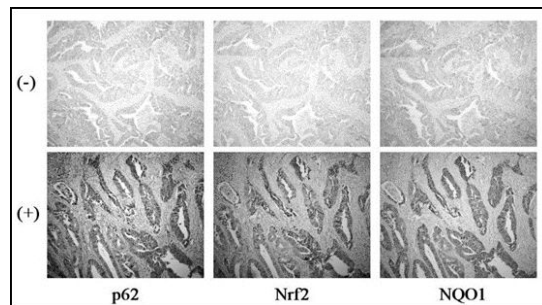
(1) 切除標本を使用しモノクローナル抗体を用いて p62/Nrf2/NQO1/免疫染色を行い、その発現形式を評価する。

(2) ダイレクトシーケンス法を用いて KRAS 遺伝子変異 (codon12/13/61) 測定を行う。臨床効果判定は CT/MRI/PET-CT などの画像診断、統計学的予後解析を行って評価する。抗酸化蛋白発現と抗癌剤耐性との関連についても明らかとする。

### 4. 研究成果

#### (1) 免疫染色

polot study として進行大腸癌症例を対象に免疫染色を行うと、症例ごとに p62/Nrf2/NQO1 の発現パターンに差異があることが判明した (下図)。



#### (2) 患者背景

2007 年 3 月 ~ 2013 年 1 月までに当院消化器外科で化学療法を施行された局所進行または転移再発大腸癌 47 例を対象とし、NQO1 発現と臨床病理学的因子の関連について検討した。男性 28 例、女性 19 例で年齢の中央値は 62 歳 (範囲: 17-78) であった。腫瘍の局在は、結腸 19 例 (40.4%)、直腸 28 例 (59.6%) であった。手術が行われた症例は 23 例 (48.9%) で手術未施行の症例は 24 例 (51.0%) であった。KRAS 遺伝子野生型は 31 例 (66.0%)、変異型が 16 例 (34.0%) であった。KRAS 野生型の症例のうち、抗 EGFR 抗体薬は 13 例 (41.9%) で使用されていた。NQO1 発現陽性は 37 例 (78.7%) に認め、NQO1 発現陰性は 10 例 (21.3%) であった。NQO1 発現別で比較すると臨床病理学的因子に特に差は認めなかった。

#### (3) NQO1 発現と抗癌剤効果

対象となった進行大腸癌症例では 5FU を中心とした様々な化学療法が施行されていた。5FU 系薬剤は 43 例 (91.5%) で第一選択薬として使用されていた。Bevacizumab、Panitumumab、Cetuximab などの分子標的薬は

32例(68.1%)で使用されていた。RECIST v1.1を用いて判定すると、NQO1発現陰性例のDisease control rate; DCR (complete response + partial response + stable disease)は100%であり、NQO1発現陽性例の48.6%と比較して有意に化学療法が奏効していた(P = 0.031)。次にKRAS遺伝子野生型・変異型に分けて検討を行った。KRAS野生型においてNQO1陰性例のDCRは100%であり、NQO1陽性例の48.0%に対して有意に化学療法が奏効していた(P = 0.028)(下図)。一方で、KRAS変異型においては、NQO1発現別に奏効率の差をみとめなかった(P = 0.23)。

KRAS wild type

	NQO1-positive	NQO1-negative	P-value
CR	0	0	
PR	6	3	
SD	6	3	
PD	13	0	
DCR	48.0%	100%	0.028

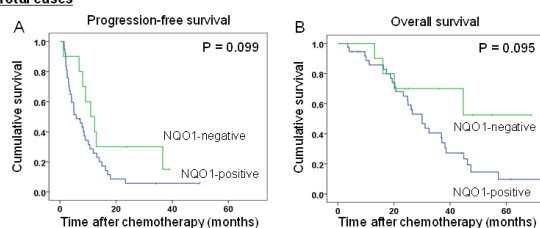
RECIST v1.1

CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease, PD: progressive disease  
DCR: disease control rate (CR + PR + SD)

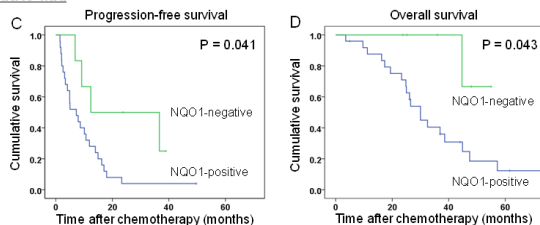
#### (4)NQO1発現と予後の関連

全症例を対象に予後との関連を検討した。無増悪生存期間、全生存期間ともに、NQO1別の検討では差を認めなかった(P = 0.099, P = 0.095)(下図上段)。KRAS野生型において、無増悪生存期間はNQO1陰性例で有意に良好であった(P = 0.041)。さらに全生存期間もNQO1陰性例で有意に良好であった(P = 0.043)(下図中段)。一方、KRAS変異型症例では、無増悪生存期間、全生存期間ともに差は認めなかった(P = 0.98, P = 0.89)(下図下段)。

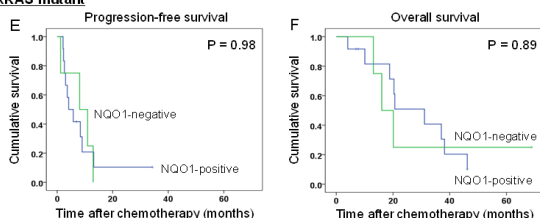
Total cases



KRAS wild



KRAS mutant



KRAS野生型症例における無増悪生存期間について単変量解析を行うと、NQO1発現陰性が有意な予後良好因子であった(P = 0.041)。さらに多変量解析でも、NQO1発現陰性が有意な因子であった(Hazard ratio; 2.9, 95% Confidence interval; 1.01-8.3, P = 0.049)。

KRAS野生型における全生存期間について単変量解析を行うと、外科的切除あり(P = 0.008)、NQO1発現陰性(P = 0.043)が有意な予後良好因子であった。さらに多変量解析を行うと外科的切除ありが有意な因子であった(Hazard ratio; 0.011, 95% Confidence interval; 1.5-24.4, P = 0.011)。

KRAS野生型進行大腸癌における化学療法の効果予測因子として、NQO1発現は有用なバイオマーカーとな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2件)

Hitoshi Kameyama, Yuki Hirose, Yasunobu Matsuda, Masayuki Nagahashi, Hiroshi Ichikawa, You Sato, Saki Yamada, Shinnosuke Hotta, Yosuke Tajima, Takuma Okamura, Mae Nakano, Masato Nakano, Yoshifumi Shimada, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Toshifumi Wakai

Clinical significance of NQO1 expression in patients with advanced KRAS wild colorectal cancer. Int J Clin Exp Pathol (2017.1.27 accepted) 査読有

佐藤 洋(指導:若井俊文)  
切除不能・再発大腸癌におけるNAD(P)H: quinone oxidoreductase 1発現の臨床的意義. 新潟医学会雑誌 129(6):300-308, 2015. 査読有

(学会発表)(計3件)

亀山仁史, 廣瀬雄己, 島田能史, 八木亮磨, 田島陽介, 岡村拓磨, 中野雅人, 市川 寛, 永橋昌幸, 坂田 純, 小林 隆, 若井俊文  
大腸癌化学療法におけるNQO1発現解析の意義. JDDW2016.11.5, 神戸コンベンションセンター(兵庫・神戸)。

Hitoshi Kameyama, Yuki Hirose, Yoshifumi Shimada, Ryoma Yagi, Yosuke Tajima, Takuma Okamura, Mae Nakano, Masato Nakano, Masayuki Nagahashi, Takashi Kobayashi, Toshifumi Wakai

Clinical significance of NQO1 expression in patients with KRAS wild-type unresectable colorectal cancer. IASGO 2016.9.8, Seoul (韓国)。

亀山仁史, 廣瀬雄己, 佐藤 洋, 山田沙季, 阿部 馨, 庭野稔之, 岩城孝和, 八木亮磨, 田島陽介, 中野麻恵, 中野雅人, 島田能史, 坂田 純, 小林 隆, 皆川昌広, 小杉伸一, 小山 諭, 若井俊文

進行再発大腸癌におけるNQO1発現の臨床的

意義 . 第 115 回日本外科学会定期学術集会  
2015.4.16, 名古屋国際会議場(愛知・名古屋).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

亀山 仁史 (KAMEYAMA, Hitoshi)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：4062420

### (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

味岡 洋一 (AJIOKA, Yoichi)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：80222610

西條 康夫 (SAIJO, Yasuo)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：10270828

松田 康伸 (MATSUDA, Yasunobu)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：40334669

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

永橋 昌幸 (NAGAHASHI, Masayuki)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号：30743918

小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号：40464010

### (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

### (4) 研究協力者