

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893039

研究課題名(和文) デコリンを用いたS-1術前補助化学療法の新規効果予測法の開発

研究課題名(英文) Development of the new predictive method of S-1 neoadjuvant chemosensitivity using Decorin

研究代表者

中嶋 大 (NAKASHIMA, DAI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50431747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：デコリン(DCN)の発現減弱が抗癌剤S-1に対する感受性を上昇させることを先行実験で示したが、詳細なメカニズムは不明であった。本計画実験では、DCNがS-1暴露後の細胞増殖およびアポトーシスに深く関与していることを示した。さらに、口腔癌生検材料を用いてDCNの発現状況を確認したところ、S-1術前補助化学療法に対する感受性とDCN発現に有意な相関があったことから、DCNの発現確認はS-1の効果予測因子として臨床応用が可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our previous study suggested that decorin (DCN) silencing cells increase chemosensitivity to S-1, consisted of tegafur, prodrug of 5-fluorouracil, however, detail mechanism of DCN for chemotherapy is still unknown. In this study, we demonstrated decreasing cell proliferation and increasing apoptosis with dephosphorylation of AKT after S-1 chemotherapy in vitro and in vivo. We then investigated whether DCN expression predicts the clinical responses of neoadjuvant chemotherapy (NAC) using S-1 (S-1 NAC) for oral cancer patients. Interestingly, low DCN expression was observed in 5 of 6 cases with complete responses to S-1 NAC, and in one case of 10 cases with stable/progressive disease, indicating that S-1 chemosensitivity is dramatically effective in oral cancer patients with low DCN expression compared with high expression. Our findings suggest that DCN is a key regulator for chemoresistant mechanisms, and is a predictive immunomarker of the response to S-1 NAC and patient prognosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Decorin 口腔扁平上皮癌 S-1 AKT経路

1. 研究開始当初の背景

術前補助的化学療法(NAC)を用いて腫瘍の Down Staging を図ることで、切除不能な進行癌に対しても積極的な外科治療が可能となっている。特に頭頸部癌では感覚器が近接しているため、NAC を適切に使用することが重要と考えられる。経口抗癌剤であるテガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム(S-1)はフルオロウラシル(5-FU)の制癌効果を高めた薬剤で、胃癌、食道癌、大腸癌、膵癌などの癌化学療法に用いられており、その多くが標準治療として確立されている。申請者のグループは頭頸部癌に対して S-1 を用いた NAC (S-1 NAC)を施行し、高い奏功率があることだけでなく、リンパ節非転移症例での奏功率が有意に高いことを報告した(頭頸部癌, 2006 32 巻 1 号 51-55; J Cancer Sci & Ther. 2010 2: 132-135)。しかし、S-1 NAC に対して抵抗性を示す症例の場合、手術時期の遅延や医療費の増大等の問題を引き起こしてしまうため、治療前に S-1 NAC に対する治療効果が予測可能であれば、患者への不利益を回避する事が可能になると考えた。

2. 研究の目的

申請者らは S-1 の腫瘍縮小効果の耐性機構にデコリン(DCN)が深く関与していることを同定しており、DCN のタンパク発現を減弱させることで薬剤耐性の解除をマウスモデルで可能としている。そこで本申請では、DCN の S-1 耐性機構への関与を詳細に解明し、臨床検体における S-1 NAC の効果予測因子としての応用を検証することとした。

3. 研究の方法

(1) DCN 発現減弱株での薬剤輸送因子の発現、解毒/代謝酵素の発現および trafficking 関連因子の検索

DCN の発現減弱により S-1 の感受性が高くなるメカニズムを薬剤輸送因子、解毒/代謝酵素、trafficking 関連因子を用いて解析する。

(2) 生検材料で DCN の発現の検索

口腔癌の病理組織診断時の生検材料における DCN の発現を免疫組織染色法(IHC)にて解析する。

(3) S-1 NAC の臨床的効果判定のデータ

S-1 NAC を施行した口腔癌患者の生検材料における DCN の発現強度を IHC スコアリング法にて評価する。

(4) DCN 発現量を評価し、実際の S-1 治療効果と二重盲検法にて比較

生検材料を用いて DCN 発現量を比較し、実際の S-1 治療効果と二重盲検法にて比較する。

(5) 申請者らの既出 *in vitro* のデータとの相関関係の確認

S-1 治療効果について、先行実験で行っていた *in vitro* のデータとの相関性を比較・検討する。

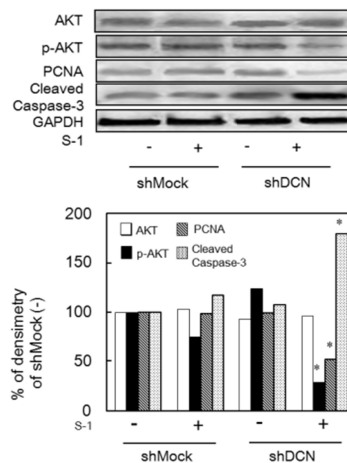
4. 研究成果

(1) DCN 発現減弱株での薬剤輸送因子の発現、解毒/代謝酵素の発現および trafficking 関連因子の検索

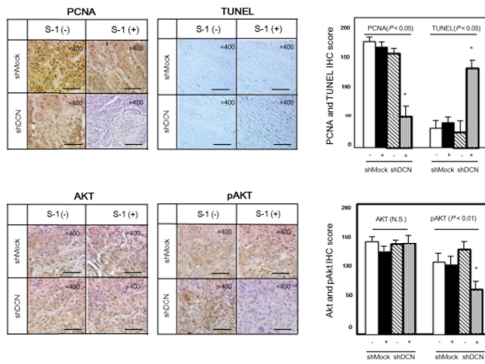
抗癌剤耐性メカニズムに関与している酵素やトランスポーター等の発現は、DCN 発現減弱口腔癌細胞株(shDCN 株)では変化が見られなかった。

そこで、DCN が直接細胞内シグナルに作用すると仮定し、細胞シグナル伝達因子を調査したところ、shDCN 株では抗癌剤に曝露後、AKT のリン酸化が有意に低下しただけでなく、細胞増殖の低下、さらにはアポトーシスが上昇していることが明らかになった(図 1)。

AKT のリン酸化等の変化を shDCN 株由来マウス xenograft を用いて *in vivo* にて検討したところ、*in vitro* と同様の結果を得た(図 2)。



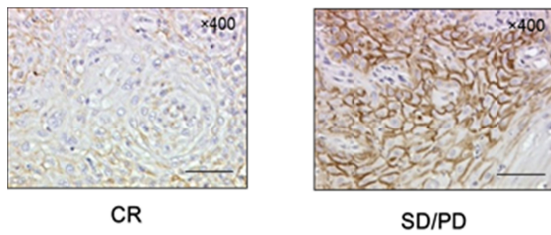
(図 1 *in vitro* での発現解析)



(図 2 *in vivo* での発現解析)

(2) 生検材料で DCN の発現の検索

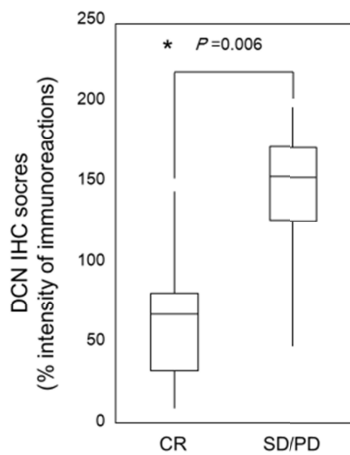
IHC の結果、細胞膜や細胞外基質に DCN が多く発現していることが確認できた (図 3)。



(図 3 DCN の発現確認)

(3) S-1 NAC の臨床的効果判定のデータ

S-1 奏効群(CR群)に比べ、非奏効群(SD/PD群)において DCN の有意な発現増強を認めた(図 4)。

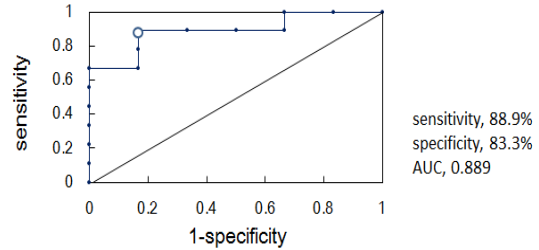


(図 4 DCN IHC スコア)

(4) DCN 発現量を評価し、実際の S-1 治療効果と二重盲検法にて比較

S-1 NAC 症例 16 例の内訳は、男性 13 例 (81.3%)、女性 3 例(18.7%)で、年齢は 53-83 歳で、平均年齢 65.8 歳であった。また S-1 治

療効果判定の結果は、CR 群 6 例 (37.5%)、SD/PD 群 (62.5%) であった。さらに臨床応用へとつなげるため、臨床検体の IHC スコアから ROC 曲線を用いて、カットオフ値 (cut-off value : 119) を算出した (図 5)。



(図 5 ROC 曲線)

(5) 申請者らの既出 *in vitro* のデータとの相関関係の確認

既出の *in vitro* のデータでは、DCN の発現を減弱させると抗癌剤への感受性が上昇することを明らかにしている。

本研究では S-1 NAC 症例と DCN 発現量を比較したところ、DCN 高発現群では CR 群 1 例、SD/PD 群 9 例であった。DCN 低発現群では、CR 群 5 例、SD/PD 群 1 例であり、S-1 NAC 症例と DCN 発現量に有意な差を認めた(図 6) (p < 0.05)。

したがって、この結果は *in vitro* の既出データと相関しており、臨床的には DCN タンパクの発現状態が S-1 NAC の奏功に深く関与していることが示された。

Relative expression	S-1 NAC (n=16)		P value
	CR (%)	SD/PD (%)	
High Decorin	1 (17%)	9 (90%)	0.003
Low Decorin	5 (83%)	1 (10%)	

(図 6 S-1NAC 症例と DCN 発現量の相関関係)

[まとめ]

本申請研究では、細胞株およびマウスモデルを用いて DCN 減弱による S-1 効果増強の詳細なメカニズムを解明した。さらに、臨床検体(頭頸部癌)16 例の生検組織中における DCN 発現を検討することで、S-1 NAC の効果予測因子としての可能性を検討したところ、DCN 減弱口腔癌患者では S-1 NAC の奏功が有意に高いことが示された。

したがって、S-1 NAC の効果予測因子として DCN の発現解析が有効であることが示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中嶋 大 (DAI NAKASHIMA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50431747