



## Nuclear Factor- $\kappa$ B Expression as a Novel Marker of Radioresistance in Early-Stage Laryngeal Cancer

吉田, 賢史

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4794

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004794>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 吉田 賢史  
博士の専攻分野の名称 博士（医学）  
学 位 記 番 号 博い第 4794 号  
学位授与の要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当  
学位授与の日 付 平成 21 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Nuclear Factor- $\kappa$  B Expression as a Novel Marker of Radioresistance in Early-Stage Laryngeal Cancer (早期喉頭癌における放射線抵抗性の新規指標としての Nuclear Factor- $\kappa$  B の発現)

審 査 委 員

主 査 教 授 伊藤 智雄  
教 授 具 英成  
教 授 南 博信

## 論文要旨

### NUCLEAR FACTOR-κB EXPRESSION AS A NOVEL MARKER OF RADIRESISTANCE IN EARLY-STAGE LARYNGEAL CANCER

早期喉頭癌における放射線抵抗性の新規指標としての  
Nuclear Factor-κB の発現

#### 【論文要旨】

吉田 賢史, 佐々木 良平, 西村 英輝,  
岡本 欣晃, 鈴木 陽子, 河邊 哲也,  
斎藤 幹, 大月 直樹, 林 祥剛,  
副島 俊典, 丹生 健一, 杉村 和朗

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

放射線医学

指導教授：杉村 和朗 教授

論文提出者：吉田 賢史

---

Key words: Early-stage laryngeal cancer, Nuclear factor-κB, Radioresistance, Radiotherapy, Immunohistochemistry.

#### 【目的】

早期喉頭癌は放射線治療のみで治癒し得る代表的な悪性腫瘍であるが、この20年間治療成績は改善していない。ゆえにその局所再発に関連する因子を調べることは治療成績の改善に加え、真の放射線抵抗性を規定する因子を知ることにもつながり非常に重要である。放射線抵抗性に関する生物学的因子としてはこれまで p53, bcl-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor receptor (EGF receptor)等についての報告があるが決定的なものはない。

Nuclear Factor-κB (NF-κB)は生命現象における重要な転写因子であり、細胞質において炎症性物質、癌遺伝子、腫瘍増殖因子、ストレス、活性酸素などによって活性化される。その後核内へ移行して最終的に細胞の生存・増殖に加え、炎症、腫瘍増殖・転移、血管増生などを誘導する。近年の臨床的な報告としては、NF-κB 発現は食道癌の術前化学放射線療法後における局所制御の予測因子となりうるとの報告がある。しかし、放射線単独治療が施行される早期喉頭癌と NF-κB 発現との関係は明らかではない。そこで我々は NF-κB の早期喉頭癌における放射線抵抗性を示すマーカーとしての有効性について評価した。

#### 【方法】

1990年から2005年にかけて神戸大学医学部附属病院で根治的放射線治療が施行された早期喉頭癌症例は250例あり、そのうち48例が局所再発をきたした。その48症例のうち入手可能であった35例の治療前生検検体を入手した。これに対して1対2の患者対象研究という形で70例の非再発症例を抽出し、これらに關しても治療前検体を同様に入手した(Table 1)。その後105例の検体すべてに対して免疫染色を施行した。免疫染色はNF-κBに加えbcl-2, EGF receptorについても施行し、再発・非再発症例間でその発現率の差異を検討した。また、NF-κBについては35例の再発症例のうち再発後検体が入手可能であった29例に關して、治療前後での発現の差異を検討した。免疫染色の評価はNF-κBに關しては核・細胞質両方で評価を行い、bcl-2, EGF receptorについては細胞質での評価を基本とした。

#### 【結果】

全体的なNF-κB発現の傾向としては、細胞質が優位に染まり、核については大部分が散在性に染まるというものであった。核のみが染まっているものはなかった。発現率に關しては、治療前検体については再発症例35例のうち27例がNF-κB発現陽性であった。これに対して非再発症例では70例中35例が陽性であった。この差異をカイ二乗検定を用いて

解析したところ  $p$  値が 0.01 と、再発群で NF- $\kappa$ B 発現率が有意に高かった (Table 2)。同様の検定を bcl-2, EGF receptor についても行ったが有意差は認められなかった ( $p = 0.75, 0.48$ , Table 2)。陽性反応的中率は NF- $\kappa$ B, bcl-2, EGF receptor それぞれ 0.44, 0.35, 0.42 であった。複数の因子の組み合わせによる陽性反応的中率についても検討もおこなったが NF- $\kappa$ B と bcl-2 では 0.42, NF- $\kappa$ B と EGF receptor では 0.4, さらに NF- $\kappa$ B と bcl-2, EGF receptor では 0.39 と、NF- $\kappa$ B 単独の場合と比べて大きな変化はなかった。核が染まっているもののみを陽性とした検討では再発 35 例中 14 例が陽性、非再発 70 例中 12 例が陽性であり、カイ二乗検定にて  $p = 0.02$  とほぼ同様の結果がでた。陽性反応的中率も 0.54 と著明な変化を認めず、核・細胞質両方で評価した場合とほぼ同等であった。

統いて 105 例を NF- $\kappa$ B 発現の有無で再層別化し、局所制御率について検討した。105 例のうち NF- $\kappa$ B 発現陽性群は 62 例、その 5 年局所制御率は 46% であった。これに対して NF- $\kappa$ B 発現陰性群は 43 例であり、その 5 年局所制御率は 81% であった。Log rank 検定を用いて検討したところ  $p = 0.008$  と、陽性発現群が有意に不良であった。同様の検討を bcl-2 (陽性群 93 例、陰性群 12 例) と EGF receptor (陽性群 78 例、陰性群 27 例) についても行ったが両者ともに有意差は認めなかつた ( $p = 0.86, 0.55$ , Figure 2)。核 NF- $\kappa$ B 発現で評価した場合、陽性群は 5 年局所制御率 40%、陰性群は 70% と有意に陽性群で悪かつたが、核・細胞質両方で評価した場合に比べ鋭敏とは言えなかつた。

統いて予後因子解析をこれら 3 マーカーに加え臨床的因子も加えて行った。これまでの結果から NF- $\kappa$ B 発現の評価は核・細胞質両方での評価を用いた。単変量解析では NF- $\kappa$ B 発現、腫瘍の部位、T stage が予後因子として有意であったが、多変量解析を用いた検討では NF- $\kappa$ B 発現のみが有意であった (Table 3)。再発検体を用いた検討では、入手できた 29 例中 26 例で NF- $\kappa$ B 発現が陽性であり、23 例で治療前より発現の増強が認められた (Table 4, Figure 3)。

#### 【考察】

早期喉頭癌は放射線治療単独で治癒し得るが、治療成績に関する保存的手術との無作為比較試験は無い。また同様に機能的な部分、すなわち发声や嚥下についての比較試験もない。そのため放射線抵抗性腫瘍の予測マーカーとしての生物学的因子は治療法選択の上においても重要な意味をもつ可能性がある。これまで議論されてきたマーカーとしては前述の如く bcl-2, EGF-receptor, p53 等があるが確定的なものはない。今回の研究でわれわれの研究では、NF- $\kappa$ B という新しいマーカーの発現が bcl-2, EGF-receptor に比べ局所制御を予測する因子としてより鋭敏であるという結果となつた。しかし陽性反応的中率が低いという問題点があつた。因子の組み合せによる検討も行つたが有用ではなかつた。また核 NF- $\kappa$ B 発現を用いた場合でも改善はなかつた。NF- $\kappa$ B 単独か、他の生物学的マーカーとの組み合わせのどちらがより強力な予測因子となるかについては、さらに大規模かつ前向きな研究が必要であると言える。また予後因子の検討において NF- $\kappa$ B は単独の予後因子となり得

たが、単変量解析で腫瘍の部位、T stage も優位な因子となつてゐる。今回の我々の研究は患者対象研究であり、NF- $\kappa$ B の予後因子としての価値を決定するには同様により前向きな研究が必要である。

この研究のもうひとつ重要な発見は、再発喉頭癌において NF- $\kappa$ B 発現がより強調されているという点である。NF- $\kappa$ B 活性と放射線抵抗性に関する実験的報告はいくつかあり、今回の我々の結果はそれと矛盾しないものであると言える。しかし NF- $\kappa$ B 活性の増強にはその他のいくつかの要因も関係してくると考えられる。その一つが検体の保存期間の問題、つまり再発検体のほうが保存期間が治療前検体と比べより短いというものである。個々においてはその通りである。しかし全体で保存期間に関する検討をしたところ、治療前・再発後検体間で差はなく、その影響は少ないと考えられた。その他発現を増強させ得る因子として、化学療法、喫煙、感染等が挙げられる。これらの影響を最大限の注意を払って除去しながらさらなる研究を進める必要がある。

早期喉頭癌において放射線抵抗性を予測することは、喉頭温存を含む治療成績の改善という点での利益がある。すなわち放射線抵抗性の腫瘍に対しては化学放射線療法の施行や喉頭温存術+術後放射線治療などのより強力な治療法を最初から行うことが可能となる。最終的には NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いた治療法も検討されるべきであるが、これから克服しなければならない様々な問題点もある。しかし今回の我々の結果は放射線治療と NF- $\kappa$ B 阻害剤併用治療の可能性を示したものであると言える。

#### 【結論】

この報告には 2 つの重要な発見がある。ひとつは早期喉頭癌において治療前の NF- $\kappa$ B 発現は放射線治療による局所制御と関係し、また強力な予後因子でもあるということである。もう一つは再発腫瘍において NF- $\kappa$ B 発現は増強されるということである。以上より、NF- $\kappa$ B は早期喉頭癌の放射線抵抗性のメカニズムにおいて重要な役割を担つてゐる可能性があると考えられる。

## 神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2057 号	氏名	吉田 賢史
論文題目 Title of Dissertation	Nuclear factor- $\kappa$ B expression as a novel marker of radioresistance in early-stage laryngeal cancer.		
審査委員 Examiner	主査 <u>神野 祐雄</u> 副査 <u>具 茂成</u> 副査 <u>南 博信</u>		
(要旨は1,000字～2,000字程度)			

早期喉頭癌は放射線治療のみで治癒し得る代表的な悪性腫瘍であるが、この20年間治療成績は改善していない。ゆえにその局所再発に関連する因子を調べることは治療成績の改善に加え、真の放射線抵抗性を規定する因子を知ることにもつながり非常に重要である。Nuclear Factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B)は生命現象における重要な転写因子であり、細胞質において炎症性物質、癌遺伝子、腫瘍増殖因子、ストレス、活性酸素などによって活性化される。その後核内へ移行して最終的に細胞の生存・増殖に加え、炎症、腫瘍増殖・転移、血管増生などを誘導する。近年の臨床的な報告としては、NF- $\kappa$  B 発現は食道癌の術前化学放射線療法後における局所制御の予測因子となりうるとの報告がある。しかし、放射線単独治療が施行される早期喉頭癌と NF- $\kappa$  B 発現との関係は明らかではない。そこで申請者は NF- $\kappa$  B の早期喉頭癌における放射線抵抗性を示すマーカーとしての有効性について評価した。1990年から2005年にかけて神戸大学医学部附属病院で根治的放射線治療が施行された早期喉頭癌症例は250例あり、そのうち48例が局所再発をきたした。その48症例のうち入手可能であった35例の治療前検査体を入手した。これに対して1対2の患者対象研究という形で70例の非再発症例を抽出し、これらに関しても治療前検査体を同様に入手した。その後105例の検査すべてに対して免疫染色を施行した。免疫染色は NF- $\kappa$  B に加え bcl-2, EGF receptor についても施行し、再発・非再発症例間でその発現率の差異を検討した。また、NF- $\kappa$  B については35例の再発症例のうち再発後検査体が入手可能であった29例に関して、治療前後での発現の差異を検討した。免疫染色の評価は NF- $\kappa$  B に関しては核・細胞質両方で評価を行い、bcl-2, EGF receptor については細胞質での評価を基本とした。発現率に関しては、治療前検査体については再発症例35例のうち27例が NF- $\kappa$  B 発現陽性であった。これに対して非再発症例では70例中35例が陽性であった。この差異をカイ二乗検定を用いて解析したところ p 値が 0.01 と、再発群で NF- $\kappa$  B 発現率が有意に高かった。bcl-2, EGF receptor には有意差は認められなかった。陽性反応的中率は NF- $\kappa$  B, bcl-2, EGF receptor それぞれ 0.44, 0.35, 0.42 であった。複数の因子の組み合わせによる陽性反応的中率についても検討もおこなったが NF- $\kappa$  B と bcl-2 では 0.42, NF- $\kappa$  B と EGF receptor では 0.4, さらに NF- $\kappa$  B と bcl-2, EGF receptor では 0.39 と、NF- $\kappa$  B 単独の場合と比べて大きな変化はなかった。核が染まっているもののみを陽性とした検討では再発35例中14例が陽性、非再発70例中12例が陽性であり、カイ二乗検定にて p = 0.02 とほぼ同様の結果がでた。陽性反応的中率も 0.54 と著明な変化を認めず、核・細胞質両方で評価した場合とほぼ同等であった。

統いて105例を NF- $\kappa$  B 発現の有無で再層別化し、局所制御率について検討した。105例のうち NF- $\kappa$  B 発現陽性群は62例、その5年局所制御率は46%であった。これに対して NF- $\kappa$  B 発現陰性群は43例であり、その5年局所制御率は81%であった。Log rank 検定を用いて検討したところ p = 0.008 と、陽性発現群が有意に不良であった。同様の検討を bcl-2 (陽性群 93 例、陰性群 12 例) と EGF receptor (陽性群 78 例、陰性群 27 例) についても行ったが両者ともに有意差は認めなかった。核 NF- $\kappa$  B 発現で評価した場合、陽性群は

5年局所制御率 40%，陰性群は 705 で  $p = 0.02$  と有意に陽性群で悪かったが、核・細胞質両方で評価した場合に比べ鋭敏とは言えなかった。統いて予後因子解析をこれら 3 マーカーに加え臨床的因子も加えて行った。単変量解析では NF- $\kappa$ B 発現，腫瘍の部位，T stage が予後因子として有意であったが、多変量解析を用いた検討では NF- $\kappa$ B 発現のみが有意であった。再発検体を用いた検討では、入手できた 29 例中 26 例で NF- $\kappa$ B 発現が陽性であり、23 例で治療前より発現の増強が認められた。

以上、本研究は、早期喉頭癌において治療前の NF- $\kappa$ B 発現の放射線抵抗性に対する影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった NF- $\kappa$ B 発現の意義に関して重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。