



Prognostic impact of MutT homolog-1 expression on esophageal squamous cell carcinoma

Akiyama, Shingo

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7035号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007035>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Prognostic impact of MutT homolog-1 expression on esophageal squamous cell carcinoma

食道扁平上皮癌における MutT homolog-1 発現の予後に対する影響

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
食道胃腸外科学
(指導教員；掛地吉弘教授)

秋山 真吾

【背景】

食道癌は治療効果が向上した現在であっても、依然、予後の悪い癌の一つである。日本においては食道癌のうち 90%以上が、食道扁平上皮癌である。食道扁平上皮癌の発症には喫煙、飲酒などの環境要因が強く関連することが知られている。生体は常に活性酸素種 (ROS) に曝されており、生体内の ROS のレベルは喫煙などの環境要因や、Warburg effect などの細胞ごとの固有の特性により決定される。細胞内で ROS が増加すると、グアニンやアデニンといったプリン残基が酸化修飾を受ける。酸化修飾を受けたスクレオチドが DNA 内に取り込まれると、点変異や DNA 鎖切断が誘導され、細胞死や癌化の原因となると考えられている。MutT homolog-1 (MTH1) はスクレオチドプール内の酸化スクレオチドを一連の酸化体に加水分解することで、DNA 内への取り込みを阻害する酸化防御機構の一つである。近年、いくつかの癌種において、MTH1 発現の亢進と癌の悪性化との関連が示されており、治療標的としての可能性も示唆されている。今回、食道扁平上皮癌における MTH1 発現の意義について検討した。

【対象】

(1) 食道扁平上皮癌細胞株 (TE 系 9 種) 及び正常細胞株 (BJ, MRC5, WI38)。(2) 1994 ~2011 年に九州大学消化器・総合外科にて術前無治療で根治切除術を施行した食道扁平上皮癌症例 84 例。

【方法】

(1) 細胞株における MTH1 発現レベルを q-PCR 法、Western blot 法を用いて比較した。
(2) 臨床検体における MTH1 発現を免疫組織化学染色で評価した。また酸化ストレスマークターである 8-oxo dG も同一症例で評価した。症例は平均年齢 63.7 歳、男性 73 例・女性 11 例、組織型は高分化型/中分化型/低分化型:19/48/17 であり、病期は Stage 0/I/II/III/IV : 2/20/22/40/0 であった。MTH1 発現を高発現、低発現の 2 群に分けて評価した。また前述の症例のうち 50 例の癌部・非癌部における MTH1 mRNA 発現レベルを q-PCR 法を用いて測定した。これらの結果について臨床病理学的因子・予後との関連を検討した。

【結果】

(1) 正常細胞株に比較して、食道扁平上皮癌細胞株では MTH1 タンパク発現、mRNA 発現がともに有意に増加していた (Figure 1A, 1B, 1C)。さらに MTH1 タンパク発現と mRNA 発現に正の相関を認めた ($P=0.003$) (Figure 1D)。(2) 臨床組織検体における MTH1 mRNA 発現レベルは正常部に比べ癌部で有意に高かった ($P<0.001$) (Figure 2A)。MTH1 免疫組織化学染色の評価は、癌部における染色範囲と染色強度を用いてスコア化した (Figure 2B-E)。細胞株における結果と同様に、臨床組織検体でも MTH1 mRNA 発現量と MTH1 タンパク発現 (MTH1 免疫組織化学染色スコア) に正の相関が認められた (Figure 2F)。MTH1 免疫組織化学染色スコアを用いて、全 84 例を、低発現群 52 例 (61.9%)、高発現群 32 例 (38.1%) の 2 群に分け、臨床病理学的因子との関連を検討したところ、MTH1 高発現群は低発現群に比べ、深達度、静脈管浸潤、ステージにおいてより進行した症例の割合が有意に

高かった ($P=0.0008$, 0.046 , 0.043) (Table 1)。予後との相関に関しては、全生存率、疾患特異的生存率の両者において、MTH1 高発現群で有意に予後が悪かった ($P=0.0021$, 0.0013) (Figure 3)。一方、酸化ストレスマーカーである 8-oxo dG の蓄積量は MTH1 発現と有意な相関はなく、臨床病理学的因子、予後とも有意な相関がなかった (Figure S1-3, Table S1)。疾患特異的生存率における、予後因子に関する検討では、単変量解析において、深達度 T3/4、リンパ節転移陽性、リンパ管侵襲陽性、静脈管侵襲陽性、MTH1 高発現が予後不良因子であり、これらの多変量解析では MTH1 高発現が独立した予後予測因子であった ($P=0.0121$) (Table 2)。

【検討】

食道扁平上皮癌は予後不良な癌の一つであるが、そのリスクファクターとして喫煙などの環境因子が強くかかわっているため、その癌化や進行に酸化ストレスが強く関連していることが示唆される。MTH1 はヌクレオチドプールにおける酸化ヌクレオチドの浄化因子であり、本研究において、MTH1 高発現が食道扁平上皮癌患者において予後不良因子であることが明らかとなった。本研究は MTH1 が食道扁平上皮癌患者の予後と関連することを示した初の研究である。

腫瘍は、エネルギー産生のために好気性の解糖経路に依存しており (Warburg effect)、腫瘍内の ROS レベルは腫瘍の進行にともなって増加する。さらに食道扁平上皮癌のリスクファクターである喫煙などの環境要因により、細胞の ROS レベルが上昇することが示されている。MTH1 は、細胞内で酸化ヌクレオチドが除去し、DNA 内に取り込まれるのを防ぐことで細胞死などから逃れる防御因子であるが、MTH1 高発現患者ではより多くの酸化ヌクレオチドを浄化することで、腫瘍の生存および増殖が維持され、予後不良となっていると考えられる。

一方、今回の研究では酸化ストレスの評価マーカーとされる 8-oxo dG の蓄積量は予後とは相関しなかった。これは、腫瘍における 8-oxo dG 量が、ROS による產生されるのみでなく、MTH1 やそれ以外の OGG1 などの酸化ストレス防御因子による浄化されることなどの複数の因子により決定されるためと考えられる。我々のデータは、8-oxo dG の蓄積量自体よりも、MTH1 発現というヌクレオチドプールにおける酸化ヌクレオチドの浄化能の方が、ESCC 患者の予後により影響を与えることを示唆する結果となった。

MTH1 が高発現する原因に関しては、MTH1 のプロモーター領域には Ets ファミリーや NF-κB や AP-1 などの結合領域を含まれている。これらは細胞の炎症に関連する因子であり、食道上皮における炎症がこれらの因子を惹起し、MTH1 の発現が亢進されている可能性が考えられる。

本研究で MTH1 が食道扁平上皮癌患者の予後不良因子であることが明らかになり、MTH1 が高発現している症例において、より効果的な治療を検討する必要があることを示唆する結果となった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2728号	氏名	秋山 真吾
論文題目 Title of Dissertation	Prognostic impact of MutT homolog-1 expression on esophageal squamous cell carcinoma 食道扁平上皮癌におけるMutT homolog-1発現の予後に対する影響		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner: 真庭 謙昌 副査 Vice-examiner: 梶原 元 副査 Vice-examiner: 丹生清一		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

食道癌は治療効果が向上した現在であっても、依然、予後の悪い癌の一つである。日本においては食道癌のうち90%以上が、食道扁平上皮癌である。食道扁平上皮癌の発症には喫煙、飲酒などの環境要因が強く関連することが知られている。生体は常に活性酸素種(ROS)に曝されており、生体内のROSのレベルは喫煙などの環境要因や、Warburg effectなどの細胞ごとの固有の特性により決定される。細胞内でROSが増加すると、グアニンやアデニンといったプリン残基が酸化修飾を受ける。酸化修飾を受けたヌクレオチドがDNA内に取り込まれると、点変異やDNA鎖切断が誘導され、細胞死や癌化の原因となると考えられている。MutT homolog-1(MTH1)はヌクレオチドプール内の酸化ヌクレオチドを一リン酸化体に加水分解することで、DNA内への取り込みを阻害する酸化防御機構の一つである。近年、いくつかの癌種において、MTH1発現の亢進と癌の悪性化との関連が示されており、治療標的としての可能性も示唆されている。本研究では、食道扁平上皮癌におけるMTH1発現の意義について検討された。

結果として、(1) 正常細胞株に比較して、食道扁平上皮癌細胞株ではMTH1タンパク発現、mRNA発現とともに有意に増加していた。さらにMTH1タンパク発現とmRNA発現に正の相関を認めた($P=0.003$)。(2) 臨床組織検体におけるMTH1 mRNA発現レベルは正常部に比べ癌部で有意に高かった($P<0.001$)。MTH1免疫組織化学染色の評価は、癌部における染色範囲と染色強度を用いてスコア化した。細胞株における結果と同様に、臨床組織検体でもMTH1 mRNA発現量とMTH1タンパク発現(MTH1免疫組織化学染色スコア)に正の相関が認められた。MTH1免疫組織化学染色スコアを用いて、全84例を、低発現群52例(61.9%)、高発現群32例(38.1%)の2群に分け、臨床病理学的因子との関連を検討したところ、MTH1高発現群は低発現群に比べ、深達度、静脈管浸潤、ステージにおいてより進行した症例の割合が有意に高かった($P=0.0008$ 、 0.046 、 0.043)。予後との相関に関しては、全生存率、疾患特異的生存率の両者において、MTH1高発現群で有意に予後が悪かった($P=0.0021$ 、 0.0013)。一方、酸化ストレスマーカーである8-oxo dGの蓄積量はMTH1発現と有意な相関ではなく、臨床病理学的因子、予後とも有意な相関がなかった。疾患特異的生存率における、予後因子に関する検討では、単変量解析において、深達度T3/4、リンパ節転移陽性、リンパ管侵襲陽性、静脈管侵襲陽性、MTH1高発現が予後不良因子であり、これらの多変量解析ではMTH1高発現が独立した予後予測因子であった($P=0.0121$)。

食道扁平上皮癌は予後不良な癌の一つであるが、そのリスクファクターとして喫煙などの環境因子が強くかかわっているため、その癌化や進行に酸化ストレスが強く関連していることが示唆される。MTH1はヌクレオチドプールにおける酸化ヌクレオチドの浄化因子であり、本研究において、MTH1高発現が食道扁平上皮癌患者において予後不良因子であ

ることが明らかなとなった。

腫瘍は、エネルギー産生のために好気性の解糖経路に依存しており (Warburg effect)、腫瘍内の ROS レベルは腫瘍の進行にともなって増加する。さらに食道扁平上皮癌のリスクファクターである喫煙などの環境要因により、細胞の ROS レベルが上昇することが示されている。MTH1 は、細胞内で酸化ヌクレオチドが除去し、DNA 内に取り込まれるのを防ぐことで細胞死などから逃れる防御因子であるが、MTH1 高発現患者ではより多くの酸化ヌクレオチドを浄化することで、腫瘍の生存および増殖が維持され、予後不良となっていると考えられた。

一方、今回の研究では酸化ストレスの評価マーカーとされる 8-oxo dG の蓄積量は予後とは相関しなかった。これは、腫瘍における 8-oxo dG 量が、ROS による產生されるのみでなく、MTH1 やそれ以外の OGG1 などの酸化ストレス防御因子による浄化されることなどの複数の因子により決定されるためと考えられる。これらのデータは、8-oxo dG の蓄積量自体よりも、MTH1 発現というヌクレオチドプールにおける酸化ヌクレオチドの浄化能の方が、ESCC 患者の予後により影響を与えていることを示唆する結果となった。

MTH1 が高発現する原因に関しては、MTH1 のプロモーター領域には Ets ファミリー や NF- κ B や AP-1 などの結合領域を含まれている。これらは細胞の炎症に関連する因子であり、食道上皮における炎症がこれらの因子を惹起し、MTH1 の発現が亢進されている可能性が考えられた。

本研究は、本研究は MTH1 が食道扁平上皮癌患者の予後と関連することを示した初の研究であるが、従来ほとんど行われなかった、MTH1 が高発現している症例においてより効果的な治療を検討する必要があることを示唆する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。