

主論文の要約

***PAX5* gene as a novel methylation marker that predicts both clinical outcome and cisplatin sensitivity in esophageal squamous cell carcinoma**

食道扁平上皮癌において予後およびシスプラチン感受性に相関する新規メチル化遺伝子*PAX5*の検討

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

栗本 景介

【緒言】

食道癌は、最も治療が難しい固形癌の一つである。食道癌の治療戦略は、主に病理組織学的評価によって決定され、一般的に化学放射線療法に感受性がある食道扁平上皮癌には、集学的な治療が行われている。

今回我々は、頭頸部扁平上皮癌を用いたメチル化アレイで非常に癌特異的なメチル化マーカーであることが確認された *PAX5* 遺伝子について、同じ病理学的特徴を有し、アジアにおける食道癌のほぼ 90% を占める食道扁平上皮癌で検討した。

【対象及び方法】

2001 年から 2013 年までに当院で手術が施行された食道扁平上皮癌 78 症例の手術検体を用いて、*ACTB* をコントロールとし、Quantitative methylation specific PCR (QMSP) 法で *PAX5* 遺伝子のメチル化の頻度と程度を調べるとともに、*PAX5* の発現量を確認した。また 78 切除症例の臨床病理学的データや食道扁平上皮癌細胞株を用いて、*PAX5* 遺伝子のメチル化の有無が及ぼす臨床学的影響や細胞学的意義について検討した。

【結果】

食道癌扁平上皮癌 78 例における *PAX5* 遺伝子の QMSP 平均値は、非癌部で 0.3 (0-8.6)、癌部で 15.7 (0-136.3) であり、癌部の非常に特異的なメチル化を認めた ($P < 0.001$)。また、この 78 例において癌部の QMSP 値が閾値 17.4 以上の症例 (*PAX5* 高メチル化群) で、癌部での *PAX5* の発現が有意に低かった (Figure 1)。さらに、*PAX5* 高メチル化群では、無再発生存期間 (RFS) と全生存期間 (OS) が有意に短く、臨床病理学的因子について多変量解析を行ったところ、*PAX5* 遺伝子の高メチル化は RFS、OS いずれにおいても独立した予後不良因子であった。(RFS : Hazard Ratio (HR) = 2.84; $P = 0.005$; 95% Confidence Interval (CI): 1.39–5.81, OS : HR=3.23; $P = 0.002$; 95%CI: 1.52–7.01)(Figure 2)。

細胞学的意義について検討するため、食道扁平上皮癌細胞株において *PAX5* 遺伝子をノックダウンしたところ、その細胞増殖が有意に増加する (Figure 3.) とともに、シスプラチンに耐性となる傾向をみせた (Figure 4c.)。また、*PAX5* 遺伝子の下流に位置する遺伝子について RT² Profiler PCR Array Cancer Pathway Finder (Qiagen) を用いて探索したところ、*PAX5* 遺伝子をノックダウンすると *SLC2A1 (GLUT1)* の発現が上昇することがわかり、*PAX5* の発現が少ない症例で *GLUT1* の発現が多いことがわかった (Figure 4a,4b)。

【考察】

PAX5 遺伝子のメチル化は、いくつかの癌腫で報告されている。今回の検討では、*PAX5* 遺伝子に高度のメチル化を認めた症例では、予後が不良であった。TCGA データベースにおける頭頸部扁平上皮癌のコホートでも検討を行ったが、同様に、メチル

が高度の症例で OS が悪いという結果であった。

興味深いことに、食道腺癌においては *PAX5* 遺伝子のメチル化が遺伝子体部で起こるとともに、*PAX5* の発現量が上昇しており、*PAX5* 遺伝子のプロモーター領域でメチル化を起こし、その発現が低下する食道扁平上皮癌とはメチル化の状態が異なっていた。このように、*PAX5* の発現は、腫瘍の部位よりも、腫瘍の組織型に影響を受けるのではないかと考えられた。また、腺癌は化学療法に対して感受性が低いと考えられているが、*PAX5* 過剰発現腺癌はシスプラチンに基づく化学療法の治療の候補となりうると考えられる。

Zhang らは、メタアナリシスの結果、*p53* 遺伝子変異の有無と化学療法感受性が相関し、野生型 *p53* は化学療法感受性が良いことを報告している。また、肝細胞癌において、*PAX5* は *p53* 遺伝子のプロモーター領域に直接結合することが報告されている。これらから、*PAX5* の発現低下は、野生型 *p53* を低下させることで、発癌能を上昇させる変異型 *p53* 優位の状態をもたらすと考えられた。

癌細胞の増殖には、グルコース取り込みの上昇が必要と考えられるが、今回我々は、*PAX5* の発現低下が主要なグルコーストランスポーターである *GLUT1* の発現を上昇させることを確認した。*GLUT1* の増加は、mTOR の活性化と関連しており、解糖の増加および自食作用の減少をもたらすことが報告されている。また、*GLUT1* は、化学療法抵抗因子としても知られている。頭頸部癌において、*GLUT1* の発現が多い細胞株で著しいシスプラチン耐性を認めたが、*GLUT1* 遺伝子を阻害することで CDDP の感受性が上昇することが報告されている。我々は、食道扁平上皮癌細胞株において *GLUT1* 遺伝子を阻害したところ、同様の結果を得た。*PAX5* 遺伝子のノックダウンにより *GLUT1* mRNA が増加することで、CDDP 耐性をもたらすのではないかと考えられ、*PAX5* 遺伝子の抑制は CDDP の耐性のバイオマーカーとなり得ると考えた。

メチル化が癌特異的に起こっている場合、そのメチル化は癌検出の有用なマーカーとなり得る。従来の術前組織学的検査によって、扁平上皮癌と腺癌とを区別することはできるものの、腫瘍の悪性度や侵襲性、化学療法感受性を評価するためには、分子学的な診断が必要となる。*PAX5* QMSP アッセイにより、これらの情報を補足することができるかもしれない。また、現在、迅速 QMSP 法は、検体の採取からデータ解析まで必要な時間は 3 時間未満となっており、術中に追加治療の必要性を判断することができるようになるかもしれない。

【結論】

食道扁平上皮癌において、*PAX5* 遺伝子のメチル化は、頻繁かつ腫瘍特異的に観察され、*PAX5* の発現低下と関連することが明らかとなった。

また、*PAX5* 遺伝子が抑制されると、細胞の増殖能とシスプラチンの耐性能を上昇させ、RFS 及び OS を悪化させると考えられた。

以上より、*PAX5* 遺伝子のメチル化は、食道扁平上皮癌の患者の予後を予測する因子として有用となり得る。