

表 題 食道扁平上皮癌における抗癌剤抵抗性の克服

論文の区分 博士課程

著 者 名 宇井 崇

担当指導教員氏名 安田 是和 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療系
消化器疾患学
消化器外科学

2014年1月10日申請の学位論文

目次

はじめに.....	4
食道癌について	4
食道癌の標準治療.....	5
治療成績	6
当院における術前化学療法の成績(参考論文について)	7
食道癌で用いられる抗癌剤	9
抗癌剤で誘導されるアポトーシスのメカニズム.....	10
XIAP の制御	10
タンパク質の恒常性.....	11
Heat shock protein 90 について	12
マイクロアレイデータを用いた薬剤耐性遺伝子の探索	12
研究の目的	13
方法	14
細胞株と培地	14
阻害剤	14
抗体	14
薬剤感受性試験	15
遺伝子発現解析	15

Combination Index (CI).....	15
経時変化アッセイ.....	16
タイムラプス撮影.....	16
ウエスタンブロット.....	17
RNA 干渉.....	17
統計学的解析.....	18
結果.....	19
3 薬剤の感受性試験.....	19
3 薬剤の IC ₅₀ に基づいたクラスター解析.....	21
低感受性株群と高感受性株群における遺伝子発現解析.....	22
プロテアソーム阻害の相乗効果.....	23
HSP90 阻害剤(17-AAG)と CDDP の相乗効果.....	23
CDDP と 17-AAG 併用による経時的細胞障害.....	26
タイムラプス撮影.....	26
タンパク質発現経時変化.....	27
phosphorylated Akt、XIAP の発現低下とアポトーシス誘導.....	28
phosphorylated Akt、XIAP の経時変化.....	30
KYSE30、KYSE150 における Akt/XIAP パスウェイ.....	31
siRNA による XIAP 阻害効果.....	32
考察.....	34

結論	37
おわりに.....	38
補足	38
謝辞	41
引用文献.....	42

はじめに

食道癌について

食道癌は消化管における最も悪性度の高い癌の一つである。国際的には、2008年の全世界の疫学調査にて発病率は全癌疾患の3.8%であり、死亡数は全癌疾患の5.4%であった[1]。食道癌の発生は男女ともに東アジアに多い。欧米では下部食道腺癌(バレット食道腺癌)が急速に増加し、米国では腺癌が68%を占めている[2]。

本邦では、2004年の推計によると男性が24.4人(人口10万人対)、女性が4.0人(人口10万人対)であった[3]。2012年の我が国における食道癌の死亡率は全悪性新生物の約3.2%を占め、男性死亡者数は9724人、女性死亡者数は1868人であった[4]。年齢は60代、70代に好発し、全体の年代の68%を占める[5]。胸部中部食道癌が最も多く55%、次いで胸部下部食道癌が26.4%である。組織型は日本人では扁平上皮癌が88.7%を占め、腺癌は2.9%であり、欧米とは腫瘍の性質が異なっている。重複癌は同時・異時を含めて約18%に認められると報告されている[6]。同時性重複癌は胃癌(3.5%)・咽頭癌(1.8%)の順で多い。

食道扁平上皮癌の主要なリスクファクターとして飲酒や喫煙があげられる[7-9]。アセトアルデヒドの腫瘍代謝酵素であるALDH2は東アジアでは遺伝子多型で活性が欠損するALDH2*2 alleleが存在しており、日本人では約10%がホモ欠損型で、30~40%がヘテロ欠損型である。ALDH2ヘテロ欠損型の飲酒家は食道癌リスクが高く[10]、頭頸部表在癌の合併も多い[11]。

食道扁平上皮癌は、形態学的に、低異型度上皮内腫瘍から高異型度上皮内腫瘍の段階を経て進行癌へと進行する[12]。遺伝子レベルでは、p53遺伝子変異、cyclin D1の遺伝子増幅などにより細胞周期の制御機構が破綻し、EGFRやc-MYC等の癌遺伝子が活性化され癌化する。また、予後不良因子

としては、E-cadherinの発現低下、VEGFの発現亢進などが報告されている[13]。

食道癌の標準治療

食道癌の治療は手術、化学療法、放射線療法やそれらを組み合わせた集学的治療法が行われている。本邦では日本食道学会より治療ガイドラインが示され、これに基づいて診療が行われている[6]。

表在癌の治療

リンパ節転移および脈管侵襲が極めて希な深達度T1a-EP (M1)ないしLPM(M2)までは内視鏡切除が広く行われている。Endoscopic mucosal resection (EMR)が広く行われていたが、近年、endoscopic submucosal dissection (ESD)の技術が安定し、EMRに代わって広く行われるようになってきた[14, 15]。ESDはより広範囲の粘膜を一括切除可能となったが、3/4周以上を行う際は癒痕狭窄の発生が予想される。prednisoloneの経口投与が狭窄予防に有効と報告されて適応が広がりつつある[16]。T1a-MM (M3)/SM1ではリンパ節転移率は10～15%と上昇するが侵襲が少ないため、相対的適応として内視鏡切除を行うこともある。一方、sm浸潤が疑われる症例ではリンパ節転移の頻度が高く、手術療法または化学療法、放射線療法が行われるようになってきた。

切除可能胸部進行癌の治療

食道癌はリンパ節転移を来しやすい。粘膜筋板に達したものでは9.3%にリンパ節転移がみられ、粘膜下組織に深く浸潤したものでは50%程度の転移率である[17]。そのため、切除可能胸部食道癌において、3領域郭清を伴う手術療法が基本である[18]。しかし5年生存率はリンパ節転移無しで68%、リンパ節転移症例では24.8%と報告され[19]、治療成績の向上を目指して化学療法の併用が進んできた。

手術の前後に行う化学療法を比較したJCOG9907試験の成績から、現在は多くの主だった施設で術前cisplatin (CDDP) / 5fluorouracil (5-FU) 療法(術前CF療法)後の手術が実施されている[20]。しかしその治療成績は未だ満足できるレベルではなく、より有効性の高い治療法の登場が要求されており、より強力な術前化学療法や、放射線を加えた術前化学放射線療法など、様々な臨床研究が盛んに行われている[21]。

一方で、手術を行わない根治化学放射線療法も検討されたが治療成績の向上が得られず晩期合併症のリスクのため現在は標準治療とはされていない[22]。

頸部食道癌の治療

頸部食道癌は進行癌の頻度が高く、リンパ節転移率が高いがリンパ節転移は頸部に限局することが多く根治手術の適応も多い。近年は喉頭摘出を回避する目的で根治化学放射線療法を行い機能温存が行われている[23]。

切除不能進行癌の治療

切除不能進行癌は化学療法・放射線療法の適応である。広くはCF療法が行われているが生存期間延長のエビデンスが明確ではなく、姑息的な治療としての位置づけである。様々な併用療法などが報告されているが未だ標準治療となるものはなく、臨床試験が行われている。

治療成績

標準治療を基本とする集学的治療が行われているが、日本での全進行度の食道癌治療成績は、手術、化学療法単独、放射線療法単独、化学放射線療法における5年生存率で、それぞれ50.2%、 8.6%、 15.5%、 26.4%と報告されている[5]。

進行度別治療成績として、1999年から2009年までの自治医科大学付属病院における治療成績は、3年生存率で、Stage 0 = 86%, Stage I = 91%, Stage II = 79%, Stage III = 56%, Stage IV = 11%と報告されている[24]。

これらの治療成績は未だ満足できるものではなく、更なる治療成績の改善が求められる[5, 25-27]。

治療成績の向上を目的として、化学療法を更に強力にする方法が挙げられる。頭頸部癌[28, 29]および進行胃癌[30]では従来の2剤によるCF療法とこれにdocetaxelを加えた3剤によるdocetaxel/CDDP/5-FU(DCF)療法の比較試験が行われ、DCF療法の優越性が報告されている。この強力な化学療法は、食道癌にも応用されてきている。欧米では食道腺癌および食道胃接合部腺癌に対し術前および術後化学療法としてDCF療法を行うことで治療成績の改善を得ることが報告されている[31, 32]。

当院における術前化学療法の成績(参考論文について)

これらの報告を基に自治医科大学付属病院では、切除可能胸部進行食道癌(Stage II/III)に対し従来の術前CF療法に代え、多施設共同臨床試験の登録症例として術前DCF療法を行い[33]、後に一般臨床でも術前DCF療法を広く導入した。私は2007年4月から2011年9月までに自治医科大学付属病院で施行した術前CF療法38例と術前DCF療法38例を比較検討し報告した(参考論文として提示した) [34]。患者背景に差は無かった(補足表1; 文末に添付)。Grade 3およびGrade 4の血液毒性は術前DCF療法で有意に多かった(補足表2、術前DCF群87%、術前CF群13%、 $P < 0.001$)。根治切除は術前DCF群で79%、術前CF群で66%であり差は無かった($P = 0.305$)。在院死亡はなく、周術期合併症も差が無かった。術前CF療法の短期成績は総合評価で奏効例(CR + PR)が24%だったが術前DCF療法は63%と有意にDCFが優れていた($P = 0.001$)。また組織学的評価でも著効例(Grade 3 + Grade 2)で術前CF療法5%に対し術前DCF療法63%と有意に術前DCF療法が優れていた(補

足表3、 $P < 0.001$)。長期成績の比較では無増悪生存期間(hazard ratio, 0.462; 95% confidence interval (CI), 0.253 to 0.844; $p = 0.010$, log-rank test) および全生存期間(hazard ratio, 0.344; 95% CI, 0.175 to 0.676; $p = 0.001$, log-rank test)において術前DCF療法は術前CF療法より良好な成績を得ることができた(図1)。

しかしながら、術前DCF療法でも治療抵抗症例(総合評価SD + PD 37%や病理評価Grade1 + Grade0または切除不能例37%)が存在しており、治療成績の改善には治療抵抗症例の成績向上が必要になると考えられる。

このため、薬剤耐性の獲得のメカニズムの解明が重要であり、その耐性の克服が治療成績の向上には不可欠である。

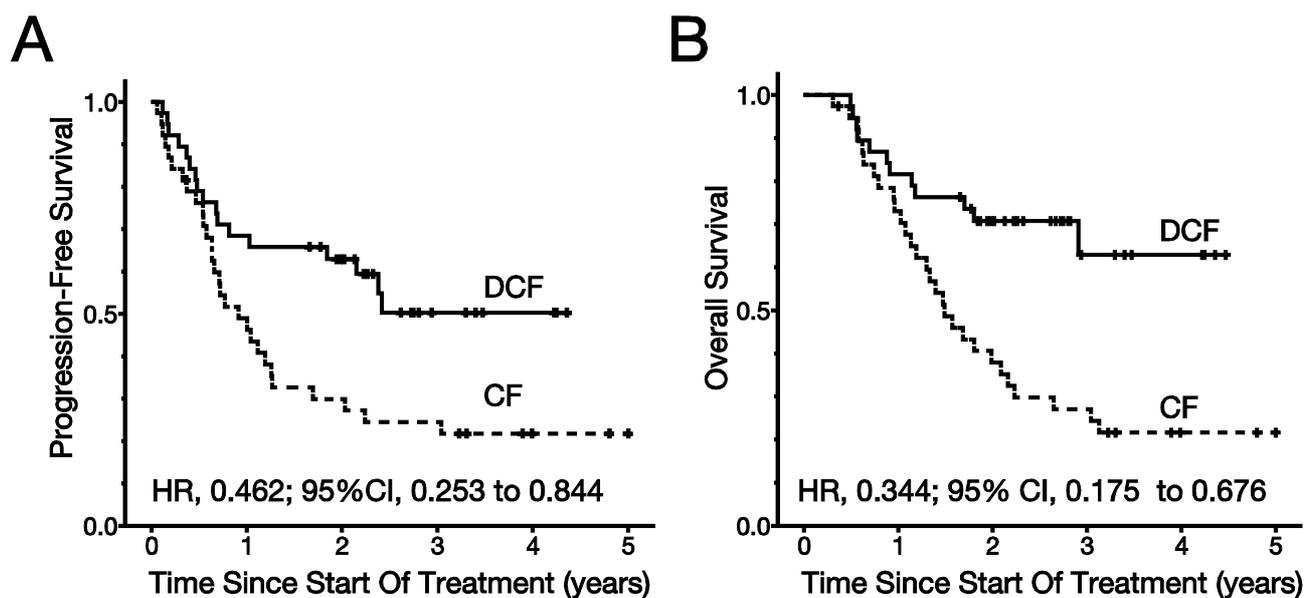


図1 当院における術前CF療法と術前DCF療法の比較。

(A) 無増悪生存期間、(B) 全生存期間

食道癌で用いられる抗癌剤

食道癌の化学療法には、ピリミジン系・白金系[35]・タキサン系抗癌剤が用いられている[6]。

フルオロウラシル系抗癌剤は腫瘍で取り込みが亢進しているウラシル[36]にフッ素が導入された薬剤である。作用機序は、腫瘍細胞に取り込まれた後に、ウラシルと競合的にチミジル酸合成酵素に取り込まれ、その合成を阻害する[37]。また、RNAのなかに入り込んでRNA合成を抑える働きもある。食道癌では5-FUが広く使われる。5-FUは体内で速やかに分解され抗腫瘍活性が落ちるため持続投与が行われる。

白金系抗癌剤としてCDDPがある。CDDPの作用機序としては、DNAのプリン塩基(グアニンとアデニン)と結合することで細胞周期を停止させたり、HMG1やHMG2などの核タンパク質に結合してアポトーシスを誘導することで細胞毒性効果を示す[38]。これらの機序にはAkt/XIAPのみならずNF κ Bやp53, JNK pathwayが指摘されている[39]。一方でCDDPの耐性獲得機序には、(1) CDDPの細胞への取り込み・排出による抵抗性(Mechanisms of pre-target resistance)、(2) DNAへの結合阻害による抵抗性(Mechanisms of on-targeting resistance)、(3) シグナル伝達など細胞死を誘導する経路に関する抵抗性(Mechanisms of post-target resistance)、(4) CDDPの作用と明らかな関連が指摘できない抵抗性(Mechanisms of off-target resistance)の4に分類できる[40]。

タキサン系抗癌剤の作用機序は、 β チューブリンのGDP部位に結合し脱重合を阻害することにより、重合を促進し微小管の安定化を図る[41]。さらに微小管動態を下げ、異常な紡錘糸を形成し、分裂停止からアポトーシスを導く。その他、直接caspase 3を活性化してアポトーシスを導く[42]。タキサン系の耐性機序として、ATP-binding cassette (ABC)スーパーファミリーに属するP糖タンパク質(MDR-1 / ABCB1)の過剰発現による細胞内薬剤濃度変化が挙げられる[43]。その他、チューブリンの変異[44]、p53, bcl-2, bcl-x

などアポトーシス系の異常が指摘されている。食道癌ではdocetaxelが広く使われる。

抗癌剤で誘導されるアポトーシスのメカニズム

抗癌剤はアポトーシスを誘導して細胞毒性を生じ、アポトーシスの異常が薬剤耐性・治療不応を引き起こす[45]。アポトーシスには大きく2つの経路が存在する。一つは外因系として、デスレセプターを介してシグナルが細胞内に伝達し、アポトーシスを誘導する。もう一つは内因系として、Bcl-2 familyを介してミトコンドリアによりシトクロムcがリリースされアポトーシスが誘導される経路である。caspaseはこの2つのアポトーシスの経路の中心となる。また、両経路にはクロスオーバーがある。

このほか、アポトーシスを抑制する因子としてアポトーシス抑制タンパク質(inhibitor of apoptosis protein (IAP) family)がある。IAP familyの一つであるXIAPは直接的にcaspase-9およびそのeffectorのcaspase-3, -7の活性を抑制することでアポトーシスを抑制している[46]。

XIAP の制御

AktはXIAPのリン酸化を行い、XIAPの安定化に関与している[47]。XIAPの上昇はCDDPに誘導されるcaspase-3の活性化を低下させる[48]。XIAPとAktの活性化を阻害することは抗癌剤耐性の克服に重要な役割になる可能性がある。

タンパク質の恒常性

細胞内タンパク質は様々なストレスで構造が変化・変性することが知られており、癌に対する治療としても注目されてきた。タンパク質はribosomeにおいてmRNAを鋳型として翻訳され合成される[49]。合成されたタンパク質は小胞体内でフォールディングされ、様々な修飾を受けて機能タンパク質となる(図2)。タンパク質はストレスなどにより不良タンパク質となると分子シャペロン(HSP90など)によりリフォールディングされ、機能タンパク質に戻るが、リフォールディングされない不良タンパク質はプロテアソームやリソソームにより分解される[50]。不良タンパク質が蓄積・凝集化すると機能低下や細胞死を来したり、コンフォメーション病(パーキンソン病やアルツハイマー病など)が引き起こされる[51]。

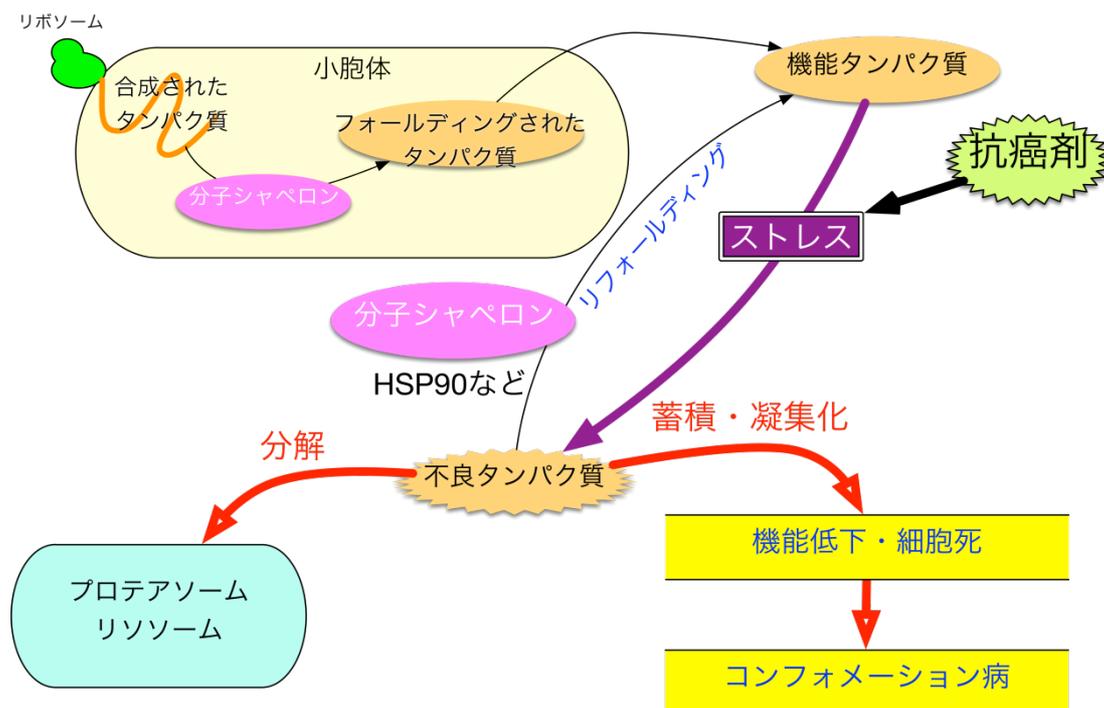


図2 タンパク質代謝の模式図。細胞内では様々なストレスにより不良タンパク質が作られるため、分子シャペロン(HSP90など)により機能タンパク質に安定化するか、分解を受ける。

Heat shock protein 90 について

分子シャペロンタンパク質群はクライアントタンパク質がストレスやダメージを受けた際に分子構造を安定化させる機能を持つ[52]。Heat shock protein 90 (HSP90)は200以上のタンパク質の安定性および活性に関与する分子シャペロンである(図3)。そのクライアントタンパク質にはセリン・スレオニンキナーゼ(Akt, Raf-1, Cdk4)や転写因子、HIF-1 α やp53、受容体キナーゼ (HER2, EGFR, Srcファミリーキナーゼ)、ストレスホルモン受容体が含まれる[53]。このクライアントタンパク質は、腫瘍の増殖・生存に大きく関わっており、HSP90阻害剤は、これらクライアントタンパク質の機能を阻害することで種々の癌細胞に対する抗腫瘍活性を示す[54, 55]。

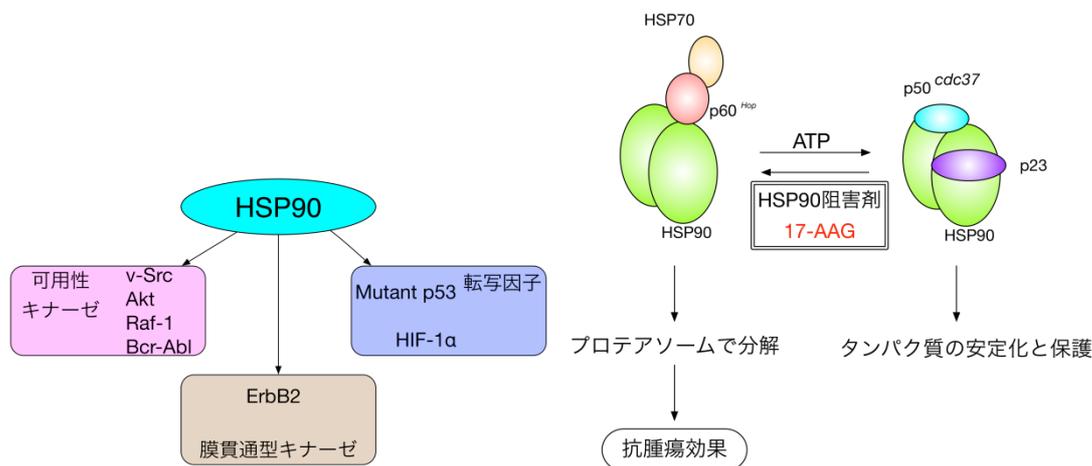


図3 HSP90はたくさんのクライアントシャペロンを持つ。HSP90はATP依存性にクライアントタンパク質を安定化する。Neckersら著より一部改変[52]

マイクロアレイデータを用いた薬剤耐性遺伝子の探索

抗癌剤耐性を克服するにはマイクロアレイ解析を用いた網羅的遺伝子探索を行うことが有効である[56]。マイクロアレイ実験データから遺伝子リストの作成には様々な方法が報告されている。広く用いられている方法の一つは、先ず、t検定、ANOVA等で遺伝子の発現差の有意度を計算し、false discovery rate (FDR)法で確率閾値を設定し有意差のあった遺伝子リス

トを作成する。次にこの遺伝子リストをgene ontologyや既知のパスウェイに照らし合わせて多くの遺伝子が何の機能に関係が深いかを二項分布や超幾何分布などを用いて調べるものである。この方法の問題点として閾値 p は主観で決められるため、 p によって検出する遺伝子リストが変化してしまう。

そこで、閾値 p による遺伝子リストは作成せず、全遺伝子リストを用いて有意差のより高い物に、ある機能に関連した遺伝子群が含まれているかを判断するGene Set Enrichment Analysis (GSEA)が注目されてきた[57]。GSEAは入力された遺伝子をサンプル間の発現の差で並べ替えることで遺伝子セットの優位性を検定する。ある遺伝子セットに注目したとき、全体の順番がほぼ保たれているのか、順位が上位(または下位)に偏った遺伝子が多く含まれているのかを検定する。これにより機能遺伝子セットを効率よく検出可能となる。

研究の目的

これまでに示したように食道癌の治療は集学的治療が行われており、より強力な治療を組み合わせることで治療成績の向上が得られるようになってきた。しかしながらこれらの強力な治療でも治療無効例が存在している。治療無効症例では化学療法薬剤耐性獲得が問題となっており、薬剤耐性の克服は癌治療におけるブレイクスルーになると期待される。

本研究では、食道扁平上皮癌細胞株を用いて、薬剤耐性癌細胞株に特徴的な遺伝子発現を網羅的に解析することで、従来まで用いられていない分子標的治療のターゲットを発見し、さらに既存薬剤との併用により食道扁平上皮癌の新たな治療戦略への応用を目指した。

方法

細胞株と培地

食道扁平上皮癌細胞株 TE1, TE4, TE5, TE6, TE8, TE9, TE10, TE11, TE14, TE15, EC-GI-10を理化学研究所バイオリソースセンター(Saitama, Japan)より購入した。KYSE30, KYSE70, KYSE140, KYSE150, KYSE170, KYSE180, KYSE220, KYSE270, TT, TTnをヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク(Tokyo, Japan)より購入した。これら食道扁平上皮癌細胞株に関しては癌のheterogeneityを考慮し、セルバンクより購入可能な全ての細胞株を取得した。全ての食道扁平上皮癌細胞株は37°C、5% CO₂の環境下で培養した。培地はRPMI-1640 (R8758; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)に10%牛胎児血清(Fetal Bovine Serum: FBS)と抗生物質penicillin (100 U/ml)とstreptomycin (100 µg/ml)を添付した。

阻害剤

CDDPと17-AAGはSigma-Aldrichより購入した。CDDPは0.9%食塩水で溶解した。17-AAGはdimethyl sulfoxide (DMSO)で溶解した。docetaxelと5-FUは、和光純薬工業株式会社(Osaka, Japan)から購入し、DMSOで溶解した。BortezomibはLKT laboratories (St. Paul, MN, USA), MG-132はEnzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY, USA)から、MK-2206はSelleck Chemicals (Houston, TX, USA)から購入した。それぞれDMSOで溶解した。溶解後、全ての薬剤は-20°Cで保存した。

抗体

caspase-3 (#9662), PARP (#9542), XIAP(3B6) (#2045), c-IAP1 (#4952), c-IAP2(58C7) (#3130), livin (D61D1) XP (#5471), survivin (71G4B7) (#2808), phospho-Akt (Ser473) (D9E) (#4060), Akt (#9272), phospho-p44/42 MAPK

(Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101), p44/p22 MAPK (Erk1/2) (#9102)に対する抗体はCell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA)から購入した。抗 β -actin抗体はSigma-Aldrichから購入した。Bcl-2 (#610391), Bcl-xL (#60982), Bid (#61158), Bad (#610391), Bax (#610982), Beclin (#612112), BAG-1 (#611868)はBD Biosciences (San Jose, CA, USA)から購入した。

薬剤感受性試験

阻害剤の感受性試験は96wellプレートを用いて行った。10% FBS添付したRPMIを培地とし、2000から4000の細胞を各条件につき5ウェルずつ播種した。24時間後に濃度調節した薬剤を添付した培養液と交換し、72時間培養した。生細胞はwater-soluble tetrazolium salt (WST-8, cell counting kit-8; Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いて、マイクロプレート吸光度計(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を使い450nmで測定した。

遺伝子発現解析

22の食道癌細胞株よりRNAを抽出し、東京大学・先端科学技術研究センターゲノムサイエンス部門に依頼し、22の食道扁平上皮癌細胞株について遺伝子発現情報を取得した。遺伝子発現解析にはoligonucleotide microarray (GeneChip Human Genome U133A, Affymetrix, Santa Clara, CA)を使用し、Genome Imbalance Map algorithmにてmRNA解析した[58, 59]。2群間のmRNAの発現様式をGene Set Enrichment Analysis (GSEA, <http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)を用いて遺伝子セット解析を行った[60, 61]。

Combination Index (CI)

IC₅₀はCompuSyn software (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA)を用いて計算した。併用効果の定量的解析のため併用係数(combination index: CI)は下記の式を用いて計算した[62]。

$$CI = \frac{D_1}{Dx_1} + \frac{D_2}{Dx_2} + \alpha \left(\frac{D_1 \times D_2}{Dx_1 \times Dx_2} \right)$$

それぞれの変数は以下の通りである。

D_{x1} = 薬剤1単剤で細胞を50%抑制する薬剤1の濃度

D_1 = 混合薬剤で細胞を50%抑制する薬剤1の濃度

D_{x2} = 薬剤2単剤で細胞を50%抑制する薬剤2の濃度

D_2 = 混合薬剤で細胞を50%抑制する薬剤2の濃度

ここで、併用する2つの薬剤の作用点や作用機序が異なる場合(mutually nonexclusive mode)は $\alpha=1$ 、作用を競合する場合(mutually nonexclusive mode)は $\alpha=0$ とする。

経時変化アッセイ

96wellプレートに同数の細胞を播種し、WST-8 cell counting kit-8を用いて0時間、24時間、48時間、72時間の経時細胞数変化を観察した。結果は0時間の吸光度に対するpercentageで示した。

タイムラプス撮影

癌細胞を35mm/Glass base disk (Iwaki, Japan) に播種し、24時間後にCDDP (1 μ M)、17-AAG(1 μ M)をそれらの混合薬剤を添付した。コントロールにはDMSO を終濃度0.1%で添加した。癌細胞の増殖や細胞死の過程をBio Station(Nikon, Tokyo, Japan)により96時間撮影、観察した。アポトーシスを確認するため、それぞれの培養液には3 μ MのCellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent For Apoptosis (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を添付した。

ウェスタンブロット

KYSE30とKYSE150は100mmプレートに播種し、24時間後にCDDPまたは17-AAGを添加した。それに引き続いて24時間、48時間、72時間培養した。プレートに接着した細胞と浮遊細胞を収拾し、20 mmol/LのTris-HCl(PH7.4), 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaF, 1 mmol Na₃VO₄に各種プロテアーゼを含むRIPA bufferで溶解した。セルスクレーパーにて掻き取った後、15000rpm、4℃ 10分間遠心して上清を分取した。タンパク質濃度はBCA Protein Assay kit(Takara Bio, Inc., Shiga, Japan)にて測定した。タンパク質はウェルあたり12μgに調節し、Mini-Protean TGX Precast Gel (Bio-Rad Laboratories)で電気泳動し、nitrocellulose membraneに転写した。membraneを5% skim milkの入ったTBS(Tris-buffer saline)に浸し室温で30分振盪し、抗体の非特異的結合をブロックした。0.1%Tweenを含んだTBSでMembraneを洗浄した後に、1次抗体と4℃でovernightで反応させた。再度0.1%Tweenを含んだTBSでmembraneを洗浄し、その後に2次抗体と30℃で1時間反応させた。抗原の検出には western blot detection reagents (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)を使用し、発光シグナルの同定と解析はChemiDoc XRS image analysis system (Bio-Rad Laboratories)を用いて行った。

RNA 干渉

XIAPに対するsiRNA(siGENOME Human XIAP (331) siRNA-SMARTpool)をThermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)より購入した。Negative Controlはnegative control siRNA duplexes (1027281) (Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いた。Lipofectamine RNAiMAX Reagent(Life Technologies)とOPTI-MEM I (Invitrogen, Carlsbad, CA USA)を用いて製造元の指示に従いトランスフェクションした。3cm dishにKYSE30およびKYSE150を播種し、24時間後に5nMから20nMの終濃度のsiRNAでトランスフェクションを行った。トランスフェクションから24時間後に培養液を交

換した。トランスフェクションから72時間後にWestern blotでXIAPの抑制効果を確認した。

次に96wellプレートにKYSE30およびKYSE150を4000播種し、24時間後に5nM siRNA XIAPをトランスフェクションした。トランスフェクション後24時間で培養液を交換し、トランスフェクションから72時間後にWST-8 cell counting kit-8を用いて細胞数を測定した。

Target Sequenceを以下に示す:

GAGGAGGGCUAACUGAUUG

GAGGAACCCUGCCAUGUAU

GCACGGAUCUUUACUUUUG

GAACUGGGCAGGUUGUAGA

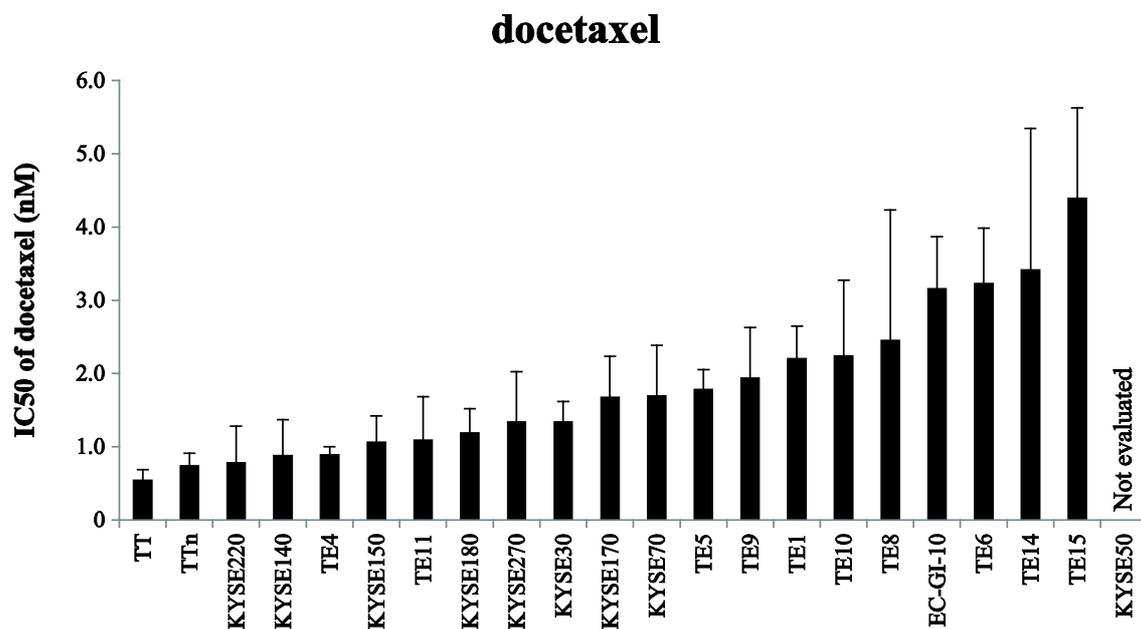
統計学的解析

統計処理はIBM SPSS Statistics for Windows, version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)およびJMP Ver.10.0.2 (SAS institute, Cary, NC, USA)を用いて行った。P値が0.05未満を統計学的有意差ありとした。Dunnett's testをtime-dependent cell growth assayに用いた。2群間の比較にはStudent's t testを用いた。クラスター分析はWard法を用いた。統計値は平均±標準偏差を示す。

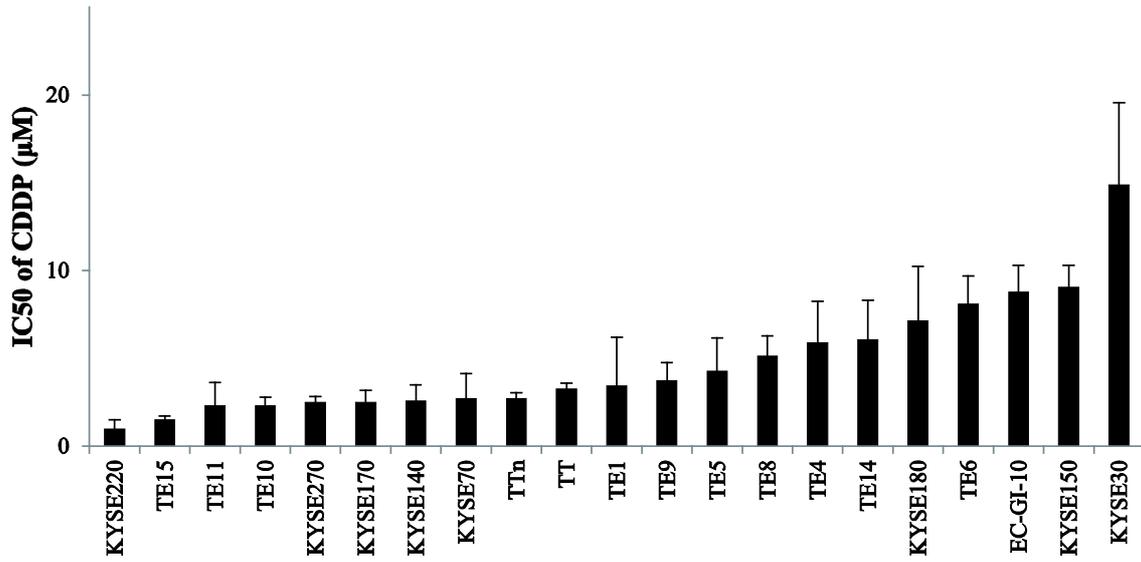
結果

3 薬剤の感受性試験

はじめに食道扁平上皮癌細胞株の docetaxel, CDDP, 5-FU の感受性試験を行った。細胞株をそれぞれの薬剤単剤について濃度勾配を付けて培養し、72時間後に細胞数を測定して IC_{50} を算出した。その結果を図4に示した。docetaxel の IC_{50} は 0.547 nM から 4.39 nM、CDDP の IC_{50} は 0.983 μ M から 14.9 μ M、5-FU の IC_{50} は 2.10 μ M から 42.4 μ M だった。



CDDP



5-FU

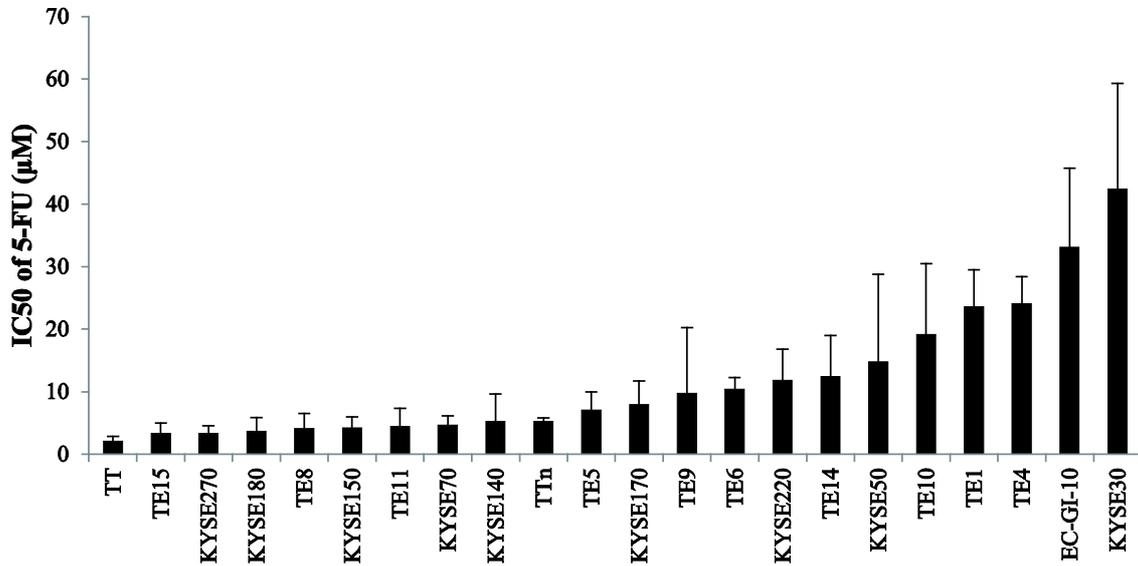


図4 docetaxel, CDDP, 5-FUのIC50。96wellプレートに細胞を播種後24時間後に阻害剤を添付した。72時間後に細胞数を測定し、IC50を算出した。

3 薬剤の IC₅₀ に基づいたクラスター解析

3剤への耐性株の決定を目的として、docetaxel, CDDP, 5-FUのIC₅₀の対数をクラスター解析した。結果を図5に示す。この結果から、3薬剤の低感受性群(耐性株群)をTE4, KYSE30, EC-GI-10, TE6, TE14の5株とし、高感受性群をTT, TTN, KYSE140, TE11, KYSE270, KYSE220, KYSE150, KYSE180の8株とした。

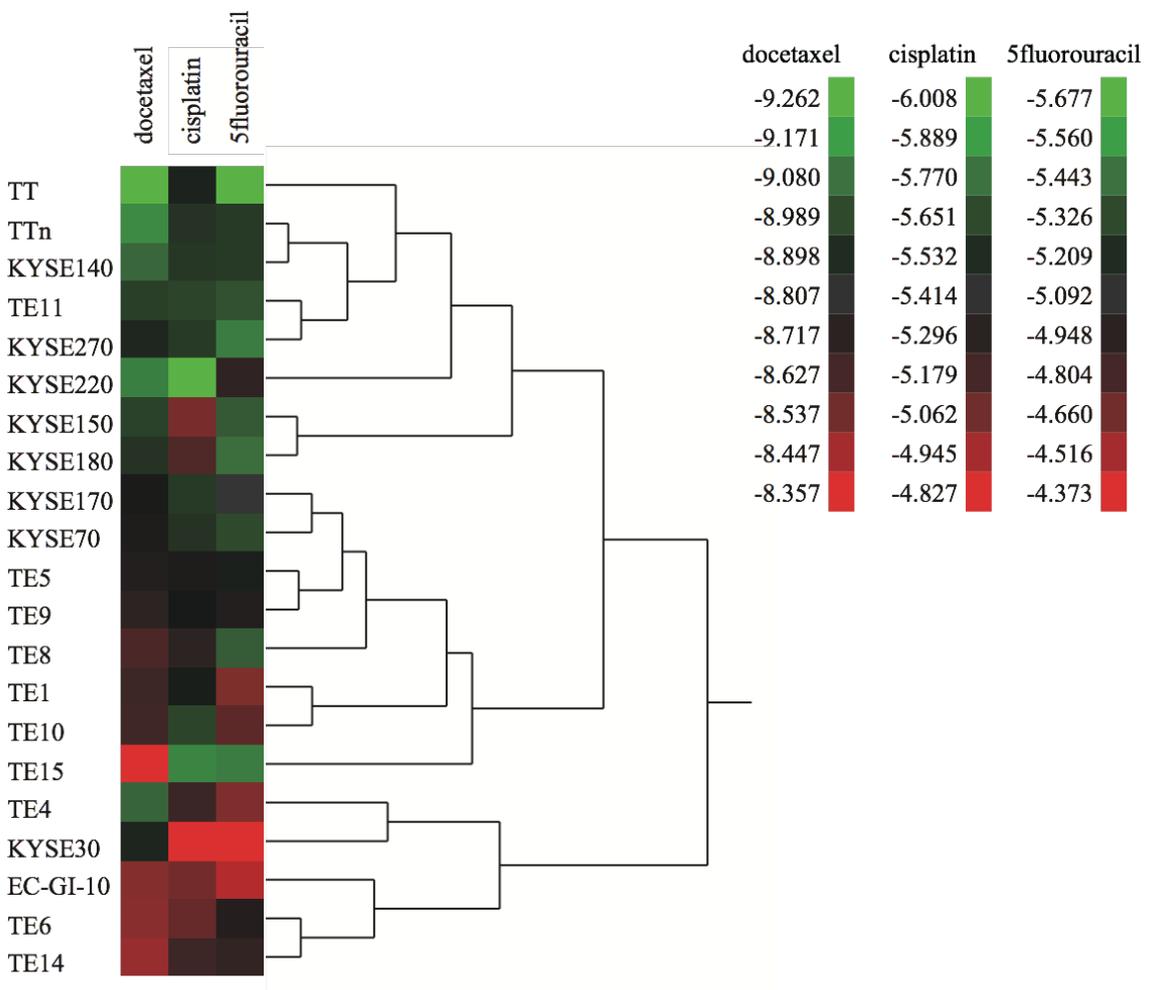


図5 クラスター解析

docetaxel, CDDP, 5-FUのIC₅₀の対数を取り、クラスター解析を行った。3薬剤の低感受性株5株と高感受性株8株を決定した。

低感受性株群と高感受性株群における遺伝子発現解析

抗癌剤耐性株における特異的な遺伝子発現を検出するため、低感受性株群5株と高感受性株群8株でGSEAを用いて網羅的に遺伝子セット解析を行った。この結果、false discovery rate (FDR) < 25%とすると、低感受性群で高発現の遺伝子セットとして、KEGG_RIBOSOME, KEGG_PROTEASOME, KEGG_LINOLEIC_ACID_METABOLISM, KEGG_PARKINSON_DISEASEを得た(表1)。一方、高感受性群で高発現の遺伝子セットとしてはFDR 25%未満の遺伝子セットは認めなかった。

このことからタンパク質の代謝に関する遺伝子群の関与が考えられた。

表1 低感受性株群(5株)と高感受性株群(8株)における遺伝子発現解析
低感受性株が高感受性株に対して発現が多い遺伝子群

GS DETAIL	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
KEGG_RIBOSOME	0.46	1.93	0.000	0.032
KEGG_PROTEASOME	0.51	1.92	0.002	0.017
KEGG_LINOLEIC_ACID_METABOLISM	0.52	1.71	0.005	0.101
KEGG_PARKINSON_DISEASE	0.36	1.63	0.003	0.161

GS, gene set. ES, enrichment score. NES, normalized enrichment score, NOM p-val, normalized p value. FDR q-val, false discovery rate q value.

プロテアソーム阻害の相乗効果

まず、プロテアソーム阻害剤であるBortezomib, MG-132を用いて抗癌剤との相互作用を検討した。BortezomibおよびMG-132とdocetaxel, CDDP, 5-FUそれぞれの2剤の併用による相乗効果を薬剤感受性試験およびcombination indexを用いて検討したが、薬剤の相乗効果は殆ど認められなかった(データ提示せず)。

HSP90 阻害剤(17-AAG)と CDDP の相乗効果

ストレス下のタンパク質安定性に関与するHSP90に着目した。HSP90阻害剤として17-AAGを用いた。17-AAGのIC₅₀を図6に示す。KYSE30のIC₅₀は2.37±0.52μMであった。KYSE30において低濃度17-AAG存在下(IC₅₀の約1/2の濃度1μM)、約1/4の濃度0.5μM)にdocetaxel, CDDP, 5-FUのIC₅₀の変化について感受性試験を用いて行った。その結果、CDDPでは相乗効果による感受性試験カーブの左方移動を認めた。docetaxel, 5-FUについては殆ど変化がなく、相乗効果は認めないと判断した。

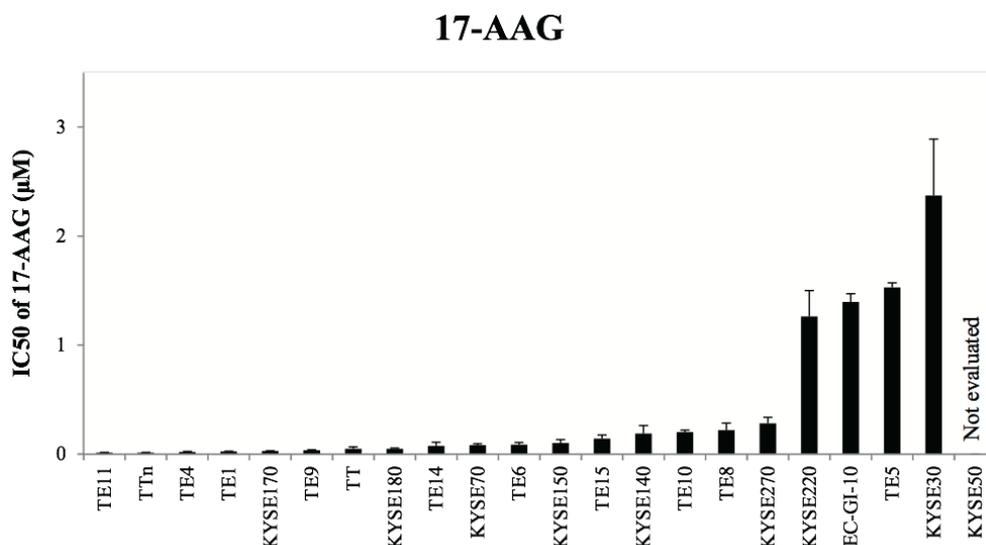


図6 17-AAGに対する食道扁平上皮癌細胞株のIC₅₀

CDDPと17-AAGの併用療法の効果を予測するために、CDDPの低感受性株4株(KYSE30、KYSE150、EG-GI-10、TE6)について、様々な濃度のCDDPと17-AAGを単剤および併用薬剤として添加し感受性試験を行った。図7に示すように、低濃度の17-AAGとの併用療法はCDDPの生存曲線を左方に移動させた。この効果をcombination index (CI)を用いて評価したところ、IC₅₀でKYSE30とKYSE150のCIは0.4から0.7であり、相乗効果を示していた(表2)。対照的にEG-GI-10とTE6ではCIは1.0から1.8であり、相加的から拮抗作用を呈していた。

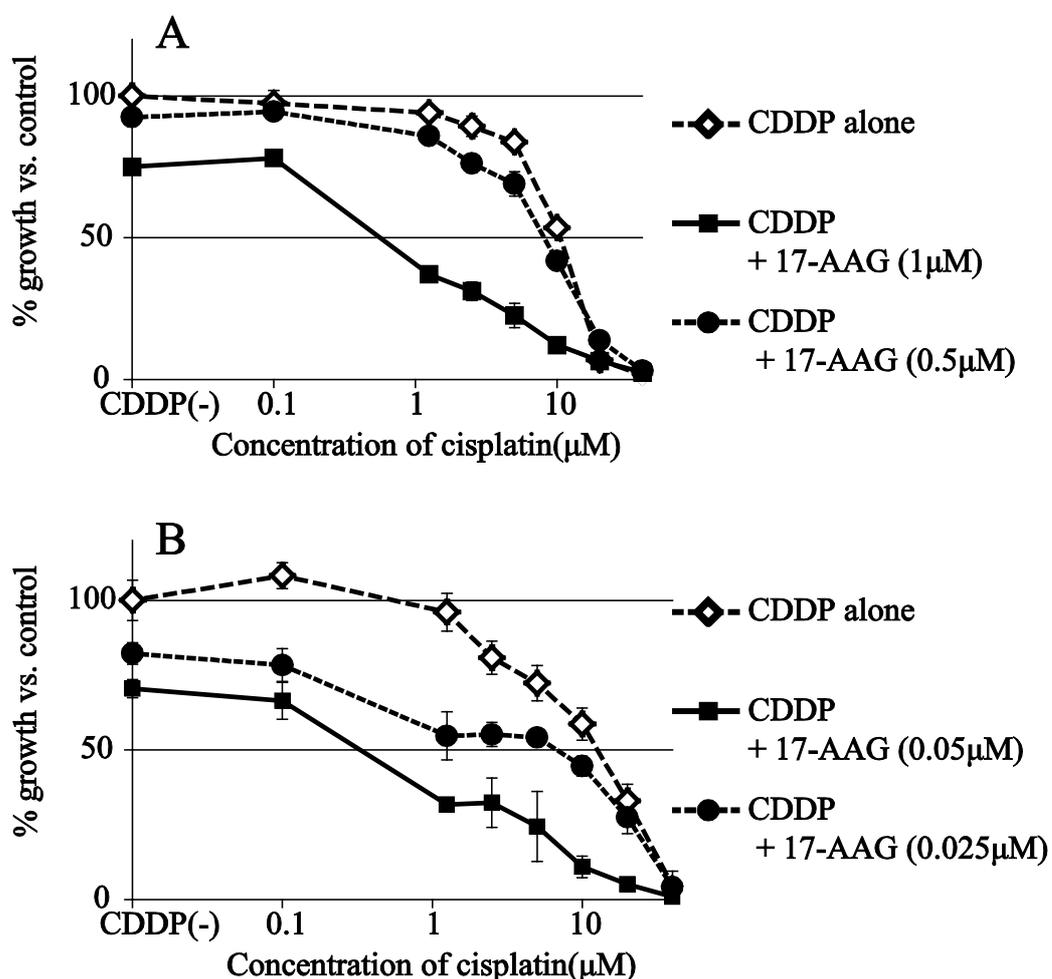


図7 17-AAG (KYSE30では1 μ Mまたは0.5 μ M, KYSE150では0.05 μ Mまたは0.025 μ M)とCDDP (0.1から40 μ M)における72時間後の用量反応曲線。(A) KYSE30, (B) KYSE150。

表2 CDDPと17-AAGにおけるCombination index (CI)

Cell line	IC ₅₀ of 17-AAG (μ M)	Concentration of 17-AAG (μ M)	CI at IC ₅₀	Interpretation
KYSE30	2.37	1.000	0.49	相乗効果
		0.500	0.76	中等度相乗効果
KYSE150	0.10	0.050	0.71	中等度相乗効果
		0.025	0.55	相乗効果
EC-GI-10	1.40	1.000	1.80	拮抗作用
		0.500	1.78	拮抗作用
TE6	0.04	0.050	1.18	中等度拮抗作用
		0.025	1.06	相加効果

17-AAGの異なる濃度における、CDDPのIC₅₀。様々な薬剤濃度において、non-exclusive equationを用いてcombination indexを算出した。CI, combination index. CI > 1.3 拮抗作用, CI = 1.1 to 1.3 中等度拮抗作用, CI = 0.9 to 1.1 相加効果, CI = 0.8 to 0.9 軽度相乗効果, CI = 0.6 to 0.8 中等度相乗効果, CI = 0.4 to 0.6 相乗効果, CI = 0.2 to 0.4 強い相乗効果.

CDDP と 17-AAG 併用による経時的細胞障害

CDDPと17-AAGの相乗効果を確認するため、コントロール(0.1% DMSO)と1 μ M CDDP単剤、1 μ M 17-AAG単剤とそれらの併用を24時間、48時間、72時間で細胞傷害性を評価した(図8)。CDDPと17-AAGの併用は単剤投与に比べ細胞増殖を抑制した。

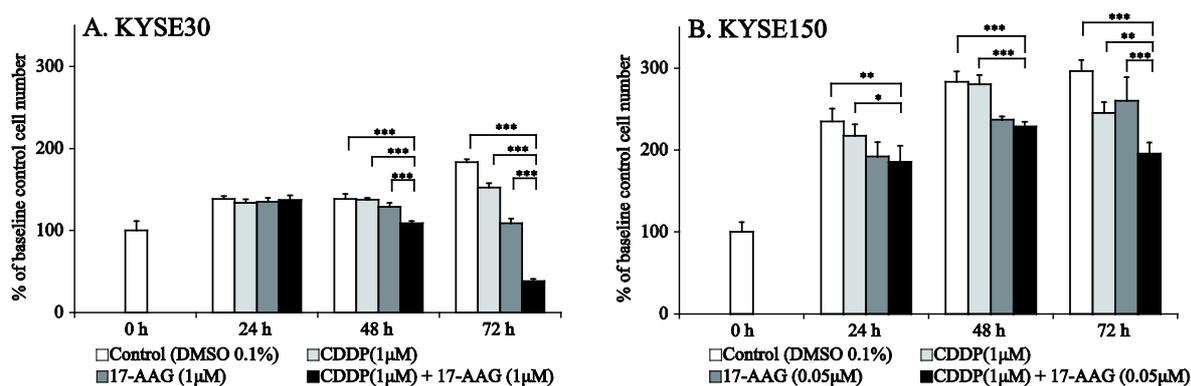


図8 cisplatin(CDDP)と17-AAGの添加による細胞数の変化。(A) KYSE30, (B) KYSE150はCDDP単剤(両細胞とも1 μ M)、17-AAG単剤(KYSE30は1 μ M、KYSE150は0.05 μ M)、CDDPと17-AAGの混合薬剤を添付された後、24時間、48時間、72時間の細胞数を測定した。* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

タイムラプス撮影

KYSE30においてCDDPと17-AAGによる経時的な細胞変化を観察するためタイムラプス撮影を行った(図9)。Control (DMSO 0.1%)においてもわずかにアポトーシスの誘導があるが細胞は良好に増殖した。CDDP単剤および17-AAG単剤ではわずかにアポトーシスの誘導を伴うものの、細胞の増殖を認めた。CDDPと17-AAGの併用では一時的な細胞増殖を認めるが著明なアポトーシスの誘導を認め、細胞数の激減が観察された。このことから、それぞれ単剤では強いアポトーシスを誘導しない濃度でも、CDDPと17-AAGを併用することで強いアポトーシスを誘導することが証明された。

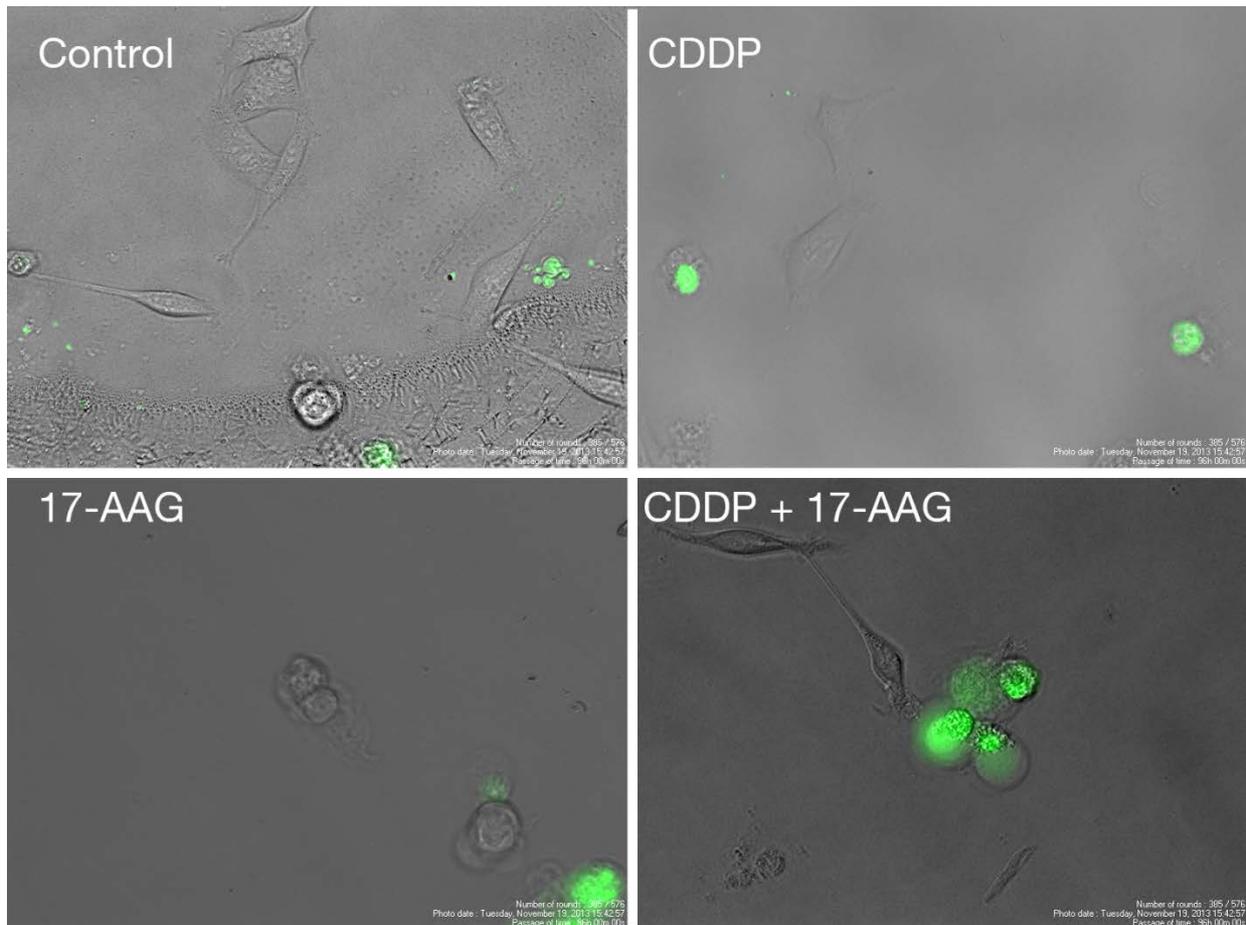


図9 KYSE30での経時細胞変化。3 μ MのCellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent For Apoptosisを添加することでCaspase-3/7を介したアポトーシスが緑色に検出される。薬剤投与後96時間間欠的に観察した。正常細胞でもわずかにアポトーシスを呈するが細胞増殖が盛んである。CDDPと17-AAGを添付するとより強くアポトーシスが誘導された。Control DMSO 0.1%. CDDP 1 μ M. 17-AAG 1 μ M.

タンパク質発現経時変化

CDDPと17-AAGの併用によるタンパク質発現経時変化をウエスタンブロットで解析した(図10)。CDDPと17-AAGの併用がPARPおよびCaspase-3の活性化を介してアポトーシスを誘導することが分かった。PARPとcleaved PARPは24時間後では明らかな変化は認めなかったが、48時間後にCDDPと17-AAGの併用ではcleaved PARPが認められた。cleaved PARPの増加は単

剤投与より大きかった。cleaved PARPは72時間後では更に増強された。cleaved caspase-3はKYSE30において、併用72時間後に観察されたがcleaved PARPと比較すると発現は弱かった。

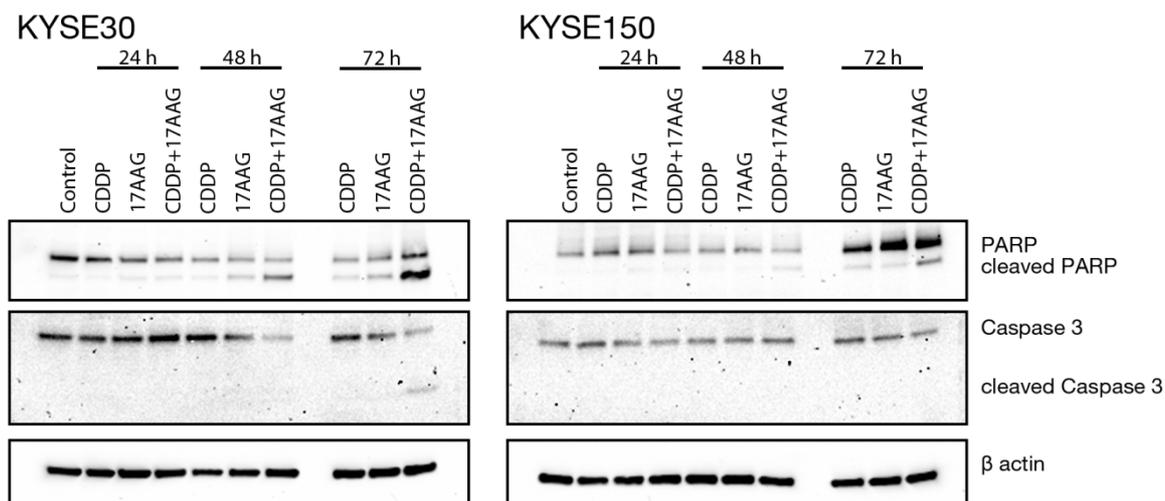


図10 cisplatin (CDDP)および17-AAGの併用によるアポトーシス誘導。KYSE30とKYSE150はcisplatin (CDDP; 1 μ M), 17-AAG (KYSE30 1 μ M, KYSE150 0.05 μ M)と混合薬剤で表記時間処理後、ウエスタンブロットで解析した。

phosphorylated Akt、XIAP の発現低下とアポトーシス誘導

アポトーシスの機序を解明するため、アポトーシスを制御するIAP familyとBcl-2 familyの解析を行った。先ずIAP familyを検討した(図11)。KYSE30は、通常状態でXIAP, cIAP1, survivinは高発現でcIAP2は低発現だった。KYS150ではXIAP, cIAP1は高発現だったが、cIAP2とsurvivinは低発現だった。Livinは両細胞ともに検出出来なかった。CDDP単剤、17-AAG単剤、両剤の併用はcIAP1, cIAP2, survivinの発現を変化させたが、細胞の増殖抑制やアポトーシスとは関連が認められなかった。それらに比較して、XIAPの発現量変化は単剤では不明瞭であったが併用すると明らかに減少し

ていた。Bcl-2ファミリーも検討を行ったが、Bcl-2, Bcl-xL, Bid, Bad, Bax, Bim, Beclin, BAG-1はそれぞれ変化は認められなかった(データ提示せず)。

これらの結果から、CDDPと17-AAGの併用療法はXIAPを阻害することでアポトーシスを誘導する可能性が示された。XIAPの減少の機序を解明するために、Akt, Erkパスウェイを確認した。図11に示すように、phosphorylated AktはCDDP、17-AAGの単剤でも減少していたが、これらを併用することで明瞭に低下していた。Phosphorylated ErkはKYSE30では明らかな変化は認めず、KYSE150では単剤および併用で減少していたが細胞増殖抑制やアポトーシスとの関連は見いだせなかった。

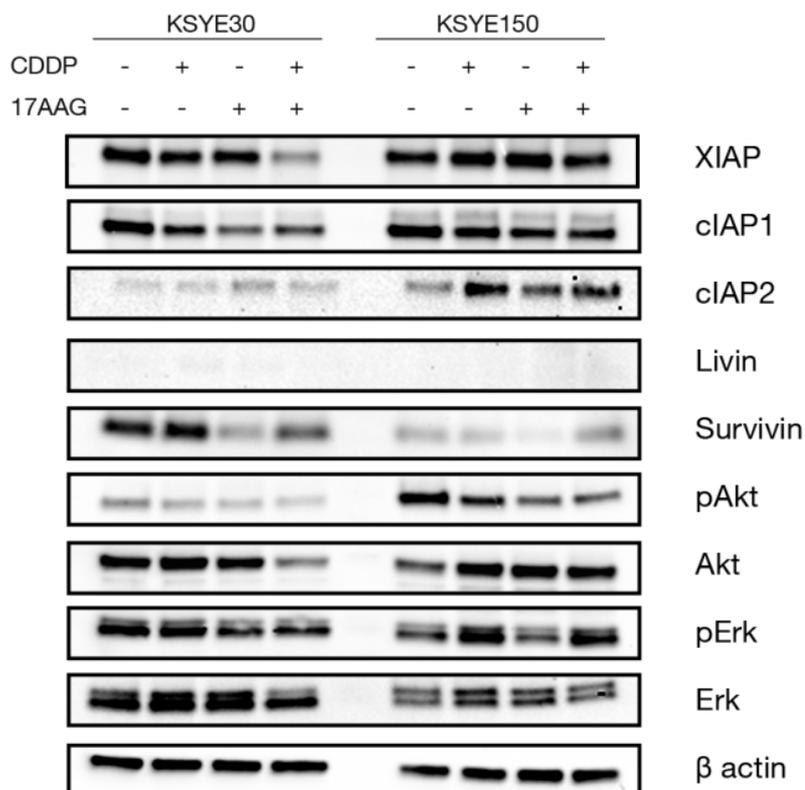


図11 IAPファミリー、Erk, Aktパスウェイのウエスタンブロット解析。KYSE30とKYSE150はcisplatin (CDDP; 1 μ M), 17-AAG (KYSE30 1 μ M, KYSE150 0.05 μ M)と混合薬剤で72時間処理後、ウエスタンブロットを行った。

phosphorylated Akt、XIAP の経時変化

経時変化を確認するため、単剤および併用した際のphosphorylated Akt, total Akt, XIAPのタンパク質発現を検討した(図12)。phosphorylated Aktは24時間後には17-AAG単剤と併用で低下がみられた。更に72時間後にはより強力な低下が起こった。KYSE30でのCDDPと17-AAG併用で著明だった。XIAP発現も17-AAG単剤と併用において、24時間後にわずかに減少し始め、48時間で著明に減少していた。

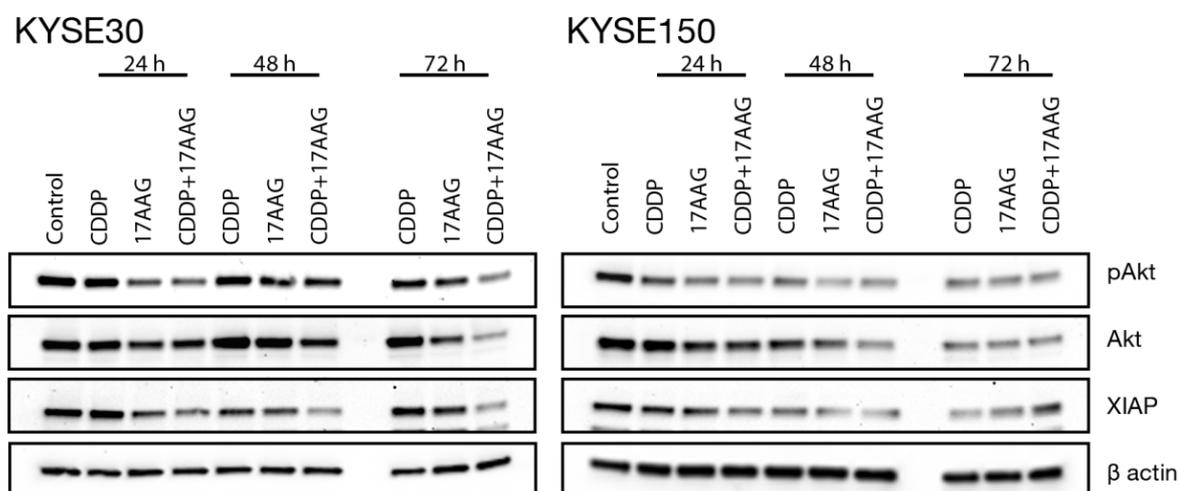


図12 phosphorylated Akt, Akt, XIAPの経時変化。KYSE30とKYSE150はcisplatin (CDDP; 1 μ M), 17-AAG (KYSE30 1 μ M, KYSE150 0.05 μ M)と混合薬剤で表記時間処理後、ウエスタンブロットで解析した。

KYSE30、KYSE150 における Akt/XIAP パスウェイ

KYSE30, KYSE150においてAkt/XIAPパスウェイが認められるかを確認した。Akt阻害剤としてMK-2206を用いてphosphorylated Aktを阻害した。24時間後にウエスタンブロットでタンパク質発現を調べた(図13)。phosphorylated Aktの阻害およびXIAPの発現低下を認めた。

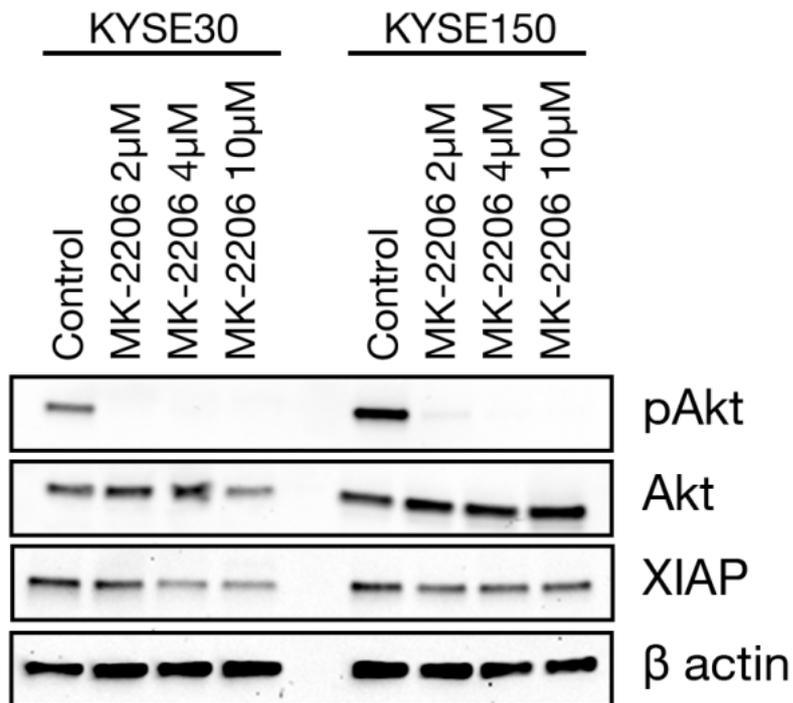


図13 MK-2206を用いたKYSE30およびKYSE150のAkt/XIAP pathway 解析。MK-2206によりphosphorylated Aktが低下し、XIAPの発現抑制も認められた。

siRNA による XIAP 阻害効果

XIAPの発現抑制によりアポトーシスが誘導され細胞数の減少が認められることを確認した。まず、siRNA XIAPをトランスフェクションし、72時間後のタンパク質発現を検討した。Negative controlと比較し、72時間後には5nM以上のsiRNAによりXIAPは発現低下を呈した(図14)。

次にsiRNAをトランスフェクションし72時間後の細胞数をWST-8 cell counting kit-8を用いて測定した(図15)。72時間後では、siRNA XIAPトランスフェクションした細胞は、Negative controlに比較しKYSE30、KYSE150の両方で有意に細胞減少していた($P < 0.001$)。このことからXIAPの発現低下が細胞数の減少に関与していることが示された。

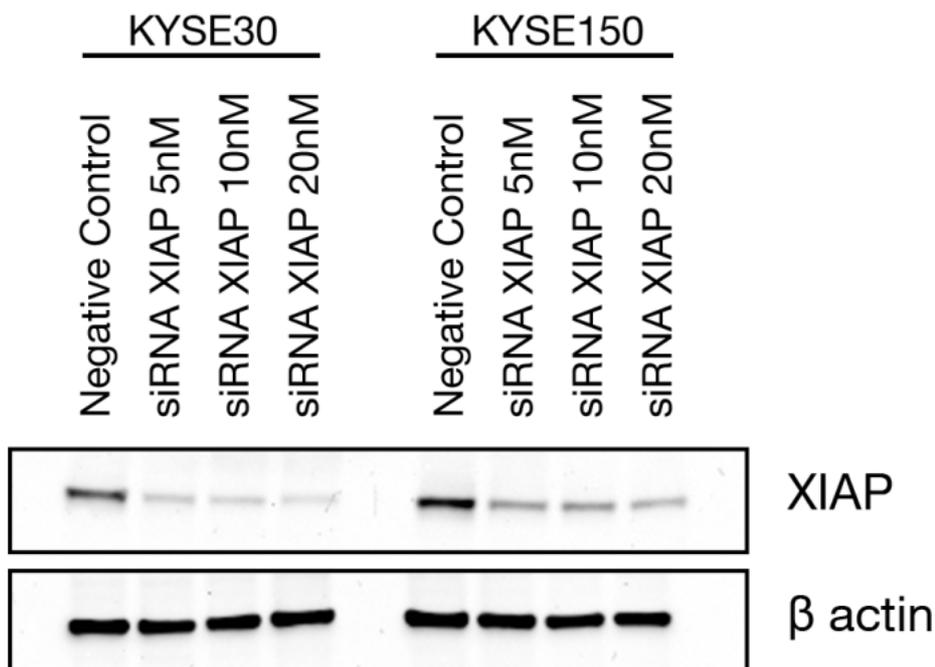


図14 siRNAを用いてXIAP発現抑制を行ったウエスタンブロット。
KYSE30およびKYSE150において、siRNA XIAP 5nM以上でXIAPの発現抑制を認めた。

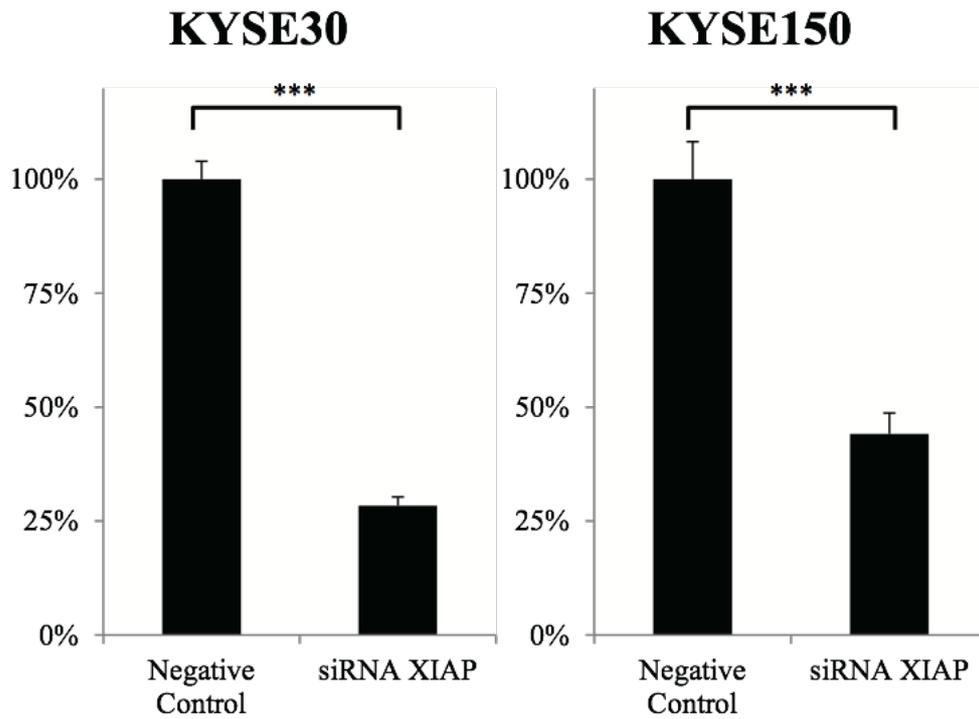


図15 5nM siRNA XIAPトランスフェクション後72時間の細胞数の変化。Negative Controlを100%としてsiRNA XIAPトランスフェクション後の細胞数をWST-8 cell counting kit-8を用いて測定した。

*** P<0.001

考察

本研究では次の2点を解明した。(1) CDDP耐性食道扁平上皮癌において、CDDPと17-AAGの相乗効果を初めて示した。(2) CDDPと17-AAGの併用は、Akt/XIAPパスウェイを抑制しアポトーシスを誘導した。

CDDP耐性食道扁平上皮癌細胞株において、CDDPと17-AAGは相乗効果を示した。単剤では殆ど細胞毒性を生じない低濃度の17-AAGの存在下において、CDDPの細胞毒性が増し、強い抗腫瘍効果を得ることが出来た。この細胞毒性はPARPとcaspase 3/7の活性化を介して起こるアポトーシスによって生じていた。タイムラプス撮影でもCDDPと17-AAGの併用は単剤投与に比べ、より強いアポトーシスを誘導して細胞減少を呈することが視認でき、この結論を支持している。

ウェスタンブロットを用いたタンパク質の経時変化から、CDDPと17-AAGの併用により最初にphosphorylated Aktがより強く減少し、その後にXIAPが低下した。同時にPARPが活性化され始め、時間経過とともにPARPの活性化はより高度になり、アポトーシスが強力に誘導されると考えられた。一方で、Akt阻害剤を用いてphosphorylated Aktを阻害するとXIAPの発現も抑制され、Akt/XIAPパスウェイが食道扁平上皮癌細胞株でも認められた。また、XIAPをsiRNAで発現抑制すると細胞死を導くことができることから、XIAPの活性化がKYSE30およびKYSE150の生存・増殖に重要な役割を持つことが示された。これらの結果から、CDDPと17-AAGの併用により、まずphosphorylated Aktが低下することによりXIAPが減少、次いでCaspase-9, -3, -7の活性亢進、PARPを活性化を通じてアポトーシスを誘導し、強い抗腫瘍効果が得られたと考えられる。

CDDPとHSP90阻害剤の相乗効果については他臓器癌でも報告されている。McCollumらは、非小細胞肺癌A549において、CDDPはHSP90阻害剤(geldanamycinや17-AAG)と相乗効果を認めており、これはCDDPによる

heat shock factor-1の不活化を介している」と結論づけている[63]。Wengらは非小細胞肺癌A549とH1650において、17-AAGはthymidine phosphorylaseとAkt活性をdownregulationすることでCDDPの細胞毒性を増強すると示している[64]。食道扁平上皮癌でも同様の作用機序が生じているかどうかを確認する必要がある。しかしCDDP耐性食道扁平上皮癌細胞株におけるCDDPと17-AAGの相乗効果は報告されておらず、本研究はCDDPと17-AAGの相乗効果がCDDPの薬剤耐性を改善させた初めての報告である。

化学療法においてAkt/XIAP pathwayはアポトーシスの主要な制御因子であることが乳癌・卵巣癌・子宮頸癌・黒色腫で報告されている[65-68]。Aktのリン酸化はXIAPを安定化し、Aktの不活化やノックダウンはXIAPを不安定にすることでアポトーシスを導く[69]。加えて、XIAP発現の特異的阻害はアポトーシスを誘導し、Caspase-3の活性化を促す[70]。本研究では食道扁平上皮癌細胞株であるKYSE30およびKYSE150においても、同様の作用機序を示しており、CDDPと17-AAGの相乗効果がAkt/XIAP pathwayを介してアポトーシスが誘導されるという結論を支持している。

本研究は、in vivoでの結果が欠如している、臨床における効果を予測する上ではin vivoの結果が必要と考えられる。また、今回の結果からだけではEC-GI-10とTE6で相乗効果が得られなかった原因が分かっていない。最近の報告に因れば、食道扁平上皮癌においてphosphatase and tensin homolog (PTEN)がHSP90阻害剤感受性の効果予測因子になる可能性が示唆されている[71]。しかしながらHSP90阻害剤やCDDPとHSP90阻害剤の相乗効果の効果予測因子は確立していない[72]。このような効果予測因子の確立が臨床応用のためには重要である。その他、今回の結果ではプロテアーゼ阻害剤、17-AAG阻害剤ともdocetaxel、5-FUとの相乗効果は認めなかった。更なる治療成績の向上にはdocetaxel, 5-FUの薬剤耐性の克服も重要であり、今後の網羅的検索を使った新治療法の開発が必要である。

食道扁平上皮癌の化学療法は進歩してきており、docetaxel, CDDP, 5-FUの併用であるDCF療法は血液毒性を初めとした有害事象も多いが高い抗腫瘍効果が得られている[34]。しかし、すでにDCFの不応例に対する二次治療が問題となってきており、さらなる分子標的治療薬などの開発が期待されている[73]。今回、CDDPと相乗効果を示した17-AAGは乳癌や多発骨髄腫で既に臨床使用されている(一般名tanespimycin)。食道癌への応用が出来れば更なる治療効果の改善が得られる可能性がある。

結論

本研究は低濃度CDDPと低濃度HSP90阻害剤(17-AAG)の組み合わせによる、CDDP耐性食道扁平上皮癌細胞株に対する相乗効果を示した。この機序としてはAkt/XIAPのdownregulationによるアポトーシス誘導が考えられた。この結果から、低濃度17-AAGとCDDPの相乗作用により、CDDP耐性を克服し食道扁平上皮癌患者の治療成績の改善を得られる可能性が示唆された。

おわりに

補足

補足表 1 患者背景

	CF (n=38)	DCF (n=38)	P value
Gender (n)			
Male / Female	33/5	34/4	1.000
Age, median (range) years	66(49-78)	62(46-74)	0.318
Performance status (ECOG)			
0/1/2	34/3/1	32/6/0	0.480
Histological classification			
SCC/Adenocarcinoma	38/0	37/1	1.000
Location of primary tumor			
Ut/Mt/Lt	6/18/14	1/16/21	0.079
Clinical TNM			
T1/T2/T3	1/5/32	0/7/31	0.754
N0/N1	8/26	12/26	0.435
M0/M1 (LYM)	34/4	32/6	0.736
Stage of Disease (UICC)			
Stage II/III/IV	11/23/4	14/18/6	0.582

CF, cisplatin and fluorouracil; DCF, docetaxel, cisplatin, and fluorouracil.

補足表2 化学療法に関連した有害事象

Event†, n (%)	術前CF療法 n=38		術前DCF療法 n=38	
	all	Grade 3/4	all	Grade 3/4
Neutropenia	9(24) *	5(13) *	37(97) *	33(87) *
Febrile neutropenia	0 *	0 *	9(24) *	9(24) *
Anemia	26(68)	0	33(87)	0
Thrombocytopenia	3(8) *	0	15(39) *	1(3)
Anorexia	12(32)	2(5)	21(55)	2(5)
Nausea	13(34)	2(5)	10(26)	2(5)
Vomiting	3(8)	2(5)	0	0
Mucositis oral	7(18)	1(3)	11(29)	1(3)
Creatine increased	6(16)	0	4(11)	1(3)
Constipation	3(8)	0	4(11)	0
Diarrhea	2(5)	0	4(8)	0
Edema	1(3)	0	2(5)	0
Aspiration	0	0	1(3)	1(3)
Hypertension	0	0	1(3)	1(3)

† Possibly or probably related to study treatment: treatment-emergent toxicities occurring at grade 3 to 4 or 5% or more of either group.

* Fisher's exact test < 0.05, all in favor of CF.

補足表3 術前化学療法の治療成績

	術前CF群 (n=38)	術前DCF群 (n=38)	P value
総合評価			
CR/PR/SD/PD*	0/9/20/9	2/22/12/2	
Response (%), CR + PR	9(24)	24(63)	0.001
病理組織学的評価			
Grade 3/Grade 2/Grade 1/Grade 0+	0/2/19/17	4/20/9/5	
Response (%), Grade 3 + Grade 2	2(5)	24(63)	< 0.001

*CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease †including cases without operation

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始直接の指導および統括をして頂きました自治医科大学統合病理学 仁木利郎教授に深謝いたします。また癌細胞株遺伝子プロファイルデータ取得に関し、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス部門 油谷浩幸教授、東京医科歯科大学難治疾患研究所ゲノム病理学分野 石川俊平教授、東京大学医学部・人体病理学 深山正久教授にご尽力頂き深くお礼申し上げます。実験操作への助言にご協力頂きました自治医科大学消化器外科学 齋藤心助教、森嶋計助教、統合病理学 佐久間裕司講師、小國幸子実験補助員に深くお礼申し上げます。参考論文作成に際し、統計手法の確認にご協力いただきました情報センター 三重野牧子助教に深く御礼申し上げます。

最後に本研究の遂行が円滑に進むようご尽力頂きました自治医科大学臨床腫瘍学 藤井博文教授、消化器外科学 細谷好則准教授、アランレフォー教授、佐田尚宏教授、安田是和教授に深くお礼申し上げます。

引用文献

1. Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 61(2): p. 69-90.2011.
2. Brown L. M., Devesa S. S., Chow W. H. Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age. *Journal of the National Cancer Institute*. 100(16): p. 1184-7.2008.
3. 国立がん研究センターがん対策情報センター. がん情報サービス. Available from: <http://ganjoho.jp/professional/statistics/index.html>.
4. 厚生労働省. 平成 24 年 (2012) 人口動態統計 (確定数) の概況.2012.
5. Ozawa S., Tachimori Y., Baba H., Fujishiro M., Matsubara H., Numasaki H., Oyama T., Shinoda M., Takeuchi H., Teshima T., Udagawa H., Uno T., Barron J. P. Comprehensive Registry of Esophageal Cancer in Japan, 2004. *Esophagus*. 9(2): p. 75-98.2012.
6. 日本食道学会, 食道癌診断・治療ガイドライン 2012 年 4 月版(第 3 版). 2012, 東京: 金原出版.
7. Islami F., Fedirko V., Tramacere I., Bagnardi V., Jenab M., Scotti L., Rota M., Corrao G., Garavello W., Schuz J., Straif K., Negri E., Boffetta P., La Vecchia C. Alcohol drinking and esophageal squamous cell carcinoma with focus on light-drinkers and never-smokers: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*. 129(10): p. 2473-84.2011.
8. Lee C. H., Wu D. C., Lee J. M., Wu I. C., Goan Y. G., Kao E. L., Huang H. L., Chan T. F., Chou S. H., Chou Y. P., Lee C. Y., Chen P. S., Ho C. K., He J., Wu M. T. Carcinogenetic impact of alcohol intake

- on squamous cell carcinoma risk of the oesophagus in relation to tobacco smoking. *Eur J Cancer*. 43(7): p. 1188-99.2007.
9. Morita M., Kumashiro R., Kubo N., Nakashima Y., Yoshida R., Yoshinaga K., Saeki H., Emi Y., Kakeji Y., Sakaguchi Y., Toh Y., Maehara Y. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: epidemiology, clinical findings, and prevention. *Int J Clin Oncol*. 15(2): p. 126-34.2010.
 10. Muto M., Takahashi M., Ohtsu A., Ebihara S., Yoshida S., Esumi H. Risk of multiple squamous cell carcinomas both in the esophagus and the head and neck region. *Carcinogenesis*. 26(5): p. 1008-12.2005.
 11. Katada C., Muto M., Nakayama M., Tanabe S., Higuchi K., Sasaki T., Azuma M., Ishido K., Katada N., Yamashita K., Nemoto M., Shibata T., Masaki T., Okamoto M., Koizumi W. Risk of superficial squamous cell carcinoma developing in the head and neck region in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 122(6): p. 1291-6.2012.
 12. 日本食道学会, 臨床・病理 食道癌取扱い規約 2008年4月【第10版補訂版】. 2008, 東京: 金原出版株式会社.
 13. Lin D. C., Du X. L., Wang M. R. Protein alterations in ESCC and clinical implications: a review. *Diseases of the Esophagus*. 22(1): p. 9-20.2009.
 14. Fujishiro M., Yahagi N., Kakushima N., Kodashima S., Muraki Y., Ono S., Yamamichi N., Tateishi A., Shimizu Y., Oka M., Ogura K., Kawabe T., Ichinose M., Omata M. Endoscopic submucosal dissection of esophageal squamous cell neoplasms. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 4(6): p. 688-94.2006.

15. Ishihara R., Iishi H., Uedo N., Takeuchi N., Yamamoto S., Yamada T., Masuda E., Higashino K., Kato M., Narahara H., Tatsuta M.
Comparison of EMR and endoscopic submucosal dissection for en bloc resection of early esophageal cancers in Japan. *Gastrointestinal Endoscopy*. 68(6): p. 1066-72.2008.
16. Yamaguchi N., Isomoto H., Nakayama T., Hayashi T., Nishiyama H., Ohnita K., Takeshima F., Shikuwa S., Kohno S., Nakao K. Usefulness of oral prednisolone in the treatment of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Gastrointestinal Endoscopy*. 73(6): p. 1115-21.2011.
17. 小山 恒男, 宮田 佳典, 島谷 茂樹, 友利 彰寿, 堀田 欣一, 吉田 操.
【食道 m3・sm1 癌の診断と遠隔成績】 第 46 回食道色素研究会アンケート調査報告 転移のあった m3・sm1 食道癌の特徴. *胃と腸*. 37(1): p. 71-4.2002.
18. Isono K., Sato H., Nakayama K. RESULTS OF A NATIONWIDE STUDY ON THE 3-FIELD LYMPH-NODE DISSECTION OF ESOPHAGEAL CANCER. *Oncology*. 48(5): p. 411-20.1991.
19. Ando N., Ozawa S., Kitagawa Y., Shinozawa Y., Kitajima M.
Improvement in the results of surgical treatment of advanced squamous esophageal carcinoma during 15 consecutive years. *Annals of Surgery*. 232(2): p. 225-32.2000.
20. Ando N., Kato H., Igaki H., Shinoda M., Ozawa S., Shimizu H., Nakamura T., Yabusaki H., Aoyama N., Kurita A., Ikeda K., Kanda T., Tsujinaka T., Nakamura K., Fukuda H. A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized

- advanced squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG9907). *Ann Surg Oncol*. 19(1): p. 68-74.2012.
21. Nakamura K., Kato K., Igaki H., Ito Y., Mizusawa J., Ando N., Udagawa H., Tsubosa Y., Daiko H., Hironaka S., Fukuda H., Kitagawa Y., Japan Esophageal Oncology Group/Japan Clinical Oncology Group. Three-arm phase III trial comparing cisplatin plus 5-FU (CF) versus docetaxel, cisplatin plus 5-FU (DCF) versus radiotherapy with CF (CF-RT) as preoperative therapy for locally advanced esophageal cancer (JCOG1109, NExT study). *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 43(7): p. 752-5.2013.
22. Kato K., Muro K., Minashi K., Ohtsu A., Ishikura S., Boku N., Takiuchi H., Komatsu Y., Miyata Y., Fukuda H. Phase II study of chemoradiotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin for Stage II-III esophageal squamous cell carcinoma: JCOG trial (JCOG 9906). *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 81(3): p. 684-90.2011.
23. 安田 卓司, 今本 治彦, 土岐 祐一郎, 宮田 博志, 今野 元博, 平井 紀彦, 新海 政幸, 彭 英峰, 山崎 誠, 安田 篤, 白石 治, 塩崎 均. 下咽頭・頸部食道癌の治療戦略 頸部食道癌に対する治療戦略 更なる根治性と機能性の向上を目指して. *日本気管食道科学会会報*. 59(2): p. 99-102.2008.
24. 細谷 好則, 宇井 崇, 倉科 憲太郎, 春田 英律, 斉藤 心, 瑞木 亨, 俵 藤 正信, 佐藤 貴一, 山本 徳博, 菅野 健太郎, 長瀬 通隆, 藤井 博文, 柴山 千秋, 中澤 聖則, 三澤 和秀, 和田 政彦, 布宮 伸, 平林 由広, 西野 宏, 宮崎 邦夫, 去川 俊二, 福嶋 敬宜, 仁木 利郎, 丹波 嘉一郎, 佐田 尚宏, 永井 秀雄, 安田 是和. 自治医科大学附属病院の食道癌手術成績 1999-2009. *自治医科大学紀要*. 33: p. 29-36.2011.

25. Miyata H., Yamasaki M., Kurokawa Y., Takiguchi S., Nakajima K., Fujiwara Y., Mori M., Doki Y. Multimodal treatment for resectable esophageal cancer. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 59(7): p. 461-6.2011.
26. Berrino F., De Angelis R., Sant M., Rosso S., Bielska-Lasota M., Coebergh J. W., Santaquilani M. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol*. 8(9): p. 773-83.2007.
27. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 62(1): p. 10-29.2012.
28. Posner M. R., Hershock D. M., Blajman C. R., Mickiewicz E., Winquist E., Gorbounova V., Tjulandin S., Shin D. M., Cullen K., Ervin T. J., Murphy B. A., Racz L. E., Cohen R. B., Spaulding M., Tishler R. B., Roth B., Viroglia Rdel C., Venkatesan V., Romanov I., Agarwala S., Harter K. W., Dugan M., Cmelak A., Markoe A. M., Read P. W., Steinbrenner L., Colevas A. D., Norris C. M., Jr., Haddad R. I. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*. 357(17): p. 1705-15.2007.
29. Vermorken J. B., Remenar E., van Herpen C., Gorlia T., Mesia R., Degardin M., Stewart J. S., Jelic S., Betka J., Preiss J. H., van den Weyngaert D., Awada A., Cupissol D., Kienzer H. R., Rey A., Desauois I., Bernier J., Lefebvre J. L. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*. 357(17): p. 1695-704.2007.
30. Van Cutsem E., Moiseyenko V. M., Tjulandin S., Majlis A., Constenla M., Boni C., Rodrigues A., Fodor M., Chao Y., Voznyi E., Risse M. L., Ajani J. A. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line

- therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. 24(31): p. 4991-7.2006.
31. Bayraktar U. D., Bayraktar S., Hosein P., Chen E., Koniaris L. G., Rocha-Lima C. M., Montero A. J. Preoperative docetaxel/cisplatin/5-fluorouracil chemotherapy in patients with locally advanced gastroesophageal adenocarcinoma. *The Medical Oncologists*. 29(3): p. 1707-10.2012.
 32. Ferri L. E., Ades S., Alcindor T., Chasen M., Marcus V., Hickeson M., Artho G., Thirlwell M. P. Perioperative docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil (DCF) for locally advanced esophageal and gastric adenocarcinoma: a multicenter phase II trial. *Annals of Oncology*. 23(6): p. 1512-7.2012.
 33. Hara H., Tahara M., Daiko H., Kato K., Igaki H., Kadowaki S., Tanaka Y., Hamamoto Y., Matsushita H., Nagase M., Hosoya Y. Phase II feasibility study of preoperative chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Science*.2013.
 34. Ui Takashi, Fujii Hirofumi, Hosoya Yoshinori, Nagase Michitaka, Mieno Makiko, Mori Misuzu, Zuiki Toru, Saito Shin, Kurashina Kentaro, Haruta Hidenori, Matsumoto Shiro, Niki Toshiro, Lefor Alan, Yasuda Yoshikazu. Comparison of preoperative chemotherapy using docetaxel, cisplatin and fluorouracil with cisplatin and fluorouracil in patients with advanced carcinoma of the thoracic esophagus. *Disease of the Esophagus*: p. (in press)
 35. Yamasaki M., Miyata H., Tanaka K., Shiraishi O., Motoori M., Peng Y. F., Yasuda T., Yano M., Shiozaki H., Mori M., Doki Y. Multicenter phase I/II study of docetaxel, cisplatin and fluorouracil combination

- chemotherapy in patients with advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncology*. 80(5-6): p. 307-13.2011.
36. Rutman R. J., Cantarow A., Paschkis K. E. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer Research*. 14(2): p. 119-23.1954.
 37. Wohlhueter R. M., McIvor R. S., Plagemann P. G. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*. 104(3): p. 309-19.1980.
 38. Wang D., Lippard S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 4(4): p. 307-20.2005.
 39. Siddik Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 22(47): p. 7265-79.2003.
 40. Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M., Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 31(15): p. 1869-83.2012.
 41. Elie-Caille C., Severin F., Helenius J., Howard J., Muller D. J., Hyman A. A. Straight GDP-tubulin protofilaments form in the presence of taxol. *Curr Biol*. 17(20): p. 1765-70.2007.
 42. Kolfshoten G. M., Hulscher T. M., Duyndam M. C., Pinedo H. M., Boven E. Variation in the kinetics of caspase-3 activation, Bcl-2 phosphorylation and apoptotic morphology in unselected human ovarian cancer cell lines as a response to docetaxel. *Biochemical Pharmacology*. 63(4): p. 733-43.2002.
 43. Leonard G. D., Fojo T., Bates S. E. The role of ABC transporters in clinical practice. *The Oncologist*. 8(5): p. 411-24.2003.

44. Monzo M., Rosell R., Sanchez J. J., Lee J. S., O'Brate A., Gonzalez-Larriba J. L., Alberola V., Lorenzo J. C., Nunez L., Ro J. Y., Martin C. Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 17(6): p. 1786-93.1999.
45. Johnstone R. W., Ruefli A. A., Lowe S. W. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 108(2): p. 153-64.2002.
46. Eckelman B. P., Salvesen G. S., Scott F. L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*. 7(10): p. 988-94.2006.
47. Dan H. C., Sun M., Kaneko S., Feldman R. I., Nicosia S. V., Wang H. G., Tsang B. K., Cheng J. Q. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem*. 279(7): p. 5405-12.2004.
48. Asselin E., Mills G. B., Tsang B. K. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Research*. 61(5): p. 1862-8.2001.
49. Silvera D., Formenti S. C., Schneider R. J. Translational control in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 10(4): p. 254-66.2010.
50. Goldberg A. L. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *Journal of Cell Biology*. 199(4): p. 583-8.2012.
51. Ebrahimi-Fakhari D., Wahlster L., McLean P. J. Molecular Chaperones in Parkinson's Disease - Present and Future. *Journal of Parkinsons Disease*. 1(4): p. 299-320.2011.
52. Neckers L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med*. 8(4 Suppl): p. S55-61.2002.

53. Newman B., Liu Y., Lee H. F., Sun D. X., Wang Y. HSP90 Inhibitor 17-AAG Selectively Eradicates Lymphoma Stem Cells. *Cancer Research*. 72(17): p. 4551-61.2012.
54. Zhang H., Burrows F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J Mol Med (Berl)*. 82(8): p. 488-99.2004.
55. 曾我 史朗. 【がん治療薬の研究開発戦略 1】 発見!分子シャペロン Hsp90 が抗がん薬標的に! 抗がん薬標的としての Hsp90 の発見と研究開発. *日本薬理学雑誌*. 141(1): p. 9-14.2013.
56. Bredel M., Bredel C., Sikic B. I. Genomics-based hypothesis generation: a novel approach to unravelling drug resistance in brain tumours? *Lancet Oncology*. 5(2): p. 89-100.2004.
57. 藤渕 航, 岡田 吉史. Close Up 実験法 GSEA によるマイクロアレイデータからの遺伝子機能セットの探索法. *実験医学*. 25(6): p. 865-71.2007.
58. Wang T., Niki T., Goto A., Ota S., Morikawa T., Nakamura Y., Ohara E., Ishikawa S., Aburatani H., Nakajima J., Fukayama M. Hypoxia increases the motility of lung adenocarcinoma cell line A549 via activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Cancer Science*. 98(4): p. 506-11.2007.
59. Ishikawa S., Komura D., Tsuji S., Nishimura K., Yamamoto S., Panda B., Huang J., Fukayama M., Jones K. W., Aburatani H. Allelic dosage analysis with genotyping microarrays. *Biochem Biophys Res Commun*. 333(4): p. 1309-14.2005.
60. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V. K., Mukherjee S., Ebert B. L., Gillette M. A., Paulovich A., Pomeroy S. L., Golub T. R., Lander E. S., Mesirov J. P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based

- approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(43): p. 15545-50.2005.
61. Mootha V. K., Lindgren C. M., Eriksson K. F., Subramanian A., Sihag S., Lehar J., Puigserver P., Carlsson E., Ridderstrale M., Laurila E., Houstis N., Daly M. J., Patterson N., Mesirov J. P., Golub T. R., Tamayo P., Spiegelman B., Lander E. S., Hirschhorn J. N., Altshuler D., Groop L. C. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*. 34(3): p. 267-73.2003.
 62. Chou T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*. 58(3): p. 621-81.2006.
 63. McCollum A. K., Lukasiewicz K. B., Teneyck C. J., Lingle W. L., Toft D. O., Erlichman C. Cisplatin abrogates the geldanamycin-induced heat shock response. *Molecular cancer therapeutics*. 7(10): p. 3256-64.2008.
 64. Weng S. H., Tseng S. C., Huang Y. C., Chen H. J., Lin Y. W. Inhibition of thymidine phosphorylase expression by using an HSP90 inhibitor potentiates the cytotoxic effect of cisplatin in non-small-cell lung cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. 84(1): p. 126-36.2012.
 65. Pramanik K. C., Kudugunti S. K., Fofaria N. M., Moridani M. Y., Srivastava S. K. Caffeic acid phenethyl ester suppresses melanoma tumor growth by inhibiting PI3K/AKT/XIAP pathway. *Carcinogenesis*. 34(9): p. 2061-70.2013.
 66. Rajput S., Kumar B. N., Sarkar S., Das S., Azab B., Santhekadur P. K., Das S. K., Emdad L., Sarkar D., Fisher P. B., Mandal M. Targeted

- apoptotic effects of thymoquinone and tamoxifen on XIAP mediated Akt regulation in breast cancer. *PloS one*. 8(4): p. e61342.2013.
67. Gagnon V., Van Themsche C., Turner S., Leblanc V., Asselin E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis*. 13(2): p. 259-71.2008.
68. Asselin E., Mills G. B., Tsang B. K. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Research*. 61(5): p. 1862-8.2001.
69. Dan H. C., Sun M., Kaneko S., Feldman R. I., Nicosia S. V., Wang H. G., Tsang B. K., Cheng J. Q. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *Journal of Biological Chemistry*. 279(7): p. 5405-12.2004.
70. Amantana A., London C. A., Iversen P. L., Devi G. R. X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 3(6): p. 699-707.2004.
71. Bao X. H., Takaoka M., Hao H. F., Fukazawa T., Yamatsuji T., Sakurama K., Takigawa N., Nakajima M., Fujiwara T., Naomoto Y. Antiproliferative effect of the HSP90 inhibitor NVP-AUY922 is determined by the expression of PTEN in esophageal cancer. *Oncology Reports*. 29(1): p. 45-50.2013.
72. Garcia-Carbonero R., Carnero A., Paz-Ares L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol*. 14(9): p. e358-69.2013.
73. Nakajima M., Kato H. Treatment options for esophageal squamous cell carcinoma. *Expert Opin Pharmacother*. 14(10): p. 1345-54.2013.