

原

著

切除不能・再発大腸癌における NAD (P) H: Quinone Oxidoreductase 1 発現の臨床的意義

佐 藤 洋

新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器・一般外科学分野（第一外科）
（指導：若井俊文教授）

Clinical Significance of NAD (P) H: Quinone Oxidoreductase 1 Expression in Unresectable or Recurrent Colorectal Carcinoma

Y ou SATO

Division of Digestive and General Surgery, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Toshifumi WAKAI)

要 旨

【緒言】大腸癌化学療法の進歩は著しく、切除不能・再発大腸癌の生存期間は2年を超えている。大腸癌領域では、KRAS 遺伝子測定が抗 epidermal growth factor reseptor (EGFR) 抗体薬の治療効果予測因子としてその地位を確立している。しかし、KRAS 遺伝子野生型であっても奏効率の上乗せは10-30%にすぎず、KRAS 遺伝子を介さない別経路の存在が注目されている。NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) は、抗癌剤や放射線照射耐性に関与する抗酸化ストレス蛋白として知られているが、大腸癌における KRAS 遺伝子変異、予後との関連は明らかになっていない。本研究の目的は、KRAS 遺伝子野生型および変異型切除不能・再発大腸癌における NQO1 発現が予後に関与するかを検証することである。

【方法】2007年3月から2013年1月までに当科で KRAS 遺伝子野生型および変異型切除不能・再発大腸癌に対して治療を行った51例を対象とした。対象症例の大腸癌原発巣標本において、NQO1 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学検査を行い、NQO1 の発現を解析した。NQO1 の発現を陽性および陰性の2群に分類し、臨床病理学的特徴および予後を統計的に検討した。

【結果】男性29例、女性22例で年齢中央値は62歳（範囲：17-79歳）、KRAS 遺伝子野生型

Reprint requests to: You SATO
Division of Digestive and General Surgery,
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences,
1-757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器・一般外科学分野（第一外科） 佐 藤 洋

は 33 例 (64.7%), 変異型は 18 例 (35.3%) であった。NQO1 発現陽性群が 40 例 (78.4%), 陰性群が 11 例 (21.6%) であった。NQO1 発現陽性群, 陰性群の間で臨床病理学的因子に有意差はみられなかった。生存期間の検討では, NQO1 発現陽性群と陰性群, KRAS 遺伝子野生型と変異型の間で有意差は認められなかった ($P = 0.453$, $P = 0.089$)。しかし, NQO1 発現解析, KRAS 遺伝子変異検査の両者を組み合わせることによって, 生存期間が有意に層別化された ($P = 0.049$)。KRAS 野生型かつ NQO1 発現陰性群の生存期間中央値 (MST) は 46 か月であり, KRAS 変異型かつ NQO1 発現陽性群の 21 か月 ($P = 0.042$), KRAS 変異型かつ NQO1 発現陰性群の 15 か月 ($P = 0.007$) と比較して有意に予後良好であった。KRAS 遺伝子野生型に限ると, NQO1 発現陰性群の MST は 46 か月, NQO1 発現陽性群の MST は 26 か月であり, NQO1 発現陰性群の予後が良好な傾向を示した ($P = 0.074$)。

【結論】NQO1 発現解析と KRAS 遺伝子変異検査の両者を行うことにより, 切除不能・再発大腸癌の予後が有意に層別化される。

キーワード：大腸癌, NQO1, KRAS 遺伝子

緒 言

近年, 本邦における大腸癌患者数は増加傾向にあるが, 化学療法の進歩は著しく, 進行再発大腸癌の生存期間中央値 (Median survival time : MST) が 2 年を超えるまでに延長している¹⁾²⁾。この生存期間延長に抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 抗体薬や抗 epidermal growth factor reseptor (EGFR) 抗体薬といった分子標的薬の果たした役割は大きい。しかし, 化学療法単独で治癒にいたる症例が稀であることも事実である。

Guanosine triphosphate (GTP) 結合蛋白である KRAS は EGFR の下流シグナルを伝達する。KRAS 遺伝子変異によって, RAS に内在する GTPase 活性が低下し, KRAS 蛋白が GTP を結合した活性型に留まる。その結果, EGFR からの刺激に関わらず下流のシグナルを恒常的に増強すると考えられている³⁾。大腸癌領域では, KRAS 遺伝子測定が抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測因子としてその地位を確立し, 変異型では抗 EGFR 抗体薬の効果は認められない。しかし, 大規模臨床試験の結果から, KRAS 遺伝子野生型であっても奏効率の上乗せは 10-30% であり¹⁾²⁾, KRAS 遺伝子を介さない別経路の存在が注目されている。

NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1)

は, 抗癌剤や放射線照射耐性に関与する抗酸化ストレス蛋白である⁴⁾。これまでに胃癌⁵⁾, 肺癌⁶⁾⁷⁾, 膵臓癌⁸⁾⁹⁾などの領域で各癌腫と NQO1 発現の関与が報告されている。われわれは, 肝内胆管癌において NQO1 発現と予後の関連について報告した¹⁰⁾。

本研究の目的は, 大腸癌における NQO1 の発現を免疫組織化学検査で解析し, NQO1 発現が KRAS 遺伝子野生型および変異型切除不能・再発大腸癌における予後に関与するかを検証することである。

対象と方法

2007 年 3 月から 2013 年 1 月に切除不能・再発大腸癌と診断され, 新潟大学医歯学総合病院消化器・一般外科で治療を行った 51 例を対象とした (表 1)。

対象症例の外科切除標本または生検標本を使用し, ダイレクトシーケンス法を用いて KRAS 遺伝子 codon12, 13, 61 の変異を検索した。本研究では, KRAS 遺伝子 codon12, 13, 61 の全てに変異を認めないものを KRAS 野生型, いずれかに変異を認めるものを KRAS 変異型と定義した。対象症例の大腸癌原発巣標本において, NQO1 モノクローナル抗体 (Epitomics, Burlingame, CA, USA)

表1 切除不能・再発大腸癌51例の臨床病理学的特徴

切除不能・再発時年齢	中央値 (範囲)	62 (17 - 79) 歳
性別	男	29
	女	22
原発巣部位	右側結腸	11
	左側結腸	9
	直腸	31
KRAS 遺伝子	野生型	33
	変異型	18
EGFR 発現	陽性	33
	陰性	8
	未検	10
組織型	高分化・中分化	47
	低分化・その他	4
切除不能・再発部位	肝臓	25
	肺	25
	リンパ節	6
	腹膜	5
	局所	9
	その他	2
再発臓器個数	1 臓器	26
	複数臓器	25
初回手術時 Stage	I	3
	II	3
	III	12
	IV	33

を用いた免疫組織化学検査を行った。Winski ら¹¹⁾の報告に基づき、細胞質内と核のいずれか、またはその両者が染色された場合を NQO1 発現陽性と定義した。免疫組織化学検査による NQO1 発現陽性例と陰性例を図1に示した。外科的切除が行われた症例は切除標本を用いて免疫組織化学検査を行い、非切除の症例では生検標本を用いて検索を行った。対象症例は各種集学的治療が行われているため、症例によって異時性に複数の標本が存在している場合があるが、その場合は最も初期の標本を測定検体として採用した。

NQO1 発現陽性群、陰性群の2群に分類して、それぞれの臨床病理学的因子を統計学的に比較検討した。さらに NQO1 発現、KRAS 遺伝子変異別に生存期間解析を行った。2群間の臨床病理学的因子は、Mann-Whitney U 検定または Fisher の直接確率法を用いて比較した。生存解析は、大腸癌死亡を end point とし、累積生存率を Kaplan-Meier 法で算出し、log-rank 検定を用いて比較した。統計ソフトは SPSS Statistics 22 (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を使用し、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

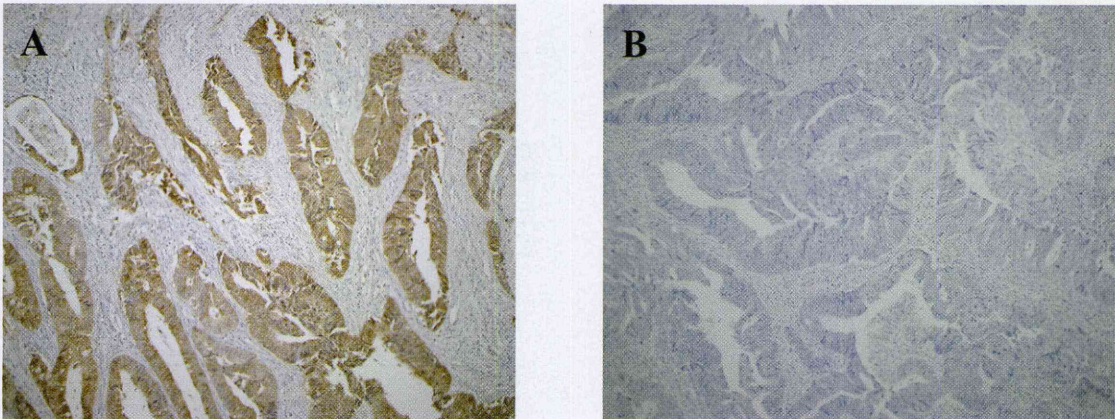


図 1 切除不能・再発大腸癌の原発巣における NQO1 発現
NQO1 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色. NQO1 発現陽性例では細胞質全体が
びまん性に染色されている (図 1A) が, 陰性例では染色されていない (図 1B).

表 2 NQO1 発現別の臨床病理学的特徴

		NQO1 発現		P 値
		陽性 (n = 40)	陰性 (n = 11)	
切除不能・再発時年齢	中央値 (範囲)	62.5 (17 - 79) 歳	63 (55 - 79) 歳	0.347
性別	男	23	6	> 0.999
	女	17	5	
原発巣部位	結腸	15	5	0.732
	直腸	25	6	
KRAS 遺伝子	野生型	27	6	0.488
	変異型	13	5	
EGFR 発現	陽性	26	5	0.617
	陰性	6	2	
組織型	高分化・中分化	36	11	0.565
	低分化・その他	4	0	
再発臓器個数	1 臓器	20	6	> 0.999
	複数臓器	20	5	
初回 Stage	I, II, III	15	3	0.726
	IV	25	8	
対象部位への手術	あり	16	7	0.190
	なし	24	4	
抗 EGFR 抗体薬使用	あり	14	4	0.191
	なし	26	2	

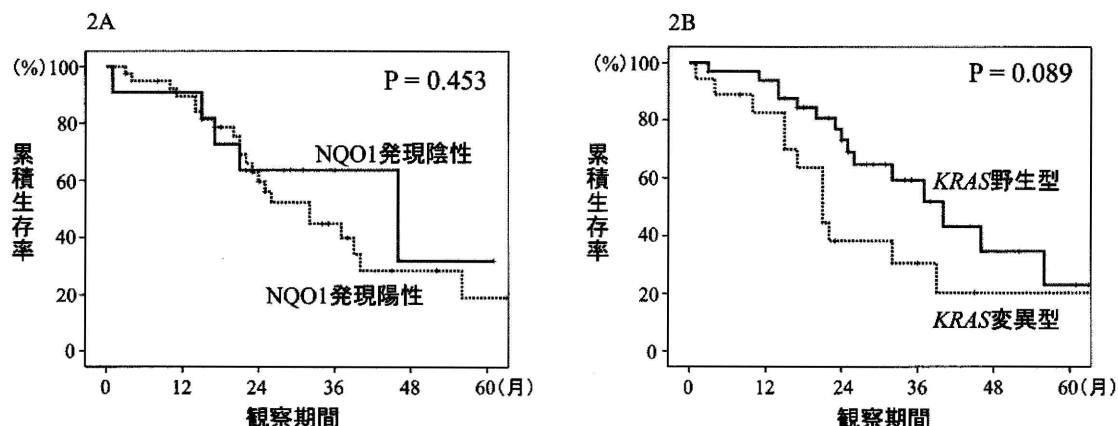


図2 切除不能・再発大腸癌 51 例の累積生存率

A : NQO1 発現別の累積生存率. NQO1 発現陰性群と陽性群で生存期間に差を認めなかった ($P = 0.453$).

B : KRAS 遺伝子変異別の累積生存率. KRAS 野生型と変異型で生存期間に差を認めなかった ($P = 0.089$).

結 果

1. 対象 51 例の患者背景

男性 29 例, 女性 22 例で年齢中央値は 62 歳であった. 原発部位は右側結腸が 11 例 (21.6 %), 左側結腸が 9 例 (17.6 %), 直腸が 31 例 (60.8 %)であった. KRAS 遺伝子野生型は 33 例 (64.7 %), 変異型は 18 例 (35.3 %)であった. 対象 51 例の治療開始後の観察期間中央値は 21 か月 (範囲: 1–78 か月)であった. EGFR 陽性が 33 例 (64.7 %), EGFR 陰性が 8 例 (15.7 %) で, 組織型は高分化・中分化が 47 例 (92.2 %), 低分化・その他が 4 例 (7.8 %) と診断された. 再発部位としては肝臓, 肺転移が多く, 1 臓器転移例は 26 例 (51.0 %), 複数臓器転移例は 25 例 (49.0 %)であった. また, 初診時に Stage IV であった症例は 33 例で, 全体の 64.7 %を占めていた (表 1).

2. 大腸癌における NQO1 発現

NQO1 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色検査を行い, 対象症例における NQO1 の発現を解析した. 陽性例では細胞質全体がびまん性

に染色されたが, 陰性例では染色されなかった (図 1). NQO1 発現陽性が 40 例 (78.4 %), 陰性が 11 例 (21.6 %)であった.

3. NQO1 発現陽性群と NQO1 発現陰性群の臨床病理学的特徴

NQO1 発現陽性群, 陰性群の 2 群に分けて検討した. 両群の間で, 原発巣部位 ($P = 0.732$) や組織型 ($P = 0.565$) などの臨床病理学的因子に差はみられなかった. KRAS 遺伝子変異の有無 ($P = 0.488$), EGFR 発現 ($P = 0.617$) に差はみられず, 抗 EGFR 抗体薬の使用頻度にも差を認めなかった ($P = 0.191$). 切除不能・再発部位に対する外科治療の介入についても両群に差は認めなかった ($P = 0.190$) (表 2).

4. NQO1 発現陽性群と陰性群の生存期間, KRAS 野生型と変異型の生存期間

対象 51 例において, NQO1 発現の有無, KRAS 遺伝子変異の有無についてそれぞれの生存期間解析を行った (図 2). 本検討では, NQO1 発現の有無 (図 2A), KRAS 遺伝子変異の有無 (図 2B),

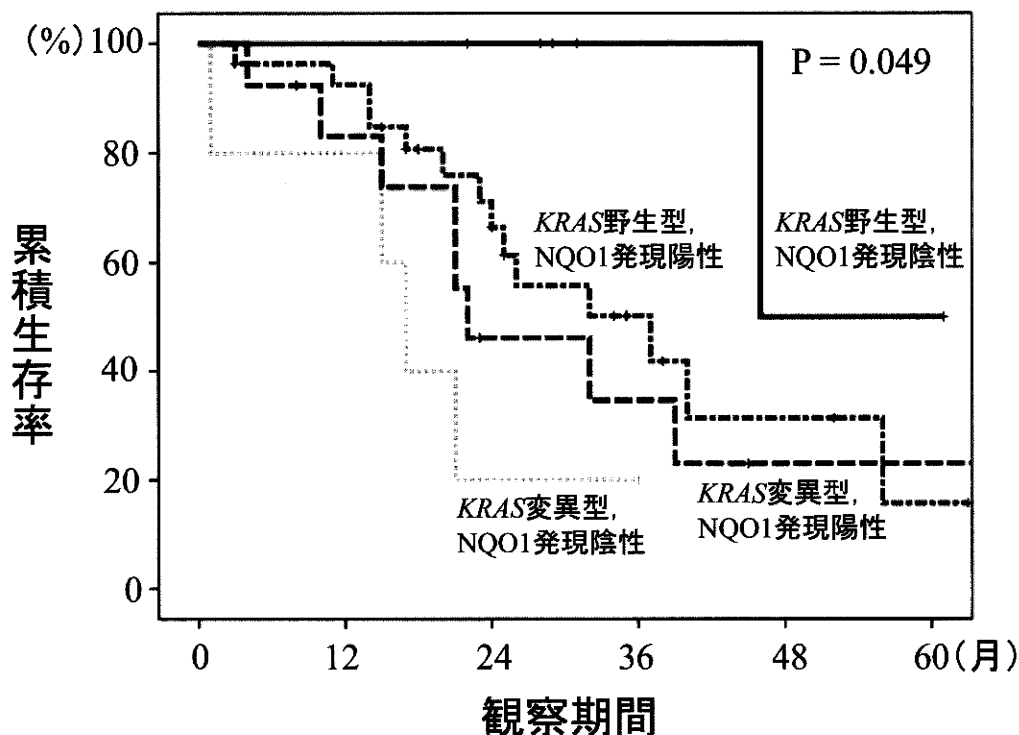


図3 NQO1発現解析とKRAS遺伝子変異検査の組み合わせによる累積生存率
NQO1発現解析とKRAS遺伝子変異検査を組み合わせることで
生存期間が有意に層別化された ($P = 0.049$).

いずれにおいても生存期間に有意差はみられなかった ($P = 0.453$, $P = 0.089$).

考 察

5. NQO1発現解析とKRAS遺伝子変異検査の組み合わせによる生存期間の検証

NQO1発現解析とKRAS遺伝子変異検査を組み合わせることで、生存期間が有意に層別化された ($P = 0.049$) (図3). KRAS野生型かつNQO1発現陰性群のMSTは46か月であり、KRAS変異型かつNQO1発現陽性群の21か月 ($P = 0.042$), KRAS変異型かつNQO1発現陰性群の15か月 ($P = 0.007$) に対して有意に予後良好であった. また、KRAS野生型に限ると、対象症例のMSTはNQO1発現陰性群で46か月、NQO1発現陽性群で26か月であり、NQO1発現陰性群で予後が良好である傾向を示した ($P = 0.074$).

抗VEGF抗体薬や抗EGFR抗体薬などの分子標的薬を含めた全身化学療法の進歩により、切除不能・再発大腸癌の生存期間中央値は2年を超えるまでに延長している¹⁾²⁾. KRAS遺伝子変異は大腸癌の35-40%に認められると報告されている. 本邦からの報告でもほぼ同様の結果であり、日本人の33.5%でKRAS遺伝子変異があったとされている³⁾. 近年、切除不能・再発大腸癌に対して全身化学療法を行う上でKRAS遺伝子の検索は必須となっている. KRAS野生型の場合は抗EGFR抗体薬の使用が考慮されるが、変異型であれば効果が期待できないために通常は使用されない. しかし、効果が期待されるKRAS野生型においても、抗EGFR抗体薬による奏効率の上乗せは

10-30%であることが大規模臨床試験によって明らかになっている¹⁾²⁾。したがって通常のOncogenic Ras pathwayとは別の経路が治療抵抗性に関与している可能性が示唆されている。

近年、抗酸化因子であるNQO1, HO1などが癌細胞における放射線・抗癌剤耐性に関与しているとの報告がみられる。Baoら¹²⁾は、シスプラチン抵抗性である卵巢癌細胞株A2780cpにおいて、NQO1, HO1のmRNA, 蛋白がいずれも高発現していたのに対し、感受性のある卵巢癌細胞株A2780では低発現であったと報告している。またMaら¹³⁾は、子宮頸癌患者において、NQO1高発現はStage, 組織型, リンパ節転移とともに有意な予後不良因子であったと報告している。

また、Jiら¹⁴⁾は、大腸癌において、NQO1やHO1といった抗酸化因子の発現調整に関与しているNrf2の過剰発現が最も重要な予後不良因子であったと報告している。さらにNQO1高発現群も有意に予後不良であったとしているが、KRAS遺伝子変異との関連は明らかにされていない。また、Mikamiら¹⁵⁾は、大腸癌臨床標本において、リンパ節転移陽性大腸癌では有意にNQO1が高発現であったと報告しているが、予後については言及していない。

本研究では、NQO1発現解析とKRAS遺伝子変異検査を組み合わせることによって、切除不能・再発大腸癌の生存期間が有意に層別化されることを明らかにした。さらにKRAS野生型に限って比較すると、NQO1発現陰性群は陽性群と比べて予後が良好である傾向を示した($P = 0.074$)。一方、KRAS変異型においては両群間に差を認めなかった($P = 0.31$)。

癌の進行度の増加に伴ってNQO1が高発現となることが、胃癌⁵⁾や大腸癌¹⁴⁾¹⁵⁾で報告されている。NQO1高発現が予後不良に関与する理由としては、放射線・抗癌剤耐性機序のほかにも、癌細胞自体の生物学的悪性度を表している可能性や、Cyclin A2, B1, D1の発現増加に伴う細胞周期進行の関与⁴⁾、NQO1以外の抗酸化ストレス蛋白であるHMOX-1, GSTなどの高発現を伴うことによる治療抵抗性の増加¹⁶⁾、などが考えられ

ている。

DeNicolaら¹⁷⁾によれば、ストレス応答型の転写制御経路であるKeap1-p62-Nrf2 pathwayとは別に、KRAS遺伝子を介してNrf2の高発現をきたす経路が報告されており、KRAS変異型で予後に差を認めなかった理由の一因となっている可能性がある。生体内ではNrf2, NQO1の発現に関してpolymorphismが指摘されており¹⁰⁾、実際の蛋白発現には様々な経路が関与しているものと考え

る。本研究の結果から、KRAS野生型かつNQO1発現陰性群は、良好な予後が期待できると考えられる。したがって、この条件に合致する症例では、複数の遠隔転移を認めた場合でも、切除を含めた集学的治療を積極的に行うといった治療戦略を考慮するなど、臨床的な応用が期待できる。

本研究にはいくつかの制限がある。経過観察期間が短いこと、単施設の少数例での検討であること、RAS遺伝子測定としてKRAS遺伝子変異(codon12, 13, 61)のみを測定していることである。今後は症例数を増やし、NRAS遺伝子を含めた解析を行うことで、より個別化した集学的治療の確立を目指す必要がある。

結 論

NQO1発現解析とKRAS遺伝子検索を組み合わせることで、切除不能・再発大腸癌の生存期間を有意に層別化できる。KRAS野生型大腸癌において、NQO1発現陰性群は、陽性群と比較して予後が良好である可能性がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野、若井俊文教授、同分子診断病理学分野、味噌洋一教授に深謝いたします。

尚、本研究はJSPS科研費26462006基盤研究(C)「p62-Keap1-Nrf2 pathwayによる大腸癌抗癌剤耐性機序の解明」(研究代表者: 亀山仁史)の助成を受けたものです。

文 献

- 1) Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, Celik I, Rougier P and Ciardiello F: Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 29: 2011 - 2019, 2011.
- 2) Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A and Koralewski P: Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27: 663 - 671, 2009.
- 3) Watanabe T, Yoshino T, Uetake H, Yamazaki K, Ishiguro M, Kurokawa T, Saijo N, Ohashi Y and Sugihara K: KRAS mutational status in Japanese patients with colorectal cancer: results from a nationwide, multicenter, cross-sectional study. *Jpn J Clin Oncol* 43: 706 - 712, 2013.
- 4) Garate M, Wani AA and Li G: The NAD (P) H: Quinone Oxidoreductase 1 induces cell cycle progression and proliferation of melanoma cells. *Free Radic Biol Med* 48: 1601 - 1609, 2010.
- 5) Lin L, Qin Y, Jin T, Liu S, Zhang S, Shen X and Lin Z: Significance of NQO1 overexpression for prognostic evaluation of gastric adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol* 96: 200 - 205, 2014.
- 6) Rosvold EA, McGlynn KA, Lustbader ED and Buetow KH: Identification of an NAD (P) H: quinone oxidoreductase polymorphism and its association with lung cancer and smoking. *Pharmacogenetics* 5: 199 - 206, 1995.
- 7) Liang GY, Lu SX, Xu G, Liu XD, Li J and Zhang DS: Expression of metallothionein and Nrf2 pathway genes in lung cancer and cancer-surrounding tissues. *World J Surg Oncol* 11: 199, 2013.
- 8) Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenson JK, Giordano TJ, Misek DE, Quick R and Hanash S: Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* 63: 2649 - 2657, 2003.
- 9) Awadallah NS, Dehn D, Shah RJ, Russell Nash S, Chen YK, Ross D, Bentz JS and Shroyer KR: NQO1 expression in pancreatic cancer and its potential use as a biomarker. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16: 24 - 31, 2008.
- 10) Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Matsuda Y, Korita PV, Takamura M, Ajioka Y and Hatakeyama K: Prognostic significance of NQO1 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 4: 363 - 370, 2011.
- 11) Winski SL, Koutalos Y, Bentley DL and Ross D: Subcellular localization of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 in human cancer cells. *Cancer Res* 62: 1420 - 1424, 2002.
- 12) Bao LJ, Jaramillo MC, Zhang ZB, Zheng YX, Yao M, Zhang DD and Yi XF: Nrf2 induces cisplatin resistance through activation of autophagy in ovarian carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 1502 - 1513, 2014.
- 13) Ma Y, Kong J, Yan G, Ren X, Jin D, Jin T, Lin L and Lin Z: NQO1 overexpression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *BMC Cancer* 14: 414, 2014.
- 14) Ji L, Wei Y, Jiang T and Wang S: Correlation of Nrf2, NQO1, MRP1, cmyc and p53 in colorectal cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 1124 - 1131, 2014.
- 15) Mikami K, Naito M, Ishiguro T, Yano H, Tomida A, Yamada T, Tanaka N, Shirakusa T and Tsuruo T: Immunological quantitation of DT-diaphorase in carcinoma cell lines and clinical colon cancers: advanced tumors express greater levels of DT-diaphorase. *Jpn J Cancer Res* 89: 910 - 915, 1998.
- 16) Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK and Zhang DD: Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 58: 262 - 270, 2008.
- 17) DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, Yu KH, Yeo CJ, Calhoun ES, Scrimieri F, Winter JM,

Hruban RH, Iacobuzio - Donahue C, Kern SE,
Blair IA and Tuveson DA: Oncogene - induced
Nrf2 transcription promotes ROS detoxification

and tumorigenesis. *Nature* 475: 106 - 109, 2011.

(平成26年8月20日受付)
