

## *NFE2L2* 変異陽性食道扁平上皮癌の 治療抵抗性に関する研究

伊藤浩平<sup>1)</sup>, 佐々木章<sup>1)</sup>, 岩谷 岳<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医学部, 外科学講座

<sup>2)</sup> 岩手医科大学医学部, 臨床腫瘍学講座

(Received on January 17, 2023 & Accepted on February 10, 2023)

### 要旨

進行食道癌治療では初回治療として化学療法が行われ, 治療前効果予測はきわめて重要である. 本研究では食道癌 61 例を対象とし *NFE2L2* 変異の有無が治療効果予測因子となりうるかを検討した. 原発巣変異解析では, 61 症例中 *NFE2L2* 変異は 13 例 (21.3%) に認め, エクソン 2 に集中していた. 初回化学療法を施行した 50 例では, 奏効は *NFE2L2* 変異例で 8 例中 2 例 (25.0%) で, 野生型 42 例中 30 例 (71.4%) に

比し有意に低かった. また初回 docetaxel/cisplatin/5-fluorouracil 療法を施行した 43 例中 *NFE2L2* 変異例 5 例は他の 38 例に比較し有意に全生存割合が低かった. 食道癌細胞株 11 株では 4 株 (36.4%) に *NFE2L2* 変異を認めた. 変異株では野生型株に比較し抗癌剤による増殖抑制効果が有意に低かった. 食道癌では *NFE2L2* 変異検索により効率的な治療抵抗性の予測が可能である.

**Key words :** *NFE2L2*, esophageal squamous cell carcinoma, prediction of chemotherapy resistance, mutation

### I. 緒 言

食道扁平上皮癌 (以下, 食道癌) は予後不良な癌の 1 つであり, 5 年生存率は 20% 以下とされている<sup>1)</sup>. 進行食道癌では遠隔転移症例に対する全身療法のほか手術や放射線などの局所療法により根治が期待される症例でも補助療法としての化学療法の役割は極めて大きい. 食道癌化学療法では cisplatin と 5-fluorouracil (5-FU) を併用する CF 療法が 1990 年代から標準治療として用いられてきたがその奏効率は 35% と低く, 切除可能症例への術前・術後の補助化学療法としての使用や CF に他の薬剤を

加えた新規レジメンの開発が進められてきた<sup>2)</sup>. 2012 年 Stage II/III 切除可能進行癌に対する補助化学療法として術後よりも術前の CF 療法が予後が良いことが報告された<sup>2,3)</sup>. また新規レジメンとして CF 療法に docetaxel を上乗せした docetaxel/cisplatin /5-FU (DCF) 療法では奏効率 60% 以上と良好な成績が示され, 初回 DCF 療法により他臓器浸潤や広範リンパ節転移が解除され根治手術や根治的放射線化学療法へ移行できた高度進行食道癌の報告が増加している<sup>4,5)</sup>. さらに 2022 年には Stage I-III 食道癌に対する術前療法の無作為比較試験の結果, CF 療法あるいは CF 併用放射線療法に比較し DCF 療法が有効であることが示された<sup>6)</sup>. しかし, 食道狭窄により栄養障害を伴う食道癌患

Corresponding author: Takeshi Iwaya  
tiwaya@iwate-med.ac.jp

表 1. 食道癌症例の臨床病理学的因子と初回治療

症 例	年 齢	性 別	進行度*	初回治療
EC_1	67	男性	IIIA	手術
EC_2	66	男性	IVA	化学療法
EC_3	69	男性	IVB	化学療法
EC_4	65	男性	IVA	化学療法
EC_5	60	女性	I	手術
EC_6	56	男性	II	化学療法
EC_7	62	女性	III	化学療法
EC_8	67	男性	IVA	化学療法
EC_9	81	男性	III	化学療法
EC_10	71	女性	IVA	化学療法
EC_11	71	女性	IVB	化学療法
EC_12	76	男性	I	手術
EC_13	81	男性	IVB	化学療法
EC_14	65	男性	IVA	化学療法
EC_15	78	男性	IVB	化学療法
EC_16	55	女性	III	化学療法
EC_17	75	女性	IIIB	手術
EC_18	78	男性	IVB	化学療法
EC_19	70	男性	IVA	化学療法
EC_20	57	男性	III	化学療法
EC_21	48	男性	II	化学療法
EC_22	75	男性	II	化学療法
EC_23	77	男性	I	手術
EC_24	53	男性	IVA	化学療法
EC_25	74	男性	III	化学療法
EC_26	63	男性	IVA	化学療法
EC_28	78	男性	I	手術
EC_29	65	男性	IVA	化学療法
EC_30	65	男性	IIIB	化学療法
EC_31	77	男性	0	手術
EC_32	66	女性	IVA	化学療法
EC_33	80	男性	IVA	化学療法
EC_34	73	男性	I	手術
EC_35	64	男性	IVA	化学療法
EC_36	64	男性	II	化学療法
EC_37	78	男性	I	手術
EC_38	65	女性	III	化学療法
EC_39	64	男性	III	化学療法
EC_40	70	男性	I	手術
EC_41	70	男性	0	化学放射線療法
EC_42	72	男性	IVB	化学療法
EC_43	77	男性	IVA	化学療法
EC_44	74	男性	IVA	化学療法
EC_45	69	男性	IVB	化学療法
EC_46	57	男性	IVA	化学療法
EC_47	71	女性	II	化学放射線療法
EC_48	81	女性	I	手術
EC_49	72	男性	IVB	化学療法
EC_50	70	男性	IVA	化学放射線療法
EC_51	67	男性	III	化学療法
EC_52	60	男性	IVA	化学療法
EC_54	64	男性	III	化学療法
EC_55	60	女性	III	化学療法
EC_56	50	男性	III	化学療法
EC_57	50	男性	IVA	化学療法
EC_58	71	女性	IVB	化学療法
EC_59	59	女性	II	化学療法
EC_60	75	男性	IVA	化学療法
EC_62	74	男性	III	化学療法
EC_63	68	男性	III	化学療法
EC_64	49	女性	III	化学療法

\* TNM 悪性腫瘍の分類第 8 版

者では化学療法有害事象の発生頻度は高く、特にDCF療法ではgrade 3以上の骨髄抑制、発熱性好中球減少、腸炎を伴う下痢などから重篤な状態に陥る症例も散見され、日常診療では十分な有害事象対策が必要である。以上より、現在の食道癌治療では早期癌を除くほぼすべての症例で初回治療として化学療法が行われているが、非奏効例では化学療法による不要な有害事象を被るだけでなく、病勢進行により根治治療や有効な治療を受ける機会を逃す可能性がある。したがって、治療前化学療法の効果予測は食道癌診療ではきわめて重要と考えられる。

Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) は細胞傷害や炎症によって引き起こされる酸化ストレスからの生体保護を担う重要な転写因子である。非ストレス下ではNrf2はKelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) とCullin-3 (Cul3) の複合体により細胞質内で速やかに分解されるが、ストレス下では安定化し核内へ移動し生体防御に関連する遺伝子群の転写を促進し細胞生存に働く。癌細胞におけるNrf2の恒常的な安定化により化学療法や放射線療法への治療抵抗性を獲得することが報告されている<sup>7,8)</sup>。またNrf2高発現自体がグルコース代謝、グルタミン代謝に関与する酵素群の遺伝子を直接活性化することで、癌細胞の増殖そのものを亢進させていることも示されている<sup>9)</sup>。肺扁平上皮癌および食道扁平上皮癌の全遺伝子エクソン解析ではNrf2, Keap1, Cul3をコードする*NFE2L2/KEAP1/CUL3*系遺伝子変異は肺癌で32.6%、食道癌で23.4%の症例で認められている<sup>10,11)</sup>。これら3遺伝子のうち*NFE2L2*変異は肺癌では46.6%、食道癌では70.1%と、食道癌では*NFE2L2*変異が優位である。肺癌では*NFE2L2/KEAP1/CUL3*のいずれかに変異を有する症例は、非変異症例に比較し有意に予後不良であることが報告されている<sup>12)</sup>。Shibataらは食道癌では82例中18例(22%)に*NFE2L2*変異を認め、*NFE2L2*変

異症例は野生型症例に比べ有意に予後不良であることを報告している<sup>13)</sup>。この報告は2000年代の食道癌症例のデータに基づくが、前述のように2010年代以降術前化学療法の標準化や奏効率の高いレジメンの開発が行われ、近年食道癌治療内容や予後は大きく変遷している。本研究では2015年以降に治療を行った食道癌症例を対象とし、*NFE2L2*変異の有無が治療効果予測因子となりうるかを検討した。

## II. 研究材料及び方法

### 1. 食道癌症例の遺伝子変異解析

本研究は、当院で施行された食道癌先行研究(UMIN Clinical Trial Registry: UMIN000038724; 本学倫理委員会承認番号 # HGH27-16) に2015年9月から2019年7月までに参加登録された食道扁平上皮癌64症例のうち、原発巣組織の次世代シーケンサー(next generation sequencer: NGS)解析が施行可能であった61症例を対象とした(表1)。原発巣変異解析は末梢血単核球より抽出したDNAを対照とし、食道および頭頸部扁平上皮癌で変異頻度の高い31遺伝子を標的としたカスタムパネルであるsquamous cell carcinoma (SCC) panelを用いた<sup>14)</sup>。NGS解析はIon Proton<sup>TM</sup>またはIon 5S<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用い共同研究施設である札幌医科大学で行った<sup>14,15)</sup>。NGS解析結果から*NFE2L2*および*KEAP1*遺伝子の変異症例割合、変異部位、変異アリル頻度(variant allele frequency: VAF)を抽出した。*NFE2L2*変異状況における初回治療効果をFisher's exact testにより、*NFE2L2*変異症例における治療効果別の原発巣変異アリル頻度をMann-Whitney testを用い比較した。また、全生存期間、無増悪生存期間をKaplan-Meier分析及びLog-rank検定により比較した(Graph Pad Prism 9)。

2. 食道癌細胞株における*NFE2L2*変異解析  
当教室で保有する食道扁平上皮癌細胞株11

表2. 食道癌原発巣組織における

症例 ID	染色体位置	遺伝子	変異型	エクソン
EC_1	chr 2:178095689	<i>NFE2L2</i>	ミスセンス	5
	chr 2:178095693		ミスセンス	5
EC_3	chr 2:178098799		ミスセンス	2
EC_4	chr 2:178098799		ミスセンス	2
EC_12	chr 2:178098965		ミスセンス	2
EC_14	chr 2:178095691		ミスセンス	5
	chr 2:178098809		ミスセンス	2
EC_16	chr 2:108098806		ミスセンス	2
EC_19	chr 2:178098799		ミスセンス	2
EC_23	chr 2:178098960		ミスセンス	2
EC_28	chr 2:178098949		インフレーム欠失	2
EC_36	chr 2:178098959		ミスセンス	2
EC_40	chr 2:178098815		ミスセンス	2
EC_51	chr 2:178098965		ミスセンス	2
EC_54	chr 2:178098804		ミスセンス	2
EC_32	chr 19:10602845		<i>KEAP1</i>	ミスセンス
EC_45	chr 19:10597494	ミスセンス		6
EC_48	chr 19:10602878	ミスセンス		3
EC_55	chr 19:10602322	ミスセンス		2

株 (TE1, TE6, TE8, TE9, TE10, KYSE70, KYSE150, KYSE180, KYSE410, KYSE450, KYSE520) についてサンガーシークエンス法により *NFE2L2* 変異状況を確認した. *NFE2L2* 変異 hotspot であるエクソン2を Forward primer : 5' -GGTATCTGTCA TTTAAAAACATG A-3', および Reverse primer: 5' -GGTTAAG GAAACACTGAGCAAGGA-3' を用い KOD FX Neo (TOYOBO, Osaka, Japan) にて増幅し, Bigdye terminator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により direct sequence を施行した.

### 3. *NFE2L2* 変異状況による食道癌細胞株の抗癌剤増殖抑制効果の比較

各細胞株を 10% ウシ胎児血清 (FBS; Gibco, Rockville, MD, USA) を加えた RPMI 1640 培地 (Gibco, Rockville, MD, USA) で 96-well プレートに 2,000-5,000 cells/well で播種し 37°C, 5%

CO<sub>2</sub> で 24 時間インキュベートした. その後食道癌治療で頻用される抗癌剤である cisplatin, docetaxel, 5-FU の 3 剤をそれぞれ添加し, 24 時間後の 50% 増殖阻止濃度 (GI<sub>50</sub>) を CCK-8 assay (DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan) を用いて計測した. *NFE2L2* 野生型株および変異株の GI<sub>50</sub> について Mann-Whitney test を用い比較した (Graph Pad Prism 9).

## III. 結 果

1. 食道癌症例における *NFE2L2/KEAP1* 変異  
61 症例中 *NFE2L2* 変異は 13 例 (21.3%), *KEAP1* 変異は 4 例 (6.6%) に認められた (表 2). *NFE2L2* および *KEAP1* 変異それぞれの原発巣変異アリル頻度を表 2 に示した. *NFE2L2* 変異 16 変異中 13 変異 (81.3%) は Keap1 結合ドメインであるエクソン 2 に集中しており, この 13 変異中 10 変異 (76.9%) は

*NFE2L2/KEAP1* 変異状況

塩基変化	アミノ酸変化	総アリル	野生型アリル	変異アリル
c.1642 A>G	p.Asn546 Lys	911	881	30
c.1638 T>G	p.Lys548 Glu	902	862	40
c.246 A>T	p.Glu82 Asp	1131	665	466
c.246 A>T	p.Glu82 Asp	1322	875	447
c.80 A>G	p.Asp27 Gly	1994	1381	613
c.1640 A>G	p.Asp547 Gly	1999	1341	658
c.236 A>C	p.Glu79 Ala	1995	1352	643
c.239 C>A	p.Thr80 Lys	1735	789	946
c.246 A>T	p.Glu82 Asp	1990	1521	469
c.85 G>A	p.Asp29 Asn	1981	1327	654
c.69_95 delTTGGAGGCAAG ATATAGATCTTGGAGT	p.Trp24_Val32 del	374	204	170
c.86 A>G	p.Asp29 Gly	2000	1477	523
c.230 A>G	p.Asp77 Gly	660	463	197
c.80 A>T	p.Asp27 Val	177	166	11
c.241 G>A	p.Gly81 Ser	2000	1622	378
c.733 G>T	p.Val245 Phe	1999	1389	710
c.1709 G>T	p.Gly570 Val	2000	1761	239
c.700 C>T	p.Arg234 Trp	1997	1793	204
c.1256 G>A	p.Gly419 Glu	1317	1209	108

Keap1 結合モチーフの DLG (codon 29-31) および ETGE (codon 79-82) モチーフに認められた (図 1). エクソン 2 以外では Neh1 ドメインのコドン 546-548 に 3 個の変異が認められた. EC\_1 における p.N546K 変異と p.K548 の 2 変異はいずれも VAF は 5% 以下と腫瘍内の minor clone における変異と考えられた (表 2, 図 1). EC\_14 は p.D547G 変異を認めるもののエクソン 2 の ETGE モチーフにも変異を有していた. ヒトがんの体細胞変異に関する包括的データベースである COSMIC database (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) では *NFE2L2* 変異解析が行われた 62,435 例中, コドン 546-548 における変異は 1 例の登録があるのみで変異発生頻度は極めて低率であった. したがって, 食道癌における *NFE2L2* 変異は Keap1 結合ドメインにおけるものが重要であることが示唆された. *KEAP1* 遺伝子変異を

示した 4 例のうち, 2 例は Nrf2 結合ドメインの Kelch/DGR 状に変異を有していた (表 2, 図 1).

2. 食道癌症例における *NFE2L2* 変異状況と治療効果

食道癌症例の背景因子 (年齢, 性別, 喫煙, 飲酒, 進行度) と *NFE2L2* 変異状況を表 3 に示した. 11 症例 (Stage I: 9 例, Stage IIIA: 2 例) では初回治療として根治手術が行われ, 3 例は放射線化学療法, 47 例で初回化学療法が施行された (表 4). 化学療法レジメンの内訳は DCF: 43 例, CF: 3 例, irinotecan/cisplatin: 1 例で, 全症例で cisplatin を含む化学療法が施行され, 91.5% (43/47) の症例で DCF 療法が選択された (表 4). 初回手術症例を除いた 50 例における初回治療効果判定では, 奏効率 (response rate) は *NFE2L2* 変異症例では 25.0% (2/8), *NFE2L2* wildtype 症例では 71.4%

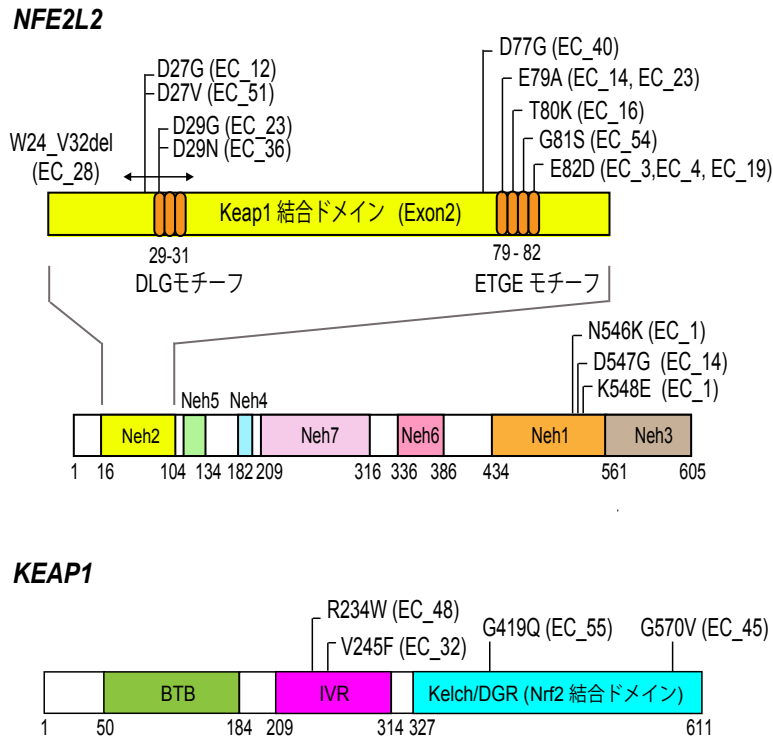


図 1. 食道癌症例における *NFE2L2* および *KEAP1* 変異状況  
 上段に *NFE2L2* 変異状況, 下段に *KEAP1* 変異状況を示す.  
 各ドメインとコドン番号をシェーマ下に示す.

表 3. 患者背景因子と *NFE2L2* 変異状況

		<i>NFE2L2</i> 変異状況	
		野生型 (n = 48)	変異型 (n = 13)
年齢	≤ 70	21	5
	< 70	27	8
性別	男性	36	12
	女性	12	1
喫煙	あり	22	9
	なし	26	4
飲酒	あり	30	11
	なし	18	2
TNM	I	6	4
Stage <sup>*</sup>	II	2	1
	III	6	1
	IV	34	7

\* TNM 悪性腫瘍の分類第 8 版

(30/42) と wildtype 群で有意に高かった (p = 0.02, Fisher's exact test, 図 2A). 反対に初回治療における進行例 (progressive disease:

表 4. 食道癌症例の初回治療と *NFE2L2* 変異状況

初回治療	<i>NFE2L2</i> 変異状況	
	野生型 (n = 48)	変異型 (n = 13)
手術	6	5
化学放射線療法	3	0
化学療法		
docetaxel/cisplatin/5-FU	36	7
cisplatin/5-FU	2	1
irinotecan/cisplatin	1	0

PD) の割合は *NFE2L2* 変異症例では 8 例中 5 例 (62.5%), *NFE2L2* wildtype 症例では 42 例中 6 例 (14.3%) と変異群で有意に多かった (p < 0.01, Fisher's exact test, 図 2B). *NFE2L2* 変異の VAF 平均値は初回治療効果 PD 症例の 34.9 (23.57-54.52) % に比べ PR 症例で 12.6 (6.21-18.9) % と有意に低かった (p = 0.03, Unpaired t-test, 図 2C).

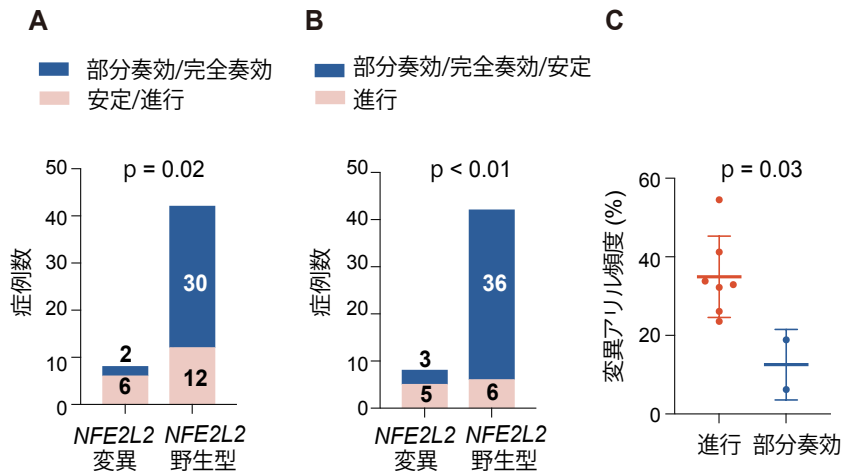


図 2. 食道癌症例の *NFE2L2* 変異状況と治療効果

- A. 全食道癌 50 症例における *NFE2L2* 変異状況と初回治療後の奏効症例割合
- B. 進行症例割合
- C. *NFE2L2* 変異症例における変異アレル頻度と初回治療効果 (Mann-Whitney test).

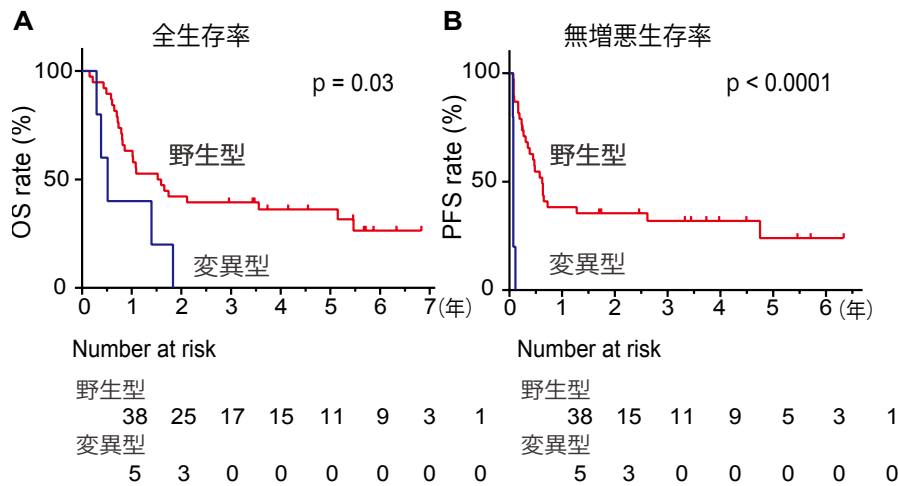


図 3. *NFE2L2* 変異状況と初回 DCF 療法施行症例の生存割合

- A. 全生存割合
- B. 無増悪生存割合 (Log-rank test)  
*NFE2L2* mutant: *NFE2L2* 変異陽性かつ変異アレル頻度 20% 以上の症例, *NFE2L2* wildtype: *NFE2L2* 野生型および変異陽性症例のうち変異アレル頻度 20% 未満の症例を含む.

初回 DCF 療法を施行した 43 例のうち *NFE2L2* mutant がかつ変異アレル頻度 20% 以上の 5 症例とそれ以外の 38 例 (*NFE2L2* wildtype: 36 例および *NFE2L2* mutant VAF < 20%: 2 例) での予後比較では前者が有意に予後不良であった ( $p = 0.03$ , Log-rank test, 図 3A). 同様に *NFE2L2* mutant がかつ変異アレル頻度 20% 以上の 5 症例の初回 DCF 療法の

無増悪生存率は, それ以外の症例と比べて有意に低かった ( $p < 0.0001$ , Log-rank test, 図 3B).

3. 食道癌培養細胞における *NFE2L2* 変異解析  
 食道癌細胞株 11 株におけるサンガーシーケンスによる *NFE2L2* エクソン 2 変異解析では 4 株 (36.4%) に変異を認め, 1 株はインフレーム欠失変異, 3 株はミスセンス変異であった (図 4A). 変異部位は食道癌症例では DLG/

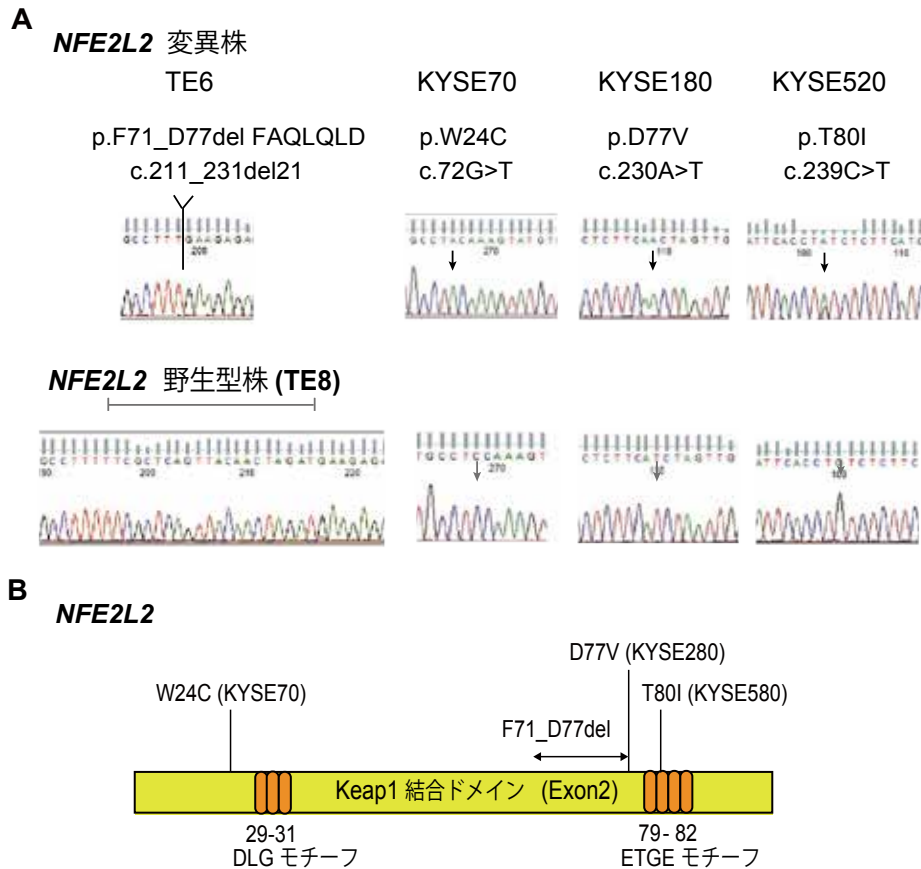


図4. 食道扁平上皮癌細胞株における *NFE2L2* 変異状況

A. *NFE2L2* サンガーシーケンス

上段: *NFE2L2* 変異陽性細胞株と変異部位. TE6, KYSE70, KYSE180, KYSE520 の4株に *NFE2L2* 変異を認めた. 下段: *NFE2L2* 野生型細胞株. TE8 における上段変異部位と同部位の塩基配列を示す.

B. 食道扁平上皮癌細胞株の *NFE2L2* 変異部位

*NFE2L2* 変異株4株の変異部位と Keap1 結合モチーフ部位を示す.

ETGE モチーフに集中していたのと異なり, 細胞株では DLG/ETGE モチーフ 上の変異は KYSE520 の1株のみであった. しかし, 他の3株の変異も DLG/ETGE モチーフの近傍5コドン以内に位置していた (図4B).

4. 食道癌細胞株の抗癌剤増殖抑制効果

食道癌日常診療で使用頻度の高い3薬剤である cisplatin, 5-FU, docetaxel について, 食道癌細胞株11株で50%増殖阻止濃度 ( $GI_{50}$ ) を比較した (図5). 全薬剤では *NFE2L2* 変異細胞株は野生型株に比し有意に  $GI_{50}$  が高かった ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test, 図6). 薬剤別で

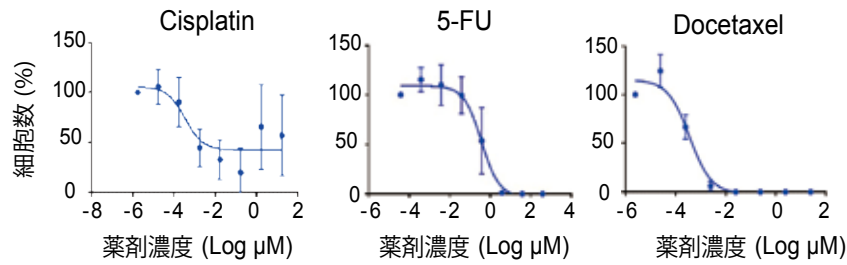
は, cisplatin が *NFE2L2* 変異細胞株で有意に高かった. 5-FU および docetaxel では変異株と野生型株で有意な差はみられなかったものの, 野生型株では低く変異型株で高い傾向が見られた ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test, 図6).

IV. 考 察

2000年代より, 進行食道癌に対する治療は手術や放射線療法などの局所療法の適否にかかわらず初回治療として全身化学療法が用いられることが一般化してきた. また化学療法レジメンでは, 長年標準治療とされてきたCF療



***NFE2L2* 野生型株 (KYSE450)**



***NFE2L2* 変異株 (TE6)**

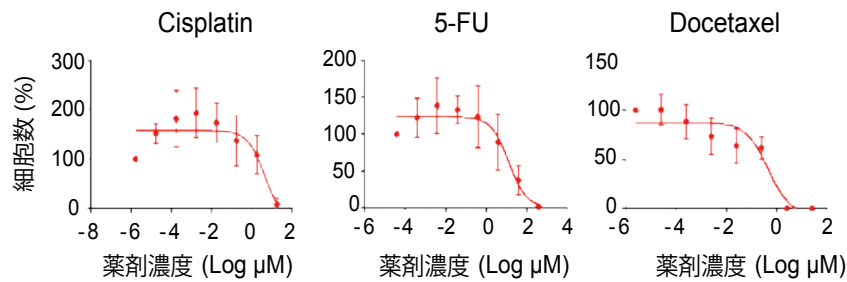


図5. 食道癌細胞 *NFE2L2* 変異状況と抗癌剤による増殖抑制  
 代表例として上段に *NFE2L2* 野生型株 KYSE450, 下段に *NFE2L2* 変異株 TE6 を示す. X 軸に cisplatin, 5-FU, docetaxel の濃度, Y 軸に細胞増殖率を示す. TE6 では KYSE450 に比し, 増殖抑制に高濃度の薬剤を要している.

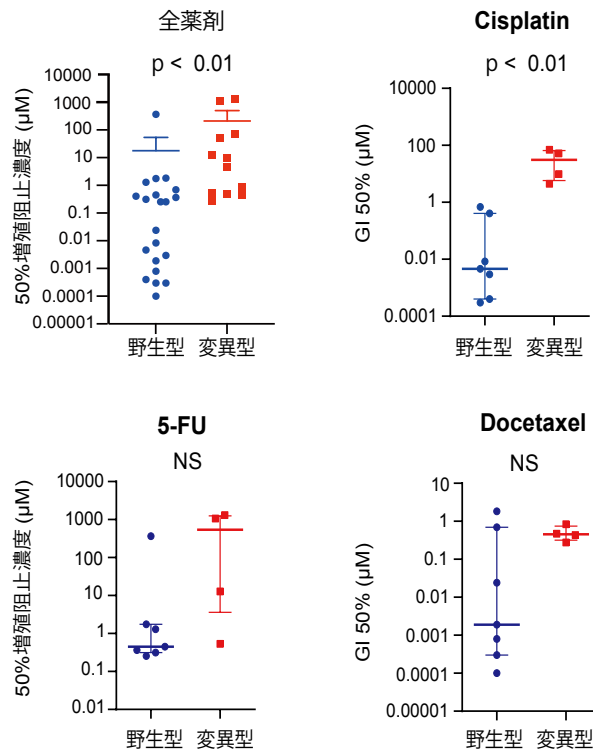


図6. 食道癌細胞株における *NFE2L2* 変異状況と 50%増殖阻止濃度  
*NFE2L2* 野生型株 7 株および変異株 4 株における全薬剤, cisplatin, 5-FU, docetaxel の各薬剤による 50%増殖阻止濃度を比較した (Mann-Whitney test).

法に docetaxel を上乗せした DCF 療法や免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitor: ICI) を加えた ICI/CF 療法の有効性が示され, 30 年ぶりに食道癌薬物療法が進化を遂げている。これらの強力な化学療法は奏効率の上昇をもたらしているものの, 依然 30-50% の症例は非奏効例である。非奏効例では不要な有害事象を被るだけでなく, 病勢進行による quality of life の悪化や臓器機能の低下から, 根治治療や有効な治療を受ける機会を逃す可能性がある。したがって, 今後の食道癌診療では化学療法効果予測はこれまで以上に重要となる。

食道癌組織における術前化学療法の効果予測因子として, p53, 細胞周期調節因子, ヌクレオチド除去修復機構, そのほか好中球・リンパ球比に代表される免疫学的指標などが報告されてきたが, 現在のところ有効な予測因子として確立されたものはない<sup>16-18)</sup>。Sasagawa らは 121 例の食道癌症例の治療前生検組織の全ゲノム解析および網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行い, 機械学習から予測モデルを構築し, 腫瘍組織内の好中球浸潤および腫瘍ゲノムにおける特定のコピー数変化とシグネチャーが食道癌術前化学療法の効果を予測できることを報告している<sup>19)</sup>。われわれの解析結果とは異なり, Sasagawa らの食道癌症例の全ゲノム解析結果からは *NFE2L2* 変異状況と術前化学療法効果との関連は認められていない。この相違は化学療法の奏効率が一因と考えられる。Sasagawa らの検討で用いられた化学療法は標準的な CF 療法であるが, 進行食道癌に対する CF 療法の奏効率は 35% にとどまる<sup>2)</sup>。一方, 本研究で一次化学療法として施行した DCF 療法の奏効率は 66.6-86.4% と CF に比し良好な成績が報告されている<sup>4-6)</sup>。CF と DCF 療法の間には奏効率に約 2 倍の差が見られるため, Sasagawa らの報告からは化学療法奏効に強くつながる因子が, われわれの検討からは化学療法耐性につ

ながる因子が同定されたものと思われる<sup>19)</sup>。

進行癌患者の診療では可能な限り早期の治療開始が望ましい。前述の全ゲノム解析や RNA-seq 解析を用いた免疫/ゲノムの大規模プロファイリング検査では数ヶ月の長い検査時間と高額な検査費用が生じるため, 食道癌治療前効果予測検査としての日常診療への実装には高いハードルがある。今回われわれは *NFE2L2* 変異状況と化学療法効果との関連を明らかにした。対象遺伝子・領域を絞った解析は検査時間の短縮ならびに費用削減に大きく貢献する。肺癌では *NFE2L2/KEAP1* 系変異のうち *NFE2L2* 変異割合は 50% 以下と報告されている<sup>10)</sup>。本研究では食道癌 61 症例中 *NFE2L2/KEAP1* 変異は 17 例 (27.9%) に認め, この 17 例中 *NFE2L2* 変異は 13 例 (76.5%), *KEAP1* 変異は 4 例 (23.5%) と *NFE2L2* 変異の割合が高く, 既報告と同様であった<sup>11)</sup>。*KEAP1* における Nrf2 binding domain が 852bp と比較的広範であるのに対し, *NFE2L2* の Keap1 binding domain はエクソン 2 の 267bp と小範囲で, さらに変異が DLG, ETGE モチーフの 20bp 周囲に集中している (図 1)。食道癌では *NFE2L2* の小範囲の変異検索で治療効果を予測できる可能性があり, きわめて効率的と考えられる。

*NFE2L2* 変異陽性食道癌細胞株では野生型株に比べ治療抵抗性である傾向が見られたが, 特に cisplatin では変異株で有意に高い GI<sub>50</sub> 値を示した (図 6)。肺癌では *NFE2L2-KEAP1-CUL3* のいずれかに変異を有する症例は, 非変異症例に比較しプラチナベースの初回化学療法開始から増悪までの期間が有意に短く, また予後不良であることが報告されている<sup>12)</sup>。食道癌化学療法では cisplatin は中心的な薬剤であり, 本研究においても化学療法施行群には全例 cisplatin が使用されており, *NFE2L2* 変異が特に cisplatin 抵抗性により全生存率, 無再発生存率に影響したことが予測された。

*NFE2L2* 変異症例のうち初回手術を施行した5症例 (Stage I: 4例, Stage IIIA: 1例) は全例生存中である (観察期間中央値: 1894日)。したがって *NFE2L2* 変異症例も切除可能であれば良好な予後が期待され, 不良な予後は化学療法抵抗性に起因するものと思われる。現在の食道癌術前化学療法の対象には Stage IB, II も含まれるが, *NFE2L2* 変異症例では術前治療中に病状進行の可能性もあり, 切除可能例では早期手術が望ましいものと考えられる。

切除不能症例の予後改善には *NFE2L2* 変異陽性食道癌の新規治療法開発が必要である。食道癌化学療法では2020年にICI療法が承認され key drug の一つとなった。ICIの作用機序は従来の殺細胞性抗癌剤とは大きく異なり, 免疫抑制シグナルの伝達を阻害することでT細胞の活性化抑制を解除するものである。*NFE2L2* 変異陽性食道癌に対するICIの治療効果に関する情報は乏しく, 今後症例を集積し検討したい。また, Keap1によるユビキチン化を介さない Nrf2 分解経路の解明も重要と思われる。microRNA は標的遺伝子の mRNA の3' 非翻訳領域に対し不完全な相同性のもとで結合し, mRNA の不安定化と翻訳抑制により標的タンパク質産生を抑制する。microRNA と標的遺伝子 mRNA 結合予測アルゴリズム (TargetScanHuman7.0, [https://www.targetscan.org/vert\\_70/](https://www.targetscan.org/vert_70/)) では *NFE2L2* mRNA と microRNA 144 (*miR-144*) の強い結

合可能性が予測された。*miR-144* の発現異常は種々の癌で報告されているが<sup>20)</sup>, Keap1 非依存性の Nrf2 発現抑制機構としての可能性も興味深い。今後 *miR-144* の導入による薬剤抵抗性変化や Nrf2 発現変化について検討を加え, 予後不良な *NFE2L2* 変異陽性食道癌の新規治療法開発につなげたい。

## V. 結 語

食道癌症例の約20%に *NFE2L2* エクソン2変異が検出され, 変異症例は野生型症例に比べ化学療法の治療効果が低く, 予後不良であることを明らかにした。また *NFE2L2* 変異による薬剤抵抗性は食道癌 key drug である cisplatin で強く, *NFE2L2* 変異状況により食道癌化学療法抵抗性の予測が可能であることが示唆された。

稿を終えるにあたり, ご指導, ご支援を賜りました岩手医科大学外科学講座・秋山有史先生, 藤澤良介先生, 高橋智子先生, 小泉優香先生, 臨床腫瘍学講座・遠藤史隆先生, 医歯薬総合研究所医療開発研究部門・西塚 哲教授, 阿保亜紀子先生, 開 勇人先生, 阿部正和先生, 札幌医科大学フロンティア医学研究所ゲノム医科学部門・時野隆至教授, 井戸川雅史先生, 札幌医科大学医療人育成センター生物学教室・佐々木泰史教授にこの場を借りて深く御礼申し上げます。

利益相反: 岩谷 岳は株式会社クオントディテクト, 中外製薬株式会社, 第一三共株式会社, 大塚製薬株式会社から助成金・研究支援を受けている。

## References

- 1) **Rustgi AK and El-Serag HB:** Esophageal Cancer. N Eng J Med **371**, 2499-2509, 2014.
- 2) **Kelsen DP, Ginsberg R, Pajak TF, et al.:** Chemotherapy followed by surgery compared with surgery alone for localized esophageal cancer. N Engl J Med **339**, 1979-1984, 1998.
- 3) **Ando N, Kato H, Igaki H, et al.:** 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**, 68-74, 2012.
- 4) **Hara H, Tahara M, Daiko H, et al.:** Phase II feasibility study of preoperative chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil for esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci **104**, 1455-1460, 2003.
- 5) **Watanabe M, Baba Y, Yoshida N, et al.:** Outcomes of preoperative chemotherapy with

- docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil followed by esophagectomy in patients with resectable node-positive esophageal cancer. *Ann Surg Oncol* **21**, 2838-2844, 2014.
- 6) **Kato K, Ito Y, Daiko H, et al.**: A randomized controlled phase III trial comparing two chemotherapy regimen and chemoradiotherapy regimen as neoadjuvant treatment for locally advanced esophageal cancer, JCOG1109 NExT study. *J Clin Oncol* **40**, 238-238, 2022.
  - 7) **Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, et al.**: Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **29**, 1235-1243, 2008.
  - 8) **Jeong Y, Hoang NT, Lovejoy A, et al.**: Role of KEAP1/NRF2 and TP53 mutations in lung squamous cell carcinoma development and radiation resistance. *Cancer Discov* **7**, 86-101, 2017.
  - 9) **Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, et al.**: Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* **22**, 66-79, 2012.
  - 10) Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519-525, 2012.
  - 11) **Sawada G, Niida A, Uchi R, et al.**: Genomic landscape of esophageal squamous cell carcinoma in a Japanese population. *Gastroenterology* **150**, 1171-1182, 2016.
  - 12) **Jeong Y, Hellyer JA, Stehr H, et al.**: Role of KEAP1/NFE2L2 Mutations in the chemotherapeutic response of patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **26**, 274-281, 2020.
  - 13) **Shibata T, Kokubu A, Saito S, et al.**: NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. *Neoplasia* **9**, 864-873, 2011.
  - 14) **Iwaya T, Endo F, Takahashi F, et al.**: Frequent tumor burden monitoring of esophageal squamous cell carcinoma with circulating tumor DNA using individually designed digital polymerase chain reaction. *Gastroenterology* **160**, 463-465, 2021.
  - 15) **Fujisawa R, Iwaya T, Endo F, et al.**: Early dynamics of circulating tumor DNA predict chemotherapy responses for patients with esophageal cancer. *Carcinogenesis* **42**, 1239-1249, 2021.
  - 16) **Huang Y, Sun Y, Peng P, et al.**: Prognostic and clinicopathologic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in esophageal squamous cell carcinoma: evidence from a meta-analysis. *OncoTargets Ther* **10**, 1165-1172, 2017.
  - 17) **Zhou XL, Li YQ, Zhu WG, et al.**: Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic biomarker for patients with locally advanced esophageal squamous cell carcinoma treated with definitive chemoradiotherapy. *Sci Rep* **7**, 42581, 2017.
  - 18) **Xie X, Luo KJ, Hu Y, et al.**: Prognostic value of preoperative platelet-lymphocyte and neutrophil-lymphocyte ratio in patients undergoing surgery for esophageal squamous cell cancer. *Dis Esophagus* **29**, 79-85, 2016.
  - 19) **Sasagawa S, Kato H, Nagaoka K, et al.**: Immuno-genomic profiling of biopsy specimens predicts neoadjuvant chemotherapy response in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Rep Med* **3**, 100705, 2022.
  - 20) **Iwaya T, Yokobori T, Nishida N, et al.**: Downregulation of miR-144 is associated with colorectal cancer progression via activation of mTOR signaling pathway. *Carcinogenesis* **33**, 2391-2397, 2012.

## *NFE2L2* mutation is linked to chemotherapy resistance in esophageal cancer

Kohei ITO<sup>1)</sup>, Akira SASAKI<sup>1)</sup> and Takeshi IWAYA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Surgery, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

<sup>2)</sup>Department of Clinical Oncology, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

*(Received on January 17, 2023 & Accepted on February 10, 2023)*

---

### Abstract

Systemic chemotherapies have proven to be effective for treating esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). In advanced ESCC, predicting the response to primary chemotherapy is critical. In this study, we investigated the relationship between *NFE2L2* gene status and chemotherapy response in ESCC patients. A sequence analysis of 61 primary ESCCs revealed that 13 (21.3%) had mutations in *NFE2L2*. Among the 50 ESCC patients who received primary chemotherapy, objective response rate of patients with *NFE2L2* mutation (2/8, 25.0%) was significantly lower than that of patients with *NFE2L2* wild type (30/42, 71.4%) ( $p = 0.02$ ,

Fisher's exact test). Furthermore, among 43 patients who received triplet chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-FU, *NFE2L2* mutant patients ( $n = 5$ ) had a significantly lower overall survival rate than *NFE2L2* wildtype patients ( $n = 38$ ,  $p = 0.03$ , Log-rank test). *NFE2L2* mutations were also found in 4 of 11 (36.4%) ESCC cell lines. The rate of growth inhibition by anticancer drugs in *NFE2L2* mutant cells was significantly lower than in wildtype cells ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney U test). Our findings suggest that *NFE2L2* status can predict chemotherapy response in patients with ESCC.

---