

Expression and malignant potential of *B4GALNT4*
in esophageal squamous cell carcinoma

食道扁平上皮癌における *B4GALNT4* 遺伝子の発現と悪性度との関連

富山大学大学院 医学薬学教育部 生命・臨床医学専攻
馬場 逸人

目次

要旨	3
1. 要旨	5
2. 方法		
2.1 倫理	6
2.2 細胞株	6
2.3 患者および臨床検体	6
2.4 qRT-PCR	6
2.5 small interfering RNA (siRNA)を用いた B4GALNT4 のノックダウン	7
2.6 機能解析	7
2.7 B4GALNT4 遺伝子発現の臨床的意義の検討	7
2.8 B4GALNT4 蛋白に対する免疫組織学化学的検討	7
2.9 統計学的手法	8
3. 結果		
3.1 ヒト食道扁平上皮癌細胞株における B4GALNT4 mRNA の発現	9
3.2 B4GALNT4 ノックダウンがヒト食道扁平上皮癌細胞の生物学的活性に及ぼす影響	9
3.3 食道扁平上皮癌患者の臨床検体における B4GALNT4 mRNA 発現の検討	9
3.4 組織検体における B4GALNT4 mRNA 発現の臨床的意義の検討	9
3.5 食道扁平上皮癌患者の臨床検体における B4GALNT4 蛋白発現の検討	10
3.6 組織検体における B4GALNT4 蛋白発現の臨床的意義の検討	10
4. 考察	12
5. 総括	15
6. 謝辞	15
7. 参考文献	16
8. 表,図	19

要旨

目的:

食道扁平上皮癌は日本を含めたアジアに多い悪性疾患であり、世界的にも癌死亡の第6位に挙げられる重大な健康課題である。近年の集学的治療の発展にもかかわらず依然として予後不良な病態であり、更なる予後改善に向けては予後予測や新規治療につながり得る新たな癌関連遺伝子の同定が重要な研究課題といえる。

近年、細胞表面の糖タンパク質の構造変化が腫瘍発生における細胞生存、遊走、浸潤、細胞外マトリックス(ECM)接着などの悪性挙動と関連することが示唆されている。中でも腫瘍関連糖タンパク質である GalNAc β 1-4GlcNAc の生合成に関わる糖転移酵素 β -1,4-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ 4(B4GALNT4)は、いくつかの癌で発現が上昇し予後不良と関連していることが知られている。しかしながら、食道扁平上皮癌における B4GALNT4 の発現と機能は明らかにされていない。本研究では、食道扁平上皮癌における B4GALNT4 の発現、機能、および臨床的意義について検討することを目的とした。

方法および結果:

B4GALNT4 mRNA の発現に関して、17種のヒト食道扁平上皮癌細胞株を用いて qRT-PCR による解析を行なった。遺伝子発現上位であった2種の細胞株(KYSE590 および KYSE1440)を用いて、small interfering RNA (siRNA)による遺伝子ノックダウン解析を行い、B4GALNT4 遺伝子の食道扁平上皮癌細胞に対する増殖、浸潤、遊走、接着能への関与を検討した。

臨床検体を用いた検討では、147例と159例の根治切除が施行された食道扁平上皮癌患者からなる2つの独立したコホートから採取された食道組織検体を用いて、それぞれ qRT-PCR と免疫組織化学によって B4GALNT4 mRNA と蛋白の発現解析を行なった。両患者コホートにおいて、臨床病理学的因子および予後データと臨床検体における B4GALNT4 発現との関連を検討した。

B4GALNT4 mRNA の発現量は、細胞株の分化状態や由来組織(原発/転移組織由来)にかかわらず、食道扁平上皮癌細胞株により大きく変動していた。B4GALNT4 遺伝子の siRNA によるノックダウンにより、KYSE590 株において細胞増殖、遊走能は有意な低下を示した。また、B4GALNT4 遺伝子ノックダウンにより、検討した5つ全ての ECM 成分(フィブロネクチン、コラーゲン I, コラーゲン IV, ラミニン I, フィブリノーゲン)に対する KYSE590 の接着能の減弱を認めた。また、KYSE1440 株を用いた浸潤能評価では、B4GALNT4 遺伝子のノックダウンにより浸潤能が有意に抑制された。

B4GALNT4 mRNA は、食道扁平上皮癌原発組織において隣接する正常食道組織と比較して有意に発現が増加していた。B4GALNT4 mRNA の高発現は、無再発生存期間の短縮($p = 0.044$) および血行性再発の増加($p = 0.042$)と有意な関連を示した。B4GALNT4 蛋白の高発現に関しても

疾患特異的生存期間の短縮と有意に関連していた($p = 0.044$). 多変量解析においても, *B4GALNT4* mRNA の高発現は根治切除後の無再発生存に対する独立した予測因子であった(ハザード比 3.92, 95%信頼区間 1.09–14.1, $p = 0.036$). いずれの患者コホートにおいても, *B4GALNT4* mRNA および蛋白の高発現は, 病期, リンパ管侵襲, 腫瘍マーカーなどの既知の予後因子と相関を認めなかった.

総括:

B4GALNT4 遺伝子は食道扁平上皮癌細胞の悪性度に寄与しており, その減弱により癌抑制的な作用を示した. また, 食道扁平上皮癌では癌組織における *B4GALNT4* 発現亢進を認め, その発現は, 既知の危険因子とは独立した食道扁平上皮癌患者の新たな予後予測マーカーとして有用である可能性が示唆された.

1. 序論

食道癌は世界で8番目に罹患率の高い癌腫であり、癌死亡における6番目の疾患である。¹ 食道癌は組織学的に腺癌と扁平上皮癌の2種に大別され、アジアや発展途上国で多く見られる。² 近年食道扁平上皮癌に対する集学的治療戦略は大きく発展しているものの、その多臓器への転移能の高さゆえに、未だに予後不良な病態といえる。根治治療を受けた食道扁平上皮癌患者でさえ、5年生存率は40%以下と報告されている。³ 食道扁平上皮癌患者の臨床成績の向上には、患者個人に対する最適な治療選択につながるより正確な癌のリスク評価が有用な可能性がある。従って、癌の進行リスクが高い患者の同定に繋がり、かつ新たな治療標的ともなり得る食道扁平上皮癌の悪性度に関連する癌関連遺伝子の同定が重要な研究課題である。

近年、細胞表面の糖タンパク質の構造変化が腫瘍発生における細胞生存、遊走、浸潤、細胞外マトリックス(ECM)接着などの悪性挙動と関連することが示唆されている。^{4,5} N-グリカンの非還元末端に結合したアミノ二糖構造である GalNAcbeta1-4GlcNAc (LacdiNAc) は、腫瘍関連糖鎖抗原の一つであり、いくつかの癌の悪性化に寄与していると報告されている。^{4,6} さらに、LacdiNAcの形成に関与する β -1,4-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ4 (B4GALNT4) は、前立腺癌や卵巣癌など多くの癌で発現が上昇している。^{7,8} これらの癌では、LacdiNAcの発現増加は予後不良と関連しており、B4GALNT4が癌発生に寄与している可能性が示唆されている。^{4,9} しかしながら、食道扁平上皮癌におけるB4GALNT4の発現と機能は明らかにされていない。

本研究では、食道扁平上皮癌におけるB4GALNT4の発現、機能、および臨床的意義について検討することを目的とした。そのため、私は *B4GALNT4* 遺伝子の生物学的機能に関してヒトESCC細胞株を用いた siRNA によるノックダウン解析にて検討した。また、2つの独立した食道扁平上皮癌患者コホートにおいて、臨床検体における *B4GALNT4* 遺伝子および蛋白の発現を解析し、臨床病理学的特徴との関係を検討した。本研究結果は、先に学術雑誌 *Annals of Surgical Oncology* 誌において、発表したものである。¹⁰

2. 方法

2.1 倫理

本研究は、世界医師会「ヘルシンキ宣言-人を対象とする医学研究のための倫理原則」の倫理的ガイドラインに準拠し、当該研究機関における倫理審査委員会の承認を得ている。また、委員会が求める臨床検体及びデータの使用に関するインフォームドコンセントを書面にて対象患者から得た。

2.2 細胞株

以下の 17 種類のヒト扁平上皮癌細胞株を用いた: KYSE30, KYSE140, KYSE150, KYSE410, KYSE510, KYSE590, KYSE890, KYSE1170, KYSE1260 および KYSE1440 は JCRB 細胞バンクから入手(大阪, 日本); TE1, TE2, TE3, TT および TTn は the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)から入手; NUGC2 と WSSC は名古屋大学において樹立した。¹¹ すべての細胞株は、10%牛胎児血清と抗生物質を添加した RPMI-1640 培地で培養し、5%CO₂, 37°Cの環境下で維持した。

2.3 患者および臨床検体

qRT-PCR による mRNA 発現の解析には、2001 年 10 月から 2016 年 1 月の期間に名古屋大学医学部附属病院で食道根治切除術を受けた食道扁平上皮癌患者 147 例から採取した原発組織と隣接した正常組織を用いた。根治的切除は、病理学的に I~III 期と診断された患者に対して行われた。組織標本は切除後直ちに凍結し-80°Cで保存し、標本は UICC 食道癌病期分類第 8 版による組織分類に基づき、扁平上皮癌であることを確認した。¹² II 期または III 期の患者 109 人のうち 70 人には、2006 年から標準的に推奨されている FP 療法が術前補助化学療法として行われた。

免疫組織化学(IHC)による蛋白質発現の解析には、2000 年 2 月から 2011 年 7 月の期間に秋田大学医学部附属病院で食道根治切除術を受けた食道扁平上皮癌患者 159 例から採取した原発組織を用いた。この患者群では術前治療は施行されなかった。パラフィン包埋した組織標本からパソロジー研究所(富山, 日本)において組織マイクロアレイ(TMA)を作成し、¹³⁻¹⁵ これを解析に用いた。

2.4 qRT-PCR

147 名の患者コホートの組織における *B4GALNT4* mRNA の発現レベルは、Table 1 に示す特異的プライマーを用いて、既報で用いた方法に従い qRT-PCR 解析を行なった。¹⁶ 内部標準には、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(*GAPDH*) mRNA を用いて、各サンプルにお

ける相対的な *B4GALNT4* mRNA 発現レベルを算出した. qRT-PCR 解析データの外部検証として, The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録された食道扁平上皮癌 96 症例のデータセットを解析した.¹⁶

2.5 small interfering RNA (siRNA)を用いた *B4GALNT4* のノックダウン

KYSE590 を 24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/ml でプレーティングし, 一晚インキュベートした後, LipoTrust EX Oligo(北海道システム科学, 札幌, 日本)を用いて 20nM の siRNA(Table 1)で一過性にトランスフェクトさせた. また, KYSE1440(1×10^5 cells/ml)にエレクトロポレーション法 (Neon System, Thermo Fisher Scientific, Walham, MA, USA)を用いて siRNA をトランスフェクションさせた. トランスフェクション後, 機能解析に使用する前に, 抗生物質を含まない RPMI-1640 培地で細胞を 48 時間培養した.

2.6 機能解析

細胞増殖能は Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所, 熊本, 日本), 浸潤能は BioCoat Matrigel invasion chambers (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), 接着能は CytoSelect 48-Well Cell Adhesion Assay (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA) で測定し, 遊走能は wound-healing assay (ibidi GmbH, Martinsried, Germany) を用いて測定した. 方法論に関しては, 先行論文で述べた通りである.^{18,19} wound-healing assay では, 各ウェルの創傷幅を 100 mm 間隔として 20 回測定した. 細胞増殖, 遊走, 接着能は KYSE590 を用いて, 浸潤能は KYSE1440 を用いて測定した.

2.7 *B4GALNT4* 遺伝子発現の臨床的意義の検討

全 147 名の解析対象患者から得られた *B4GALNT4* mRNA 発現量の中央値をカットオフ値として, 患者を *B4GALNT4* 高発現群(> 中央値), 低発現群(\leq 中央値)の 2 群に層別化した. 2 群間で臨床病理学的因子および無再発生存期間(DFS), 疾患特異的生存期間(DSS), 再発パターン特異的生存期間を含む予後の比較検討を行なった.

2.8 *B4GALNT4* 蛋白に対する免疫組織学化学的検討

TMA ブロックを切片化し, ChemMate 抗体希釈剤(Dako, Carpinteria, CA, USA)で 1:250 に希釈したウサギポリクローナル *B4GALNT4* 抗体(orb546266, Biorbyt Ltd., Cambridge, UK)を付加した後, 室温で 1 時間インキュベートした. *B4GALNT4* 蛋白発現の半定量化のために, 臨床データを盲検化された 2 名の研究者が組織染色を評価し, HER2 IHC スコアシステムに基づくスコアを割り付けた. タンパク質発現は, 3+(細胞の 30%以上に強い細胞質または核染色), 2+(細胞の 10%

以上に中程度の細胞質または核染色), 1+(細胞の 10%未満に弱い染色), 0(染色なし、陰性)としてスコア化された。²⁰

2.9 統計学的手法

データは Mann-Whitney U 検定または χ^2 検定で 2 群間比較した。DFS, DSS, 再発パターン特異的生存率は Kaplan-Meier 法で算出し, Cox 比例ハザードモデルで解析した。予後因子の一変量回帰分析は Cox 比例ハザードモデルを用いて行い, $p < 0.05$ であった因子を最終的な多変量モデルに含めた。すべての統計解析は, JMP 14 ソフトウェア (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

3. 結果

3.1 ヒト食道扁平上皮癌細胞株における *B4GALNT4* mRNA の発現

ヒト食道扁平上皮癌細胞株 17 株における *B4GALNT4* mRNA の発現量を qRT-PCR で解析した。発現量は細胞株によって大きく異なり、細胞の分化度 ($p = 0.500$) や、転移組織由来株 (KYSE1170, KYSE1260, TT および TTn) と原発組織由来株との間 ($p = 0.571$) では有意差は認められなかった (Figure 1a)。

3.2 *B4GALNT4* ノックダウンがヒト食道扁平上皮癌細胞の生物学的活性に及ぼす影響

B4GALNT4 mRNA の発現量が最も高かった 6 つの細胞株 (KYSE590, KYSE1440, KYSE1170, KYSE890, TT, KYSE510) において、siRNA による *B4GALNT4* のノックダウン効率を検討した。qRT-PCR 分析により KYSE590 でのみ 50% 以上のノックダウン効率が観察された (Figure 1b)。そこで、コントロール siRNA または *B4GALNT4*-siRNA を発現させた KYSE590 を用いて、細胞増殖、遊走、接着能の評価を行うこととした。KYSE590 はマトリゲル層を貫通する能力がないため、浸潤能の評価には KYSE590 に次いでノックダウン効率が高かった KYSE1440 を用いることとした (Figure 1b)。

B4GALNT4 ノックダウンにより、KYSE590 の細胞増殖および遊走能は有意に減少し (Figure 1c,d)、KYSE1440 の浸潤はコントロール細胞と比較して有意に阻害された (Figure 1e)。さらに、*B4GALNT4* ノックダウンにより、調べた 5 つ全ての ECM 成分 (フィブロネクチン、コラーゲン I、コラーゲン IV、ラミニン I、フィブリノーゲン) に対する KYSE590 の接着能が減弱した (Figure 1f)。

3.3 食道扁平上皮癌患者の臨床検体における *B4GALNT4* mRNA 発現の検討

147 人の患者のうち、男性 116 人女性 31 人であり、年齢の中央値は 65 歳 (44–84 歳) であった。患者の 87% (128 人) は分化型扁平上皮癌と診断され、残りが未分化型であった。病理学的病期が I, II, III の患者数は、それぞれ 38, 41, 68 人であった。術前補助化学療法は 70 例 (48%) に施行された。追跡期間中央値は 49.7 カ月で、この間に 58 人 (39%) が再発、54 人 (37%) が病気で死亡した。

食道癌原発組織と隣接正常食道組織のペアサンプル 147 検体における *B4GALNT4* mRNA の発現を qRT-PCR で解析した。*B4GALNT4* mRNA 発現量は、147 例中 117 例 (81%) で正常組織と比較して原発組織で高く、発現レベルに有意差を認めた ($p < 0.001$, Figure 2a)。TCGA データベースを用いた食道扁平上皮癌 96 例の外部検証コホートで *B4GALNT4* mRNA 発現を解析したところ、同様の結果が得られた ($p < 0.001$, Figure 2a)。

3.4 組織検体における *B4GALNT4* mRNA 発現の臨床的意義の検討

食道扁平上皮癌患者 147 名を *B4GALNT4* mRNA 高発現群と低発現群に二分し、臨床病理学的因子の関係を解析した。Table 2 に示すように、*B4GALNT4* mRNA 発現は腫瘍の局在とのみ有意に関連を認めた。

生存解析では、*B4GALNT4* 高発現群で DFS は有意に短かった ($p = 0.044$, Figure 2a)。DSS についても同様の傾向が見られたが、統計的有意差は認めなかった ($p = 0.188$, Figure 2a)。興味深いことに、*B4GALNT4* 高発現は血行性再発 ($p = 0.045$) および全再発 ($p = 0.037$) と有意に関連していたが、リンパ節および局所再発のパターンとは関連がなかった (Figure 2c)。血行性再発の累積発生率は、*B4GALNT4* 高発現群で、低発現群と比較して有意に高かった ($p = 0.042$, Figure 2d)。また、多変量 Cox 回帰分析により、*B4GALNT4* 高発現は根治的切除後の DFS の独立した予後因子であることが示された (ハザード比 3.92, 95% 信頼区間 1.09–14.1, $p = 0.036$; Table 3)。

次いで、年齢、性別、UICC ステージ、腫瘍の分化度および術前化学療法の有無で層別化したサブグループ解析を行い、*B4GALNT4* 発現の DFS に対する予測効果を検討した。その結果、いずれのサブグループにおいても有意な相互作用は認められなかったが (Figure 3)、未分化群および術前化学療法施行群の患者で *B4GALNT4* 発現の DFS に対する予測効果が減弱する可能性があることが示された。

3.5 食道扁平上皮癌患者の臨床検体における *B4GALNT4* 蛋白発現の検討

B4GALNT4 mRNA の発現解析で得られた結果を検証するために、I–III 期の食道扁平上皮癌に対して根治的切除を受けた 159 例の独立したコホート (秋田大学) において作成した TMA で IHC による *B4GALNT4* 蛋白の発現解析を行なった。159 名のうち 137 名 (86%) が男性で、年齢中央値は 66 歳 (38–82 歳) であった。qRT-PCR で評価した 147 症例と同様に、大多数 (111 人) は分化型で、残りが未分化型であった。全例が病理学的にも I, II, III 期であった (それぞれ 10, 44, 105 例)。

B4GALNT4 蛋白の IHC 染色は、発現強度、局在、範囲を 0 から 3+ のスケールで評価する半定量的な方法を用いて評価した。Figure 4a に、*B4GALNT4* 蛋白発現が陰性 (0) および陽性 (1+, 2+, 3+) の代表画像を示す。159 例のうち、*B4GALNT4* 蛋白発現レベルについて、3 例 (2%)、45 例 (28%)、84 例 (53%)、27 例 (17%) がそれぞれ 0, 1+, 2+, 3+ とスコア化された。

3.6 組織検体における *B4GALNT4* 蛋白発現の臨床的意義の検討

腫瘍組織における *B4GALNT4* 蛋白発現レベルと臨床因子との関連を分析するために、159 人の患者を *B4GALNT4* 蛋白低発現 (0 あるいは 1+; $n=48$) と *B4GALNT4* 蛋白高発現 (2+ あるいは 3+; $n=111$) に 2 分し、臨床病理学因子との相関を評価した。しかし、検討した臨床病理学的因子はいずれも *B4GALNT4* 蛋白発現レベルとは有意な相関は認められなかった (Table 4)。生存解

析では, B4GALNT4 蛋白高発現群で DSS は低発現群と比較して有意に短く($p = 0.044$), DFS も有意ではないものの同様の傾向が見られた($p = 0.059$)(Figure 4b).

4. 考察

本研究では, *in vitro* での機能解析および臨床検体での発現解析を行うことで, B4GALNT4 発現の食道扁平上皮癌の悪性度への関連を検討した. *in vitro* ではヒト食道扁平上皮癌細胞株で B4GALNT4 をノックダウンすることにより, 細胞増殖, 遊走, 浸潤, ECM 接着能が有意に低下することを示した. また, 臨床検体を用いた解析では, 癌組織での B4GALNT4 mRNA および蛋白高発現が癌の再発および予後と有意に関連することを示した. これらの結果は, B4GALNT4 が食道扁平上皮癌の悪性化に関与していることを示し, また癌部の B4GALNT4 発現が有用な予後マーカーとなる可能性を示唆するものであった.

ヒト染色体 11p15.5 に位置する B4GALNT4 遺伝子は, 腫瘍関連糖タンパク質 LacdiNAc の生合成に関わる糖転移酵素をコードしており,⁴ 前立腺癌, 乳癌, 肺癌で発現亢進が報告されている.^{8,21,22} B4GALNT4 発現の臨床的意義は, 特に前立腺癌においてよく研究されており, B4GALNT4 は前立腺癌の発癌過程における前立腺特異抗原の β -N-アセチルガラクトサミン化に関与し,⁷ B4GALNT4 の過剰発現は予後不良と関連している.²³ しかしながら, 食道扁平上皮癌における B4GALNT4 の発現と機能についてはこれまで報告されてこなかった.

細胞表面糖タンパク質の糖鎖構造の変化は, 細胞-細胞間および細胞-ECM 間の相互作用の調節に重要な役割を果たすことが知られている. ECM タンパク質は, 細胞表面のインテグリンファミリーのリガンドであり, インテグリンのシグナル伝達は, 細胞の生存, 遊走, 浸潤を制御することが知られている.²⁴ 近年, 糖転移酵素がインテグリンのグリコシル化などの機序により, 癌細胞の挙動を制御することが報告されている.²⁵⁻²⁷ 実際, B4GALNT4 とアミノ酸レベルで 43% の相同性を持ち LacdiNAc の形成に関与する B4GALNT3 は, 結腸癌で過剰発現し, インテグリン活性化およびマイトジェン活性化タンパク質キナーゼシグナル経路を通じてその悪性表現型を高めることが報告された.²⁸ Che らによる研究では, B4GALNT3 の過剰発現は, *in vitro* において結腸癌細胞の増殖, 遊走, 浸潤を促すとともに ECM 接着を減弱させ, マウス異種移植モデルでの血行性転移と関連していた. B4GALNT4 は B4GALNT3 と比較的高い相同性を持つことから, 本研究の結果はこれらの結果と一致し, さらに B4GALNT4 の高発現は, おそらく細胞表面の糖タンパク質構造の変化を介して食道扁平上皮癌の悪性表現型と関連していることが示唆された.

本研究では, 食道扁平上皮癌患者の 2 つの独立したコホートにおいて, 腫瘍の B4GALNT4 mRNA および蛋白発現の予後因子としての可能性を検証した. 興味深いことに, B4GALNT4 の高発現は予後不良と有意に関連していたが, いずれのコホートにおいても, リンパ管侵襲や腫瘍マーカー高値, UICC 病期といった既存の予後因子とは相関しなかった.²⁹ この知見は, B4GALNT4 が食道扁平上皮癌患者の新規予後マーカーとして重要であることを示唆するものである. 現在, 食道扁平上皮癌の治療方針は, 主に TNM 分類によって決定されているが, TNM 分類が同一の患者でも臨床経過は大きく異なり,^{30,31} 最適な治療を行うためには, より正確なリスク

層別化が必要である。この点から、B4GALNT4 の発現は、確立されたリスク因子のみでは拾い上げられない高リスク患者の同定に役立つ可能性がある。言い換えれば、今回の結果は、B4GALNT4 の発現が増加している食道扁平上皮癌患者は、癌の早期段階においても予後不良の高リスク群に分類すべきかもしれないことを示している。検討した臨床病理学的因子の範囲では、腫瘍の局在のみが B4GALNT4 発現と有意に関連していた。胃癌や大腸癌などの消化器癌では、腫瘍の位置によって遺伝子シグネチャーが異なることが報告されている。^{32,33} B4GALNT4 の発現と腫瘍の位置との関連の理由を明らかにするためには、B4GALNT4 遺伝子座の体細胞変異やコピー数の状態を解析することが必要かもしれない。

今回の結果は、食道癌組織における B4GALNT4 発現に関して 2 つの臨床応用の可能性を示している。第一に、B4GALNT4 発現は、術前補助化学療法の最適化につながる可能性がある。サブグループ解析では、相互作用は統計的に有意ではなかったものの、術前補助化学療法は B4GALNT4 高発現患者の DFS を改善する可能性があることが示された。418 人の食道扁平上皮癌患者を対象とした研究では、術前補助化学療法は手術単独と比較して根治手術後の血行性再発を減少させると報告されている。³⁴ したがって、診断時の生検検体において B4GALNT4 高発現が確認できれば、そうした症例に対しては血行性転移を防ぐ観点から術前補助化学療法がより有益な効果を持つ可能性がある。基本的に、日本では術前補助化学療法は I 期の患者に対する標準的な治療法ではない。しかし、B4GALNT4 高発現患者の 26% が I 期の食道扁平上皮癌であっても再発をきたしていることを考慮すると、術前補助化学療法はこの集団に対しても適応を検討すべきとも言える。上皮性卵巣癌の最近の研究では、B4GALNT4 mRNA の発現が白金製剤感受性癌で白金製剤耐性癌よりも有意に上昇することが報告されている。³⁵ B4GALNT4 発現が薬剤感受性に及ぼす影響についてはさらなる研究が必要であるが、術前補助化学療法と同様に術後補助化学療法も B4GALNT4 発現の高い食道扁平上皮癌患者に対しては有用かもしれない。第二に、手術検体中の B4GALNT4 高発現である患者に対しては、術後再発、特に血行性再発の早期発見を可能にするため、頻繁な経過観察が有効である可能性がある。肝臓や骨への血行性転移の早期発見は造影 CT のみでは困難であり、B4GALNT4 高発現患者には Gd-EOB-DTPA 強調 MRI や PET-CT など併せて検討することが有用かもしれない。また、今回の検討では IHC においても B4GALNT4 発現の評価が可能であることを示した。IHC は PCR 法よりも現時点では実用的であるため、B4GALNT4 発現の測定が広く適用できることを示唆している。術前生検組織や外科的切除組織を用いた B4GALNT4 の IHC によるリスク評価は、食道扁平上皮癌の予後改善に寄与し得る有望なツールとなるかもしれない。

一方で、本研究にはいくつかの limitation がある。第一に、我々は糖タンパク質の構造解析やヒト食道扁平上皮癌細胞におけるシグナル伝達経路の検討を行っていない。これらは、我々の in vitro での所見の基礎となる分子メカニズムに光を当てることとなり、B4GALNT4 高発現と予後の

関連性を説明する上で、重要な知見を与えることになると考えられる。第二に、今回の臨床分析はレトロスペクティブであった。第三に、今回私は患者を B4GALNT4 高発現群/低発現群に層別化するためのカットオフ値として発現レベルの中央値を用いたが、臨床応用にはより大規模な研究から得られたカットオフ値が必要であろう。特に、B4GALNT4 高発現患者における術前補助化学療法 of 潜在的な有効性についてはより大規模な患者コホートでさらに検討する必要がある。さらに、外科的に切除された組織検体は少なくとも部分的には術前補助化学療法によって修飾されていたので治療前に生検サンプルを用いてさらなる検討を行うことが望まれる。

5. 総括

本研究の結果は、B4GALNT4 が食道扁平上皮癌の悪性化に関与していることを示し、B4GALNT4 の発現が食道扁平上皮癌患者における新たな予後マーカーとなる可能性を示唆するものである。

6. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して御指導いただきました富山大学消化器・腫瘍・総合外科藤井努教授をはじめ、スタッフの皆様に感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、多くのご支援を賜りました名古屋大学医学部消化器外科学小寺泰弘教授ならびに神田光郎講師、スタッフの皆様に感謝申し上げます。

7. 参考文献

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136: E359–386.
2. Malhotra GK, Yanala U, Ravipati A, Follet M, Vijayakumar M, Are C. Global trends in esophageal cancer. *J Surg Oncol*. 2017; 115: 564–579.
3. Chapman BC, Weyant M, Hilton S, et al. Analysis of the National Cancer Database Esophageal Squamous Cell Carcinoma in the United States. *Ann Thorac Surg*. 2019; S0003–4975: 31006–31009.
4. Hirano K, Matsuda A, Shirai T, Furukawa K. Expression of LacdiNAc groups on N-glycans among human tumors is complex. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:981627.
5. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004; 5: 816–26.
6. Che MI, Huang J, Hung JS, et al. β 1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase III modulates cancer stemness through EGFR signaling pathway in colon cancer cells. *Oncotarget*. 2014; 5: 3673–84.
7. Fukushima K, Satoh T, Baba S, Yamashita K. alpha1,2-Fucosylated and beta-N-acetylgalactosaminylated prostate-specific antigen as an efficient marker of prostatic cancer. *Glycobiology*. 2010; 20: 452–60.
8. Anugraham M, Jacob F, Everest-Dass AV, et al. Tissue glycomics distinguish tumour sites in women with advanced serous adenocarcinoma. *Mol Oncol*. 2017; 11: 1595–615.
9. Hagiwara K, Tobisawa Y, Kaya T, et al. Wisteria floribunda Agglutinin and Its Reactive-Glycan-Carrying Prostate-Specific Antigen as a Novel Diagnostic and Prognostic Marker of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017; 18: 261.
10. Baba H, Kanda M, Sato Y, et al. Expression and Malignant Potential of B4GALNT4 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2020; 27: 3247–56.
11. Tsunoo H, Komura S, Ohishi N, et al. Effect of transfection with human interferon-beta gene entrapped in cationic multilamellar liposomes in combination with 5-fluorouracil on the growth of human esophageal cancer cells in vitro. *Anticancer Res*. 2002; 22: 1537-43.
12. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition. James DB, Mary KG, Christian W, eds. New York:Wiley-Blackwell, 2016: 57–62.

13. Sato Y, Marzese DM, Ohta K, Huang SK, Sim MS, Chong K, and Hoon DS. Epigenetic regulation of REG1A and chemosensitivity of cutaneous melanoma. *Epigenetics*. 2013; 8:1043–52.
14. Sato Y, Motoyama S, Nanjo H, et al. REG1A expression status suggests chemosensitivity among advanced thoracic esophageal squamous cell carcinoma patients treated with esophagectomy followed by adjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20:3044–51.
15. Sato Y, Motoyama S, Nanjo H, et al. CXCL10 expression status is prognostic in patients with advanced thoracic esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2016; 23:936–42.
16. Kanda M, Shimizu D, Tanaka H, et al. Significance of SYT8 for the detection, prediction, and treatment of peritoneal metastasis from gastric cancer. *Ann Surg*. 2018; 267:495–503.
17. NATIONAL CANCER INSTITUTE: The Cancer Genome Atlas Program. <https://www.cancer.gov/tcga>. Accessed on 21st October 2019.
18. Kanda M, Tanaka H, Shimizu D, et al. SYT7 acts as a driver of hepatic metastasis formation of gastric cancer cells. *Oncogene*. 2018; 37:5355–66.
19. Uno Y, Kanda M, Sato Y, et al. Expression, Function, and prognostic value of MAGE-D4 protein in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2019; 39:6015–23.
20. Sato Y, Motoyama S, Wakita A, et al. TLR3 expression status predicts prognosis in patients with advanced thoracic esophageal squamous cell carcinoma after esophagectomy. *Am J Surg*. 2018; 216:319–25.
21. Potapenko IO, Haakensen VD, Lüders T, et al. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol Oncol*. 2010; 4:98–118.
22. Zhang F, Chen X, Wei K, et al. Identification of Key Transcription Factors Associated with Lung Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit*. 2017; 23:172–206.
23. Pudova EA, Lukyanova EN, Nyushko KM, et al. Differentially Expressed Genes Associated With Prognosis in Locally Advanced Lymph Node–Negative Prostate Cancer. *Front Genet*. 2019; 10:730.
24. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004; 5:816–26.
25. Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, Bellis SL. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res*. 2005; 65:4645–52.

26. Clément M, Rocher J, Loirand G, Le Pendu J. Expression of sialyl-Tn epitopes on beta1 integrin alters epithelial cell phenotype, proliferation and haptotaxis. *J Cell Sci.* 2004; 117:5059–69.
27. Huang MC, Chen HY, Huang HC, et al. C2GnT-M is downregulated in colorectal cancer and its re-expression causes growth inhibition of colon cancer cells. *Oncogene.* 2006; 25:3267–76.
28. Che MI, Huang J, Hung JS, et al. β 1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase III modulates cancer stemness through EGFR signaling pathway in colon cancer cells. *Oncotarget.* 2014; 5:3673–84.
29. Baba H, Kanda M, Sawaki K, et al. PRAME Expression as a Potential Biomarker for Hematogenous Recurrence of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2019; 39:5943–51.
30. Wang C, Wang J, Chen Z, Gao Y, He J. Immunohistochemical prognostic markers of esophageal squamous cell carcinoma: a systematic review. *Chin J Cancer.* 2017; 36:65.
31. Xiao Z, Jia Y, Jiang W, Wang Z, Zhang Z, Gao Y. FOXM1: A potential indicator to predict lymphatic metastatic recurrence in stage IIA esophageal squamous cell carcinoma. *Thorac Cancer.* 2018; 9:997–1004.
32. Kupcinskaite-Noreikiene R, Ugenskiene R, Noreika A, et al. Gene methylation profile of gastric cancerous tissue according to tumor site in the stomach. *BMC Cancer.* 2016; 16: 40.
33. Maus MK, Hanna DL, Stephens CL, et al. Distinct gene expression profiles of proximal and distal colorectal cancer: implications for cytotoxic and targeted therapy. *Pharmacogenomics J.* 2015; 15: 354–62.
34. Oppedijk V, van der Gaast A, van Lanschot JJ, et al. Patterns of recurrence after surgery alone versus preoperative chemoradiotherapy and surgery in the CROSS trials. *J Clin Oncol.* 2014;32:385–91.
35. Sohda M, Kuwano H. Current Status and Future Prospects for Esophageal Cancer Treatment. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2017; 23: 1–11.
36. Veskimäe K, Scaravilli M, Niininen W, et al. Expression Analysis of Platinum Sensitive and Resistant Epithelial Ovarian Cancer Patient Samples Reveals New Candidates for Targeted Therapies. *Transl Oncol.* 2018; 11: 1160–70.

8. 表, 図

Table 1. Sequences of primers and siRNAs

	Experiment	Type	Sequence (5' - 3')	Product size	Annealing temperature
<i>B4GALNT4</i>	qRT-PCR	forward	TGGTGAGAGAAGCTGACCAGTG	183 bp	60 ° C
		reverse	GGGTGTCTGATGGGTGAAGT		
	siRNA	si <i>B4GALNT4</i> -1	GGUUCUAUAAAUACAUGAATT		
		si <i>B4GALNT4</i> -2	CGGUGAAGAAGAUCCGUAATT		
		si <i>B4GALNT4</i> -3 (siControl)	AAAUUUCACAGAAAUCAUCGC GUACCUUGACAGUACCGAUTT		
<i>GAPDH</i>	qRT-PCR	forward	GAAGGTGAAGGTCCGAGTC	226 bp	60 ° C
		probe	CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC		
		reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTTC		

B4GALNT4, beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 4; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. qRT-PCR, quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction; siRNA, small interfering RNA; bp, base pair.

Table 2. Association between *B4GALNT4* mRNA expression level and clinicopathological parameters in the 147-patient institutional cohort

Variables	High B4GALNT4 mRNA		Low B4GALNT4 mRNA	<i>P</i>
	in ESCC tissue (n)		in ESCC Tissue (n)	
Age (year)	< 65	33	33	0.941
	≥ 65	40	41	
Sex	Male	59	57	0.573
	Female	14	17	
Smoking history	Present	54	50	0.393
	Absent	19	24	
Double cancer	Present	11	19	0.111
	Absent	62	55	
Tumor location	Ce, Ut, Mt	51	38	0.022
	Lt, Ae	22	36	
Tumor multiplicity	Present	8	7	0.764
	Absent	65	67	
Tumor size (mm)	< 50	43	42	0.792
	≥ 50	30	32	
CEA (ng/ml)	≤ 5	64	69	0.250
	> 5	9	5	
SCC (IU/ml)	≤ 1.5	42	50	0.209
	> 1.5	31	24	
pT	T1 or T2	33	28	0.365
	T3 or T4	40	46	
Lymph node metastasis	Present	54	50	0.393
	Absent	19	24	
Differentiation	Differentiated	61	67	0.207
	Undifferentiated	12	7	
Lymphatic involvement	Present	54	50	0.393
	Absent	19	24	
Vascular invasion	Present	24	30	0.335
	Absent	49	44	

Intraepithelial	Present	19	18	0.267
progress	Absent	13	21	
Pathological UICC	I	20	18	0.671
stage	II-III	53	56	
Neoadjuvant	Present	39	38	0.937
chemotherapy	Absent	35	35	

CEA, Carcinoembryonic antigen; SCC, Squamous cell carcinoma-related antigen; CI, confidence interval;

Table 3. Prognostic factors associated with disease-free survival of ESCC patients

	Univariate			Multivariate		
	Hazard ratio	95%CI	<i>p</i> -Value	Hazard ratio	95%CI	<i>p</i> -Value
Age (≥ 65 years)	1.47	0.86–2.50	0.156			
Sex (male)	1.07	0.57–2.02	0.837			
Smoking	0.79	0.46–1.37	0.406			
Tumor location (lower)	1.10	0.65–1.87	0.729			
Double cancer	1.07	0.50–1.77	0.842			
Tumor multiplicity	0.85	0.34–2.12	0.725			
Tumor size (≥ 50 mm)	1.10	0.66–1.84	0.720			
CEA (> 5 ng/ml)	0.49	0.15–1.56	0.228			
SCC (> 1.5 IU/ml)	1.74	1.04–2.92	0.036	1.69	0.99–2.89	0.056
Tumor depth (pT3–4)	1.77	1.02–3.07	0.041			
Lymph node metastasis	2.56	1.42–4.61	0.002	1.72	0.91–3.26	0.095
Tumor differentiation (undifferentiated)	1.45	0.73–2.87	0.283			
Lymphatic involvement	4.01	1.82–8.84	< 0.001	2.90	1.21–6.95	0.017
Vascular invasion	1.80	1.08–3.03	0.025	1.43	0.83–2.48	0.197
Intraepithelial progress	0.79	0.39–1.62	0.525			
Neoadjuvant chemotherapy	1.12	0.67–1.88	0.657			
Postoperative adjuvant chemotherapy	1.01	0.55–1.84	0.977			
High <i>B4GALNT4</i> expression	1.72	1.01–2.91	0.044	1.92	1.12–3.29	0.017

CEA, carcinoembryonic antigen; SCC, squamous cell carcinoma-related antigen; CI, confidence interval; B4GALNT4, beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 4.

Table 4. Association between B4GALNT4 protein expression level and clinicopathological parameters in the 159-patient institutional cohort

Variables		High B4GALNT4 mRNA in ESCC tissue (n)	Low B4GALNT4 mRNA in ESCC Tissue (n)	<i>P</i>
Age (year)	< 65	47	20	0.937
	≥ 65	64	28	
Sex	Male	94	43	0.412
	Female	17	5	
Smoking history	Present	86	37	0.957
	Absent	25	11	
Tumor location	Ut, Mt	76	30	0.464
	Lt	35	18	
pT	T2 or T3	104	47	0.263
	T4	7	1	
Lymph node metastasis	Present	82	28	0.052
	Absent	29	20	
Differentiation	Differentiated	75	36	0.349
	Undifferentiated	36	12	
Lymphatic involvement	Present	109	47	0.905
	Absent	2	1	
Vascular invasion	Present	101	44	0.831
	Absent	8	3	
Pathological UICC stage	I	5	5	0.159
	II-III	106	43	

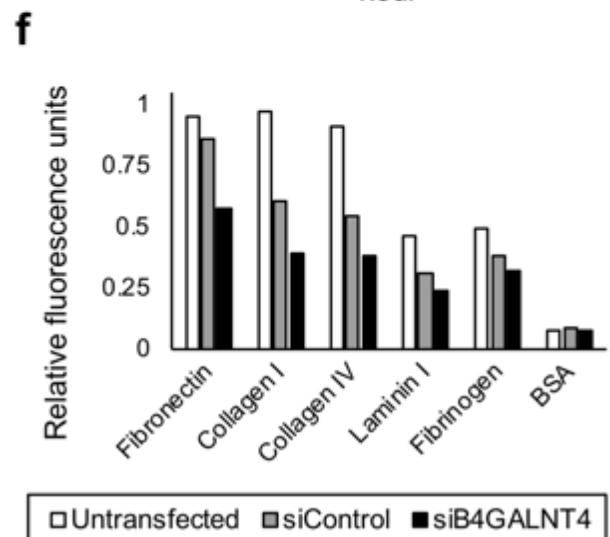
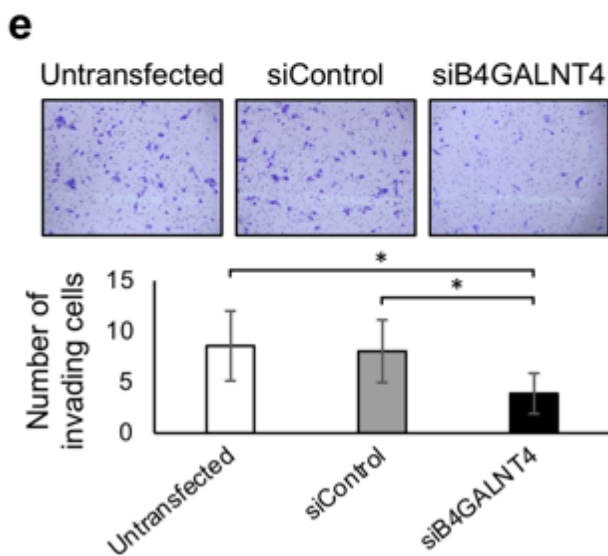
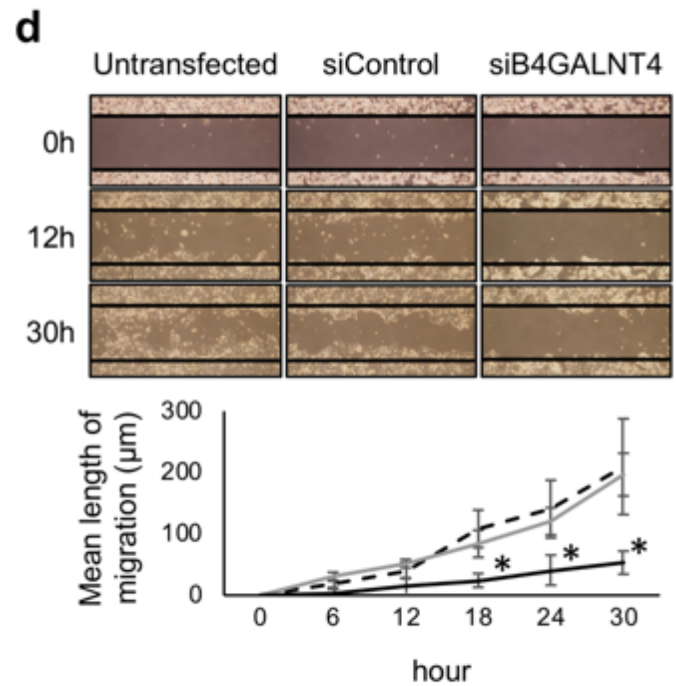
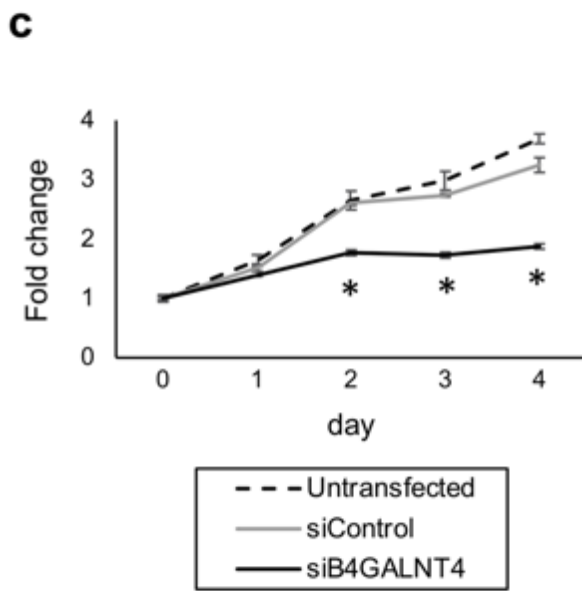
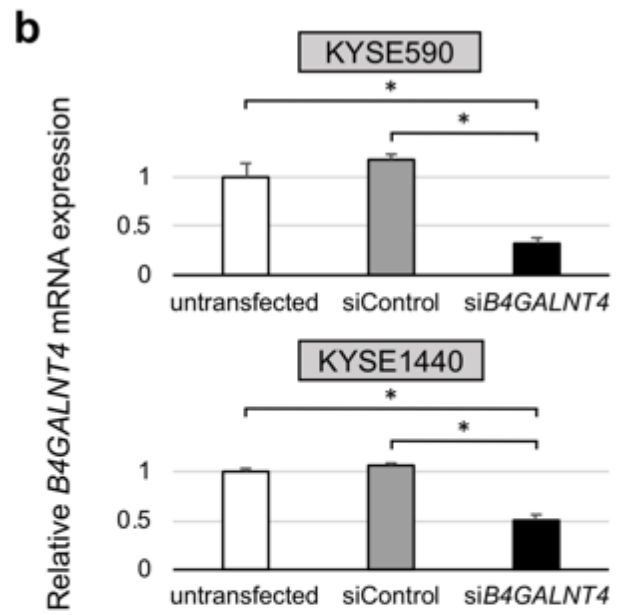
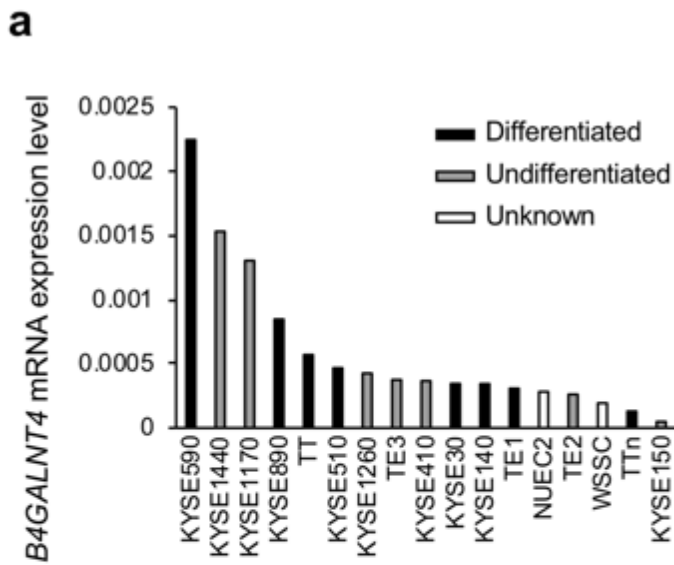
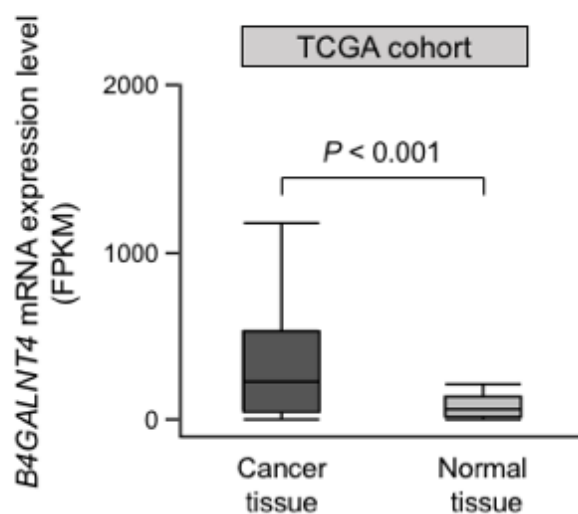
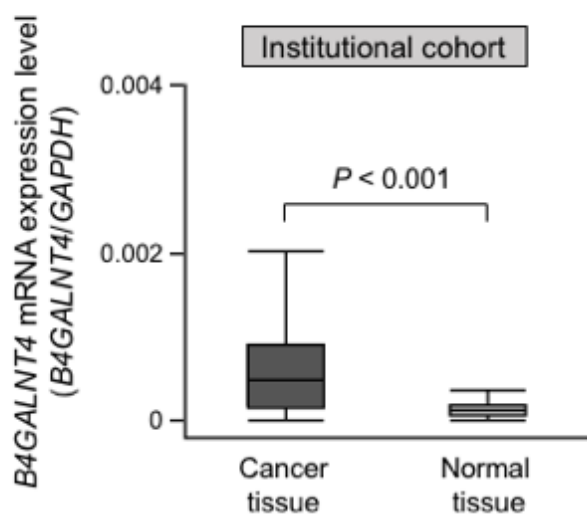
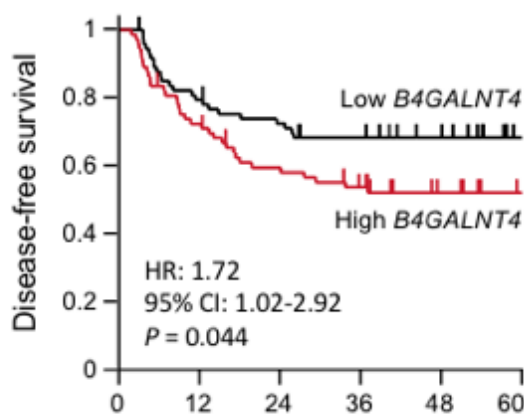
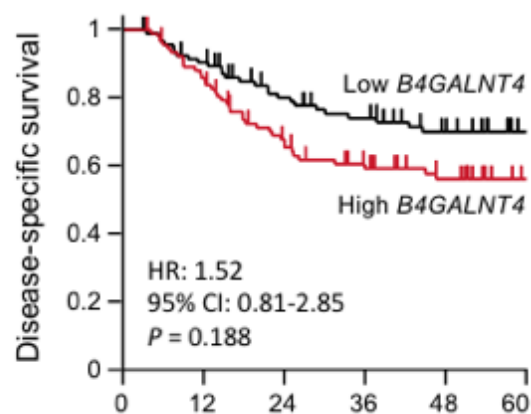


Figure 1. Expression of *B4GALNT4* and effects of *B4GALNT4* knockdown in ESCC cells.

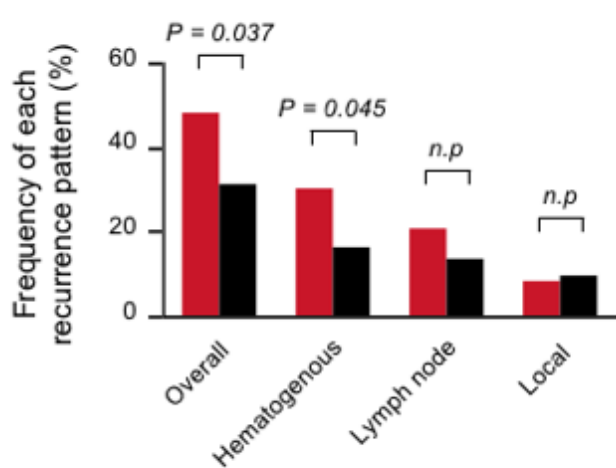
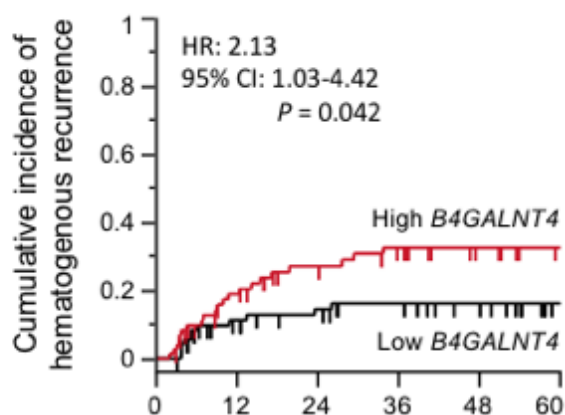
(a) *B4GALNT4* mRNA levels in 17 ESCC cell lines. **(b)** siRNA-mediated knockdown efficiency of *B4GALNT4* in KYSE590 and KYSE1440 cells. **(c)** Proliferation of KYSE590 cells with and without siRNA-mediated *B4GALNT4* knockdown. **(d)** Wound-healing assay of KYSE590 cells. Upper panels show representative images of cells and the lower graph shows the mean migration distance at the indicated times. **(e)** Invasion assay of KYSE1440 cells. Upper panels show representative images of stained cells ($\times 200$ magnification). Lower graph shows the mean number of invading cells in eight randomly selected fields. **(f)** Assay of KYSE590 cell adhesion to extracellular matrix proteins or bovine serum albumin (BSA, control). Data are presented as the mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$.

a**b****No. at risk**

Low B4GALNT4	74	59	53	48	43	33
High B4GALNT4	73	53	42	36	28	23

**No. at risk**

Low B4GALNT4	74	70	60	53	45	35
High B4GALNT4	73	67	53	43	32	25

c**d****No. at risk**

Low B4GALNT4	74	59	48	43	43	33
High B4GALNT4	73	53	42	36	28	23

Figure 2. Expression and prognostic value of *B4GALNT4* mRNA in ESCC tissue.

(a) qRT-PCR analysis of *B4GALNT4* mRNA expression in ESCC tissues and adjacent normal esophageal tissues from the Nagoya University cohort (n=147, left) and the external validation cohort from The Cancer Genome Atlas (TCGA) (n=96, right). **(b)** Kaplan-Meier analysis of disease-free and disease-specific survival of 147 patients who underwent radical resection for stage I-III ESCC. **(c, d)** Frequency of the sites of initial recurrence **(c)** and the cumulative incidence of hematogenous recurrence **(d)** in 147 patients after radical resection.

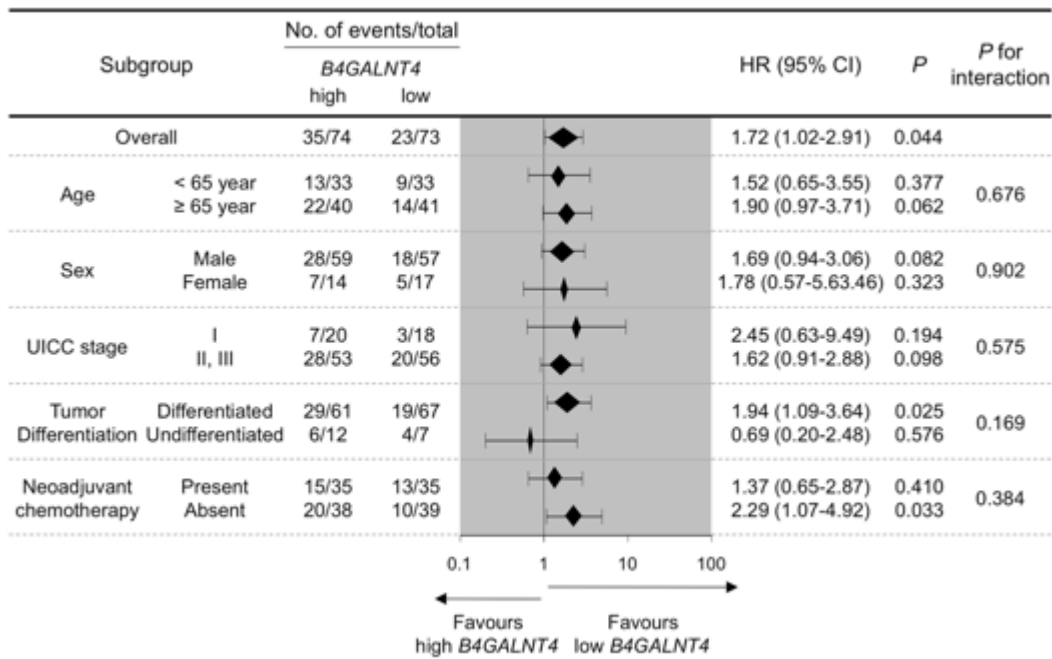
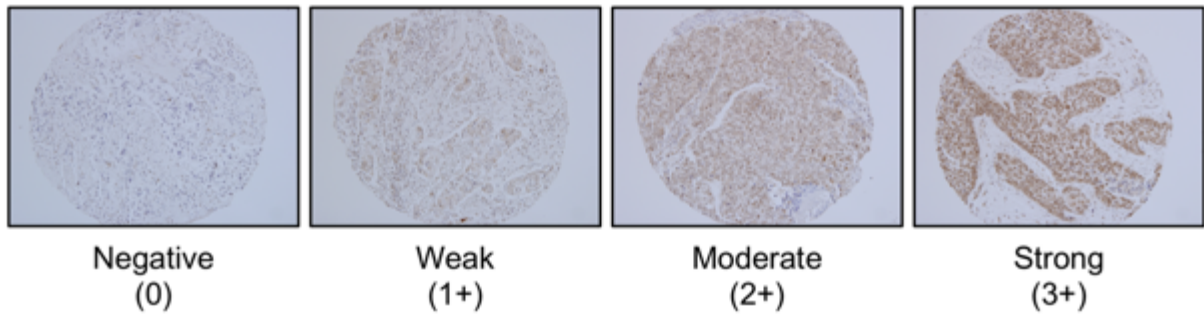


Figure 3. Subgroup analysis of the predictive value of *B4GALNT4* mRNA expression for disease-free survival.

Forest plot of the association of factors with disease-free survival in 147 patients after radical surgery. HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

a



b

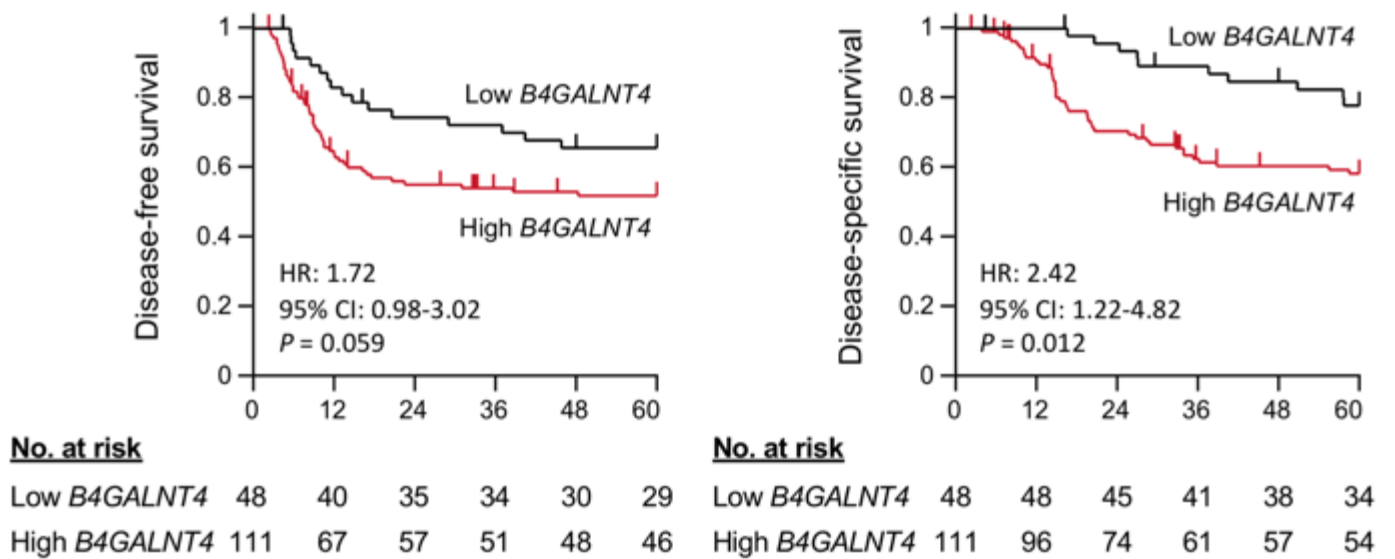


Figure 4. Expression and prognostic value of *B4GALNT4* protein in ESCC tissue.

(a) Representative images of *B4GALNT4* immunohistochemical staining scores in ESCC sections showing typical negative (0) and positive (1+, 2+, and 3+) staining (200 × magnification). (b) Kaplan–Meyer analysis of disease–free and disease–specific survival of 159 patients who underwent radical resection for stage I–III ESCC. In this cohort, all patients had received no treatment before curative surgery.