

Thesis

下咽頭癌 TPF 三剤併用化学療法に用いる, docetaxel, cisplatin, 5-fluorouracil の新規感受性／耐性予測遺伝子の探索

臨床医学研究系 臨床腫瘍学

嶋村 由美子

【背景・目的】下咽頭癌に対する化学療法は臓器温存希望症例や進行下咽頭癌切除不能症例に対する放射線との同時併用療法のほかに、局所制御率や臓器温存率の改善を目的とした導入化学療法として用いられる。進行下咽頭癌の導入化学療法として、TPF (docetaxel/cisplatin/5-fluorouracil) 療法は、標準レジメンである PF (cisplatin/5-fluorouracil) 療法に比べ、生存率や機能温存率において優れている。しかしながら、TPF 導入化学療法を用いた順次治療の完遂には数か月を要するため、治療期間の長期化に伴い、患者には身体的、経済的な負担も増大する場合がある。したがって、TPF 導入化学療法に最適な症例を選択できるような効果予測システムの確立は急務であり、本研究では、咽頭癌由来細胞株を用いた、TPF 療法の治療効果予測候補因子の探索を試みた。

【方法・結果】咽頭癌由来細胞15株を用いてMTTアッセイを行い、TXT (docetaxel), CDDP (cisplatin), 5-FU (5-fluorouracil), 各種薬剤に対するIC₅₀ (50%阻害濃度) を決定した。各細胞株からtotal RNAを抽出し、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8x60K (Agilent) によりmRNAおよびnon-coding RNAの網羅的遺伝子発現解析を行った。各細胞株におけるマイクロアレイで得られた遺伝子発現レベルとIC₅₀値との相関解析を行い、16種の感受性／耐性関連候補遺伝子を抽出した。Real-time RT-PCR法により、各細胞株でのこれらの候補遺伝子の発現量を定量的に測定し、IC₅₀値との相関について確認を行った。その結果、10遺伝子 (TXT: *PED4D*, *AGR2*, *RAB15*, *SYNGR1*; CDDP: *NINJ2*, *PTGS1*, *KLK11*, *PED4D*; 5FU: *SEPW1*, *CDC25B*, *RCAN3*, *AGR2*, 重複含む) の発現量がIC₅₀値と有意に相関することが確認された。そのうち、*AGR2*と*NINJ2*については、siRNAを用いたノックダウン実験により、*AGR2*の遺伝子発現量の低下はUT-SCC-70細胞におけるTXTのIC₅₀値の有意な低下を引き起こし、一方、*NINJ2*の遺伝子発現量の低下によりUT-SCC-89細胞のCDDPのIC₅₀値が有意に増加することを確認した。

【結語】今回の研究により、咽頭癌細胞株でTXT, CDDP, 5-FUの3剤の感受性と発現量が強く相関する10個の遺伝子を見いだした。そのうち、*AGR2*と*NINJ2*については、siRNAを用いた*in vitro*実験で、これらの遺伝子が各薬剤 (TXT/CDDP) の感受性／耐性に直接影響を与えることが確認された。今後、このようにして見つかったバイオマーカー候補について、臨床検体を用いた検証を行うと共に、その作用機序についても明らかにしていく。

緒言

頭頸部癌は、世界的には全癌のうち第6位を占め、本邦における罹患率は全癌の約5%程度と推測されている¹⁾。しかし、人口の高齢化に伴い罹患率、死亡率ともに増加傾向を示し、特に口腔・咽頭癌の罹患率は1998年度に6.9人 (人口10万人対) であったものが2008年度には12.2人 (人口10万人対) と10年間で

1.8倍に増加している。下咽頭癌は、解剖学的特性から初発症状段階での早期発見は困難で、嚥下困難、呼吸困難、あるいは頸部リンパ節転移の出現など、進行してようやく診断される症例が多い。そのため、診断時にIII, IV期の進行癌が約80%を占め、5年粗生存率は26～30%^{2,3)}と、頭頸部癌の中で最も予後の悪い疾患の一つである。進行下咽頭癌の標準治療は手術治療が主体であり、下咽頭に近接する喉頭摘出を余儀なくされることが多い。喉頭摘出により声を失うことは患者のQOLに大きく関わるため、QOL保持の観点から、

医学博士 甲第1257号 平成26年3月28日 (埼玉医科大学)

○著者は本学位論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

非外科的治療として化学放射線同時併用療法を選択する症例は増加の一途をたどっている⁴⁾。

下咽頭癌に対する化学療法は、臓器温存希望症例や進行下咽頭癌切除不能症例に対する放射線との同時併用療法のほかに、局所制御率や臓器温存率の改善を目的とした導入化学療法としても用いられる⁴⁾。その標準的レジメンは、白金製剤であるシスプラチン(cisplatin/CDDP)とピリミジン系代謝拮抗薬フルオロウラシル(5-fluorouracil/5-FU)の併用療法(PF療法)であったが、近年、PF療法にタキサン系抗癌剤ドセタキセル(docetaxel/TXT)を加えたTPF(docetaxel/cisplatin/5-fluorouracil)3剤併用療法が注目されている。

局所進行頭頸部扁平上皮癌を対象とする放射線療法前の導入化学療法として、TPF療法とPF療法を比較検討した第3相臨床試験(TAX323試験)⁵⁾ならびに、局所進行頭頸部扁平上皮癌を対象にしたカルボプラチン(carboplatin)併用化学放射線療法前の導入化学療法としてTPF療法とPF療法を比較検討した第3相試験(TAX324試験)⁶⁾の結果が報告され、TPF療法において全生存期間の有意な延長が認められた。また、臓器温存の点においても同様に、導入化学療法として進行喉頭癌および下咽頭癌を対象にした比較第3相試験(GORTEC2000-01試験)⁷⁾によって、TPF療法はPF療法と比較して喉頭温存率が有意に高いことが示されている。これらの試験結果を鑑み、本院でも2007年4月よりTPF療法を開始し、2011年12月までに28例の下咽頭扁平上皮癌症例に導入化学療法を行っており、原発巣で75%、頸部リンパ節で60%の奏功率が得られている。一方で、このレジメンではCTCAE(Commom Terminology Criteria for Adverse Events) version4.03 Grade3/4の重篤な有害事象、特に白血球減少19例、好中球減少22例、発熱性好中球減少15例が認められている。そのため、こうした有害事象をコントロールすることがTPF療法の課題となっている。

また、TPF導入化学療法を用いた順次治療では、導入化学療法を2～3クール行い、その治療効果によりその後の治療法が選択され、化学放射線療法や外科手術が行われる。こうした一連の治療には数か月を要し、治療期間の長期化に伴い、患者には身体的、経済的な負担が大きくなることから、治療に適した症例を選択するため、治療効果を予測するシステムの確立が急務となっている。効果の予測システムが確立されると、治療に適した患者選択が可能となり、TPF療法によって不必要な喉頭摘出手術の回避や臓器温存が図れ、なおかつ、治療効果の低い患者集団に対しては有害事象のリスクを伴う無効な薬剤投与を避けることが可能となる。

これまで、これらの各薬剤に対するバイオマーカー候補は、その代謝経路等のメカニズムから考慮し提唱されてきている。TXTを含むタキサン系抗癌剤の

薬理効果には、多剤排出タンパク質(ABCB1/Pgpに代表されるABCトランスポーター)⁸⁾、薬剤取り込みタンパク質(SLC01B3/OATP1B3)^{9,10)}、代謝関連酵素(シトクロームP450s, CYP3A4やCYP3A5等)¹¹⁾、薬剤標的(β β チューブリン)¹²⁾、分裂ストレス応答性の染色体凝集関連タンパク質(CHFR)^{13,14)}等が関与する。CDDPを含む白金製剤においては、白金の解毒化酵素(グルタチオン抱合酵素GSTP1)¹⁵⁾、DNA損傷修復酵素(ERCC1)¹⁶⁾の関与が想定されている。さらに、5-FUに関しては、その薬剤標的(チミジン合成酵素, TS)や不活化酵素(ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ, DPD)などが薬剤応答のバイオマーカーとして挙げられている¹⁷⁾。しかしながら、これらの研究は、主に薬物代謝に関わる肝臓や、乳癌、肺癌等の治療対象となる腫瘍組織や細胞系で解析が行われており、遺伝子発現プロファイルが組織によって大きく異なることを考えると、頭頸部癌、特に咽頭癌に限定した評価を行う必要があるが、いまだこうした研究はなされていない。

また、既知の薬物代謝等のメカニズムからは想定できない、薬効に関与する新たな分子の存在も否定できない。例えば、CDDPの治療効果を規定する因子として、*IFITM1*, *TMEM158*, *FBLP1*といった遺伝子が網羅的遺伝子発現解析により、食道癌ならびに非小細胞肺癌細胞株を用いた実験で見つかってきているが、いずれも既知の薬剤代謝経路との関連は見いだされていない^{18,19)}。そこで本研究では、咽頭癌由来細胞株を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、既知のパスウェイにとらわれず、下咽頭癌TPF療法の治療効果予測に有用となる候補因子の探索を試みた。

材料・方法

1) 薬剤

CDDPはシグマアルドリッチ社より、TXTはトロントリサーケミカル社、5-FUは和光純薬より入手した。その他の試薬は、ナカライテスク(株)、和光純薬(株)あるいはシグマアルドリッチ社より入手した。

2) 細胞株

FaDu²⁰⁾, Detroit 562²⁰⁾はATCC(American Type Culture Collection)から、BICR 6²¹⁾はECACC(European Collection of Cell Cultures)より入手した。HPC-921Y, MPC-881T, MPC-882Yは横浜市立大学矢野間俊介博士より、UMB-SCC-745²²⁾はUniversity Hospital Giessen and Marburg, Department of Otolaryngology, Head & Neck Surgery Robert Mandic博士より供与いただいた。また、UT-SCC-4²⁰⁾, UT-SCC-26A²⁰⁾, UT-SCC-26B²⁰⁾, UT-SCC-62²³⁾, UT-SCC-66²⁴⁾, UT-SCC-70²⁵⁾, UT-SCC-89²⁵⁾, UT-SCC-94²⁵⁾はUniversity of Turku and Turku University Hospital, Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery

Reidar Grénman 教授より提供された。各細胞は、推奨された培地に 10% FBS を加え、37°C、5% 二酸化炭素濃度下で培養した。

3) 細胞毒性試験

上記の咽頭癌由来細胞 15 株を用いて MTT アッセイを行い、TXT, CDDP, 5-FU 各種薬剤に対する IC₅₀ (50% 阻害濃度) を決定した。MTT アッセイは Shimokuni ら²⁶⁾の方法に従い、播種する細胞数などを改変して行った。96 ウェルプレート (コニング) に播種した細胞数は、1 ウェルあたり $4 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$ 個とした。また、ジメチルスルホキシド (DMSO) 150 μ L を加える前のインキュベーション時間は、1 ~ 3 時間とした。

4) 網羅的遺伝子発現解析

各細胞株から NucleoSpin RNA 抽出キット (Macherey-Nagel) を用いて total RNA を抽出・精製し、Quick Amp Labeling Kit (Agilent) で cRNA 合成時にラベリングを行い、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8x60K (Agilent) によって non-coding RNA を含め、網羅的遺伝子発現解析を行った。スキャンした画像データは Agilent Feature Extraction ソフトウェア (Agilent) で数値化を行った。遺伝子発現のシグナル強度は、解析環境言語 R (<http://www.r-project.org/>) を用いて Agilent 社の推奨するクオンタイル正規化法により標準化を行った。

5) 定量的遺伝子発現解析

相関解析から選ばれた遺伝子について、Real-time RT-PCR 法により遺伝子発現量の測定を行った。各細胞株から抽出した Total RNA から、ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (東洋紡) を用いて cDNA を合成し、ロシュ社の Universal Probe Library アッセイデザインセンター (<https://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>) に

て設計したプライマー (インビトロジェン)、UPL プローブ (ロシュ)、ならびに増幅用試薬 [qPCR Quick GoldStar Mastermix Plus (ニッポンジーン) あるいは ABsolute QPCR Mix (サーモフィッシャー)] を用いて、LightCycler480 (ロシュ) にて測定を行った。使用したプライマーとプローブは Table 1 の通りである。ACTB および GAPDH 遺伝子は、インビトロジェン社の Endogenous Control (VIC[®]/ MGB Probe, Primer Limited) を用いて測定した。各遺伝子の発現量は、ACTB, GAPDH ならびに HPRT1 遺伝子の相乗平均値を用いて標準化を行った。

6) 統計学的解析

各細胞株におけるマイクロアレイで得られた遺伝子発現量と IC₅₀ 値との相関解析 (線形回帰分析) を行い、相関係数 (IRI > 0.7) を用いて各種抗癌剤の感受性/耐性関連候補遺伝子を抽出した。IC₅₀ の値が離散傾向を示した TXT については、IC₅₀ 値によって Low, Medium, High の 3 群にカテゴリー化を行い、各群間の遺伝子発現量について、パターンマッチング相関解析で比較した。上記により選出された候補遺伝子について、Real-time RT-PCR 法により各細胞株での遺伝子発現量を定量的に測定し、IC₅₀ 値との相関を線形回帰分析により確認した。その際、相関係数が IRI > 0.6 のものを、感受性/耐性関連候補遺伝子として抽出した。TXT については、IC₅₀ 値によって Low, Medium, High の 3 群にカテゴリー化を行い、各群における遺伝子発現量について一元配置分散分析と多重比較解析 (ダネット検定) を行った。

7) ノックダウン実験

Stealth RNAi (インビトロジェン社): AGR2 (HSS116220, HSS173724, HSS116219), NINJ2

Table 1. Primers and Universal Probe Library probes used for the real-time RT-PCR analysis

	Gene Symbol	Forward Primer	Probe No.	Reverse Primer
TXT	AGR2	AGR2_UPL47_F01 : GGTGGGTGAGGAAATCCAG	47	AGR2_UPL47_R01 : GTAGGAGAGGGCCACAAGG
	SYNGR1	SYNGR1_UPL64_F01 : TCGCCTTCTCCTTTTCTCC	64	SYNGR1_UPL64_R01 : ATCTGGTACCGCTGGAAGG
	PDE4D	PDE4D_UPL75_F01 : TTGTCCAGTCTACTCATGTGCTATT	75	PDE4D_UPL75_R01 : TTGCTGCAAGAATCTCCAAA
	RAB15	RAB15_UPL74_F01 : GGCTGATGAGGAGCAGAAAC	74	RAB15_UPL74_R01 : TCCATGCCATACTCCTTCG
CDDP	PTGS1	PTGS1_UPL5_F01 : TTCTCTCGCCAGATTGCTG	5	PTGS1_UPL5_R01 : CCGAGACTCCCTGATGACA
	NINJ2	NINJ2_UPL68_F01 : CCCTGGTCACCCCTCATCA	68	NINJ2_UPL68_R01 : CGCCACTGCTTTCTACCTC
	NOTCH2NL	NOTCH2NL_UPL76_F01 : GGAGGCGACCGAGAAGATA	76	NOTCH2NL_UPL76_R01 : GCCATCTCGACACTGCAA
	KLK11	KLK11_UPL54_F01 : GCTTGCTCTGGCAACAGG	54	KLK11_UPL54_R01 : AGTGAGGCTTGCACTCGAAC
5FU	ZNF584	ZNF584_UPL67_F01 : GGGCCTATACCGGGATGT	67	ZNF584_UPL67_R01 : GATCTCGAAGGTGCAAGTCC
	RCAN3	RCAN3_UPL29_F01 : CGCGAATAGAACTCCACGA	29	RCAN3_UPL29_R01 : GACTTGTCCCGCACTTCG
	GOLGA8A	GOLGA8A_UPL63_F01 : GGTGGTTGCCACTCATCTG	63	GOLGA8A_UPL63_R01 : GGACTGCTGCTTGTCTTGG
	JDP2	JDP2_UPL28_F01 : AAGGAGCGCACGGAGTTT	28	JDP2_UPL28_R01 : ATCTGGGTCTTCAGCTCTGC
	SEPW1	SEPW1_UPL8_F01 : CTTGGCTCAGGGCTAATGC	8	SEPW1_UPL8_R01 : CCTATCATGAAGCGTCTGCTG
	PBX3	PBX3_UPL63_F01 : AGCGTCCTGTGTGAGATCAA	63	PBX3_UPL63_R01 : GTCTCATTAGCTGGGGATCG
	CDC25B	CDC25B_UPL23_F01 : TGCAGGTCTCTGCATGGAT	23	CDC25B_UPL23_R01 : GGATGGCCTGTTCAAACG
	STXBPI	STXBPI_UPL58_F01 : GCCTGGAGGCTGTGTATCTC	58	STXBPI_UPL58_R01 : CGGGTCCTTAAAGTCACTGATG
Control	HPRT1	HPRT1F01 : TGACCTTGATTTATTTGCATACC	73	HPRT1R01 : CGAGCAAGACGTTCACTGCT

(HSS107192, HSS181530, HSS107191), ならびに Stealth RNAi ネガティブコントロール (Hi GC Duplex, Med GC Duplex, Low GC Duplex) を用いて実験を行った. その際, RNAi の GC 含量を考慮して適切なネガティブコントロールを選択し使用した. CUY21Pro-Vitro エレクトロポレーター (ネッパジーン社) を用いてエレクトロポレーション法により各細胞株に Stealth RNAi を導入し, 表記の時間インキュベーションした後, RNA を抽出・精製し, Real-time RT-PCR 法によりノックダウン効率を評価した. エレクトロポレーションの条件は, ネッパジーン社のマニュアルに従い, pCMV-EGFP (ネッパジーン社より供与) プラスミドを用いて, 蛍光顕微鏡下での観察ならびに BD FACS Calibur フローサイトメーター (ベクトン・ディッキンソン) での解析により, 導入効率ならびに生細胞率を測定し, 至適化を行った. 使用したエレクトロポレーションの条件は, ポアリングパルス (Pp): 275 V, パルス幅 0.5 ms, パルス間隔 50 ms; ドライビングパルス (Pd): 20 V, パルス幅 50 ms, パルス間隔 50 ms; パルス回数 10 回であった.

ノックダウン実験の評価は, それぞれの遺伝子を高発現していた細胞株を用いて行った. *AGR2* の評価は, *AGR2* を高発現し, TXT の IC_{50} が高値を示した UT-SCC-70 細胞を, 一方, *NINJ2* は *NINJ2* を高発現し, CDDP の IC_{50} が低値であった UT-SCC-89 細胞を用いて行った.

結 果

咽頭癌由来細胞株を用いた薬剤感受性/耐性関連候補遺伝子の抽出

各細胞における TXT, CDDP ならびに 5-FU 3 剤それぞれの IC_{50} 値を MTT 法により決定した (Table 2). マイクロアレイで得られた遺伝子発現量と IC_{50} 値との相関解析 (線形回帰分析) により, まず 16 種の薬剤感受性/耐性関連候補遺伝子を抽出した (Table 3). これを検証するために, Real-time RT-PCR 法による定量的遺伝子発現解析を行い, IC_{50} 値との相関解析を行ったところ, これらのうち 10 遺伝子 (TXT: *PDE4D*, *AGR2*, *RAB15*, *SYNGR1*; CDDP: *NINJ2*, *PTGS1*, *KLK11*, *PDE4D*; 5FU: *SEPW1*, *CDC25B*, *RCAN3*, *AGR2*, 重複含む) の発現量が IC_{50} 値と有意に相関することが確認された (Table 4).

そのうち, *AGR2* は TXT の IC_{50} 値との間に有意な正の相関関係を示した ($R^2 = 0.4864$, $p = 0.0038$) (Fig. 1A). TXT の IC_{50} 値が離散傾向を示していたので, 線形回帰分析の他に, TXT の IC_{50} 値によって細胞株を 3 つのグループに分け, 各グループにおける *AGR2* の発現量を比較した. TXT の IC_{50} 値が高いグループは低いグループに比べ, 有意に *AGR2* の発現量が高かった ($p = 0.0044$, ダネット検定) (Fig. 1B). また,

NINJ2 の発現量は CDDP の IC_{50} 値との間に統計学的に有意な負の相関関係を示した ($R^2 = 0.7279$, $p < 0.0001$) (Fig. 2).

ノックダウン実験

各遺伝子の発現量が薬剤奏功性と関連しているかを調べるために, 各種の Stealth RNAi を用いてノックダウン実験を行った.

最初に, 各遺伝子に対するノックダウン効率の評価を行った. UT-SCC-4 に *AGR2*, *PDE4D*, UT-SCC-26B に *KLK11*, UT-SCC-89 に *PTGS1* および *CDC25B* の Stealth RNAi を導入したときのそれぞれの遺伝子発現量は, Stealth RNAi ネガティブコントロールを導入した場合と比較して, 24 時間後には 5 ~ 35% に抑制されていた. しかし, 96 時間後のそれぞれの遺伝子発現量は 50 ~ 120% となり, MTT アッセイによる細胞毒性評価まで発現抑制効果を維持できず, その後の解析を行うことができなかった.

また, UT-SCC-26B に *NINJ2*, *PTGS1*, *SEPW1* および *CDC25B* の Stealth RNAi を導入したときのそれぞれの遺伝子発現量は, Stealth RNAi ネガティブコントロールを導入した場合と比較して, 24 時間後には 5 ~ 10% に, 96 時間後には 20 ~ 40% に抑制された. これらノックダウン効率が良好であったそれぞれの遺伝子の Stealth RNAi と, Stealth RNAi ネガティブコントロールを導入した UT-SCC-26B の間で, 各薬剤 (TXT: *AGR2*, CDDP: *NINJ2*, *PTGS1*, 5FU: *SEPW1*, *CDC25B*) の IC_{50} 値を比較した. その結果, いずれの場合も IC_{50}

Table 2. IC_{50} values for TXT, CDDP and 5-FU in various pharyngeal cancer cells

Cells	IC_{50}		
	TXT (pg/ml)	CDDP (μg/ml)	5-FU (μg/ml)
UT-SCC-26A	47.909	8.386	0.821
UT-SCC-26B	0.169	0.283	0.056
UT-SCC-4	8898.846	0.944	39.887
UT-SCC-62	6.206	1.615	1.158
UT-SCC-66	207.924	1.604	0.121
UT-SCC-70	9191.086	2.357	0.208
UMB-SCC-745	0.094	0.974	0.308
UT-SCC-89	0.403	0.549	0.044
UT-SCC-94	0.781	1.37	0.077
BICR6	0.104	0.212	0.481
Detroit562	3.362	1.513	2.124
FaDu	3798.933	1.09	2.24
HPC921Y	9980.447	2.867	1.151
MPC881T	0.042	0.349	0.055
MPC882Y	22607.49	0.36	0.959

TXT(docetaxel), CDDP(cisplatin), 5-FU(5-fluorouracil)

Table 3. A list of candidate genes extracted from association analyses of IC₅₀ values and gene expression levels assessed with a microarray analysis in 15 pharyngeal cancer cells

	probe_id	SYMBOL	GENE_NAME	R	R for Cat*
TXT	A_23_P31407	<i>AGR2</i>	anterior gradient 2 homolog	0.701	0.802
	A_33_P3379091	<i>SYNGR1</i>	synaptogyrin 1	0.626	0.799
	A_33_P3389653	<i>PDE4D</i>	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	0.588	0.753
	A_24_P193295	<i>RAB15</i>	RAB15, member RAS oncogene family	0.53	0.78
CDDP	A_23_P216966	<i>PTGS1</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	-0.831	
	A_23_P48109	<i>NINJ2</i>	ninjurin 2	-0.818	
	A_33_P3212640	<i>NOTCH2NL</i>	notch 2 N-terminal like	0.757	
	A_23_P101505	<i>KLK11</i>	kallikrein-related peptidase 11	-0.753	
5-FU	A_23_P414964	<i>ZNF584</i>	zinc finger protein 584	-0.834	
	A_23_P35205	<i>RCAN3</i>	RCAN family member 3	-0.806	
	A_23_P391275	<i>RCAN3</i>	RCAN family member 3	-0.801	
	A_32_P2392	<i>GOLGA8A</i>	golgin A8 family, member A	0.786	
	A_23_P117582	<i>JDP2</i>	Jun dimerization protein 2	0.766	
	A_33_P3326432	<i>SEPW1</i>	selenoprotein W, 1	-0.765	
	A_23_P71821	<i>PBX3</i>	pre-B-cell leukemia homeobox 3	-0.76	
	A_23_P210726	<i>CDC25B</i>	cell division cycle 25 homolog B	-0.753	
	A_24_P201171	<i>STXBP1</i>	syntaxin binding protein 1	-0.75	

R was correlation coefficient obtained by linear regression analyses. R for Cat* was correlation coefficient obtained by pattern matching correlation analyses. They were conducted for categorized groups by 3 categories of IC₅₀ values: low (less than 1) medium (1-1000), and high (above 1000). Candidate genes, whose R values was bigger than 0.7 in absolute value in CDDP and 5-FU, were extracted. Candidate genes, whose R values for Cat* was bigger than 0.7 in absolute value in TXT, were extracted. TXT(docetaxel), CDDP(cisplatin), 5-FU(5-fluorouracil), R(correlation coefficient)

値に大きな変化が見られなかった。

UT-SCC-70に*AGR2*のStealth RNAiを導入したときの*AGR2*の遺伝子発現量は、Stealth RNAiネガティブコントロールを導入した場合と比較して、24時間後にHSS173724では17.0 %に、HSS116220では28.9 %に (Fig. 3A), 72時間後にはHSS173724では18.3%に、HSS116220では27.7%に抑制された (Fig. 3B)。次にこれらノックダウン効率が良好であった2種類の*AGR2*のStealth RNAiを導入したUT-SCC-70と、Stealth RNAiネガティブコントロールを導入したUT-SCC-70の間でTXTのIC₅₀値を比較した。*AGR2*のStealth RNAiで処理したものはStealth RNAiネガティブコントロールで処理したものと比較して、TXTのIC₅₀値は有意に低下した [HSS116220 : $p < 0.0001$, HSS17372 : $p = 0.0009$ (ダネット検定)] (Fig. 3C)。

また、UT-SCC-89に*NINJ2*のStealth RNAiを導入

したときの*NINJ2*の遺伝子発現量は、Stealth RNAiネガティブコントロールを導入した場合と比較して24時間後にHSS181530では21.6%に、HSS107192では17.3%に (Fig. 4A), 96時間後にはHSS181530では3.5%に、HSS107192では10.7 %に抑制された (Fig. 4B)。これらノックダウン効率の良好であった*NINJ2*のStealth RNAiを導入したUT-SCC-89と、Stealth RNAiネガティブコントロールを導入したUT-SCC-89の間でCDDPのIC₅₀値を比較したところ、*NINJ2*のStealth RNAi(HSS107192)で処理したものはStealth RNAiネガティブコントロールで処理したものとは比べて、CDDPのIC₅₀値は統計学的に有意に上昇したが、HSS181530で処理したものはコントロールより高いIC₅₀値であったものの、有意差は認められなかった [HSS107192 : $p < 0.0001$; HSS181530, $P = 0.28$ (ダネット検定)] (Fig. 4C)。

Table 4. A list of selected genes confirmed by association analyses of IC₅₀ values and gene expression levels as assessed with a real-time RT-PCR analysis in 15 pharyngeal cancer cells

Drug	Gene	Linear Regression	
		R ²	P
TXT	<i>PDE4D</i>	0.556	0.0014
	<i>AGR2</i>	0.486	0.0038
	<i>RAB15</i>	0.405	0.0107
	<i>SYNGR1</i>	0.391	0.0223
CDDP	<i>NINJ2</i>	0.728	<0.0001
	<i>PTGS1</i>	0.596	0.0007
	<i>KLK11</i>	0.449	0.0063
	(<i>PED4D</i>)	0.275	0.0449
5-FU	<i>SEPW1</i>	0.498	0.0033
	<i>CDC25B</i>	0.414	0.0097
	<i>RCAN3</i>	0.406	0.0106
	(<i>AGR2</i>)	0.346	0.021

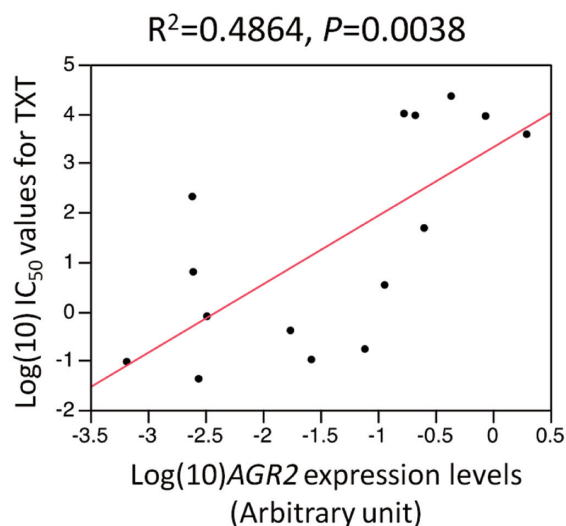
Genes with R² values >0.36 are listed. *PDE4D* and *AGR2* genes in parentheses that revealed P-values <0.05 in other drugs are also shown.

考 察

今回、咽頭癌由来細胞株を用い、薬剤感受性／耐性に関連する候補遺伝子として10遺伝子(TXT: *PDE4D*, *AGR2*, *RAB15*, *SYNGR1*; CDDP: *NINJ2*, *PTGS1*, *KLK11*, *PDE4D*; 5FU: *SEPW1*, *CDC25B*, *RCAN3*, *AGR2*, 重複含む)を選別した。これらの候補遺伝子は、各薬剤に対するバイオマーカーとしてこれまでは報告されていないものがほとんどであった。それは、過去の知見が、薬剤代謝に関わる肝臓、あるいは乳癌、肺癌などの腫瘍組織や細胞系を用いた解析から示されたものであり、遺伝子発現のプロファイルが組織によって大きく異なることから、本研究のように、咽頭癌の細胞株に限定しての解析がこれまでになされていなかったためと考えられる。また、過去に報告されているバイオマーカー候補の中には遺伝子変異の報告も含まれているが、本研究で用いた発現解析手法では変異に関するバイオマーカーは抽出できないため、今後、検討する予定である。

本研究では、これらの候補遺伝子の機能解析として siRNAを用いたノックダウン実験を行い、1) *AGR2*の遺伝子発現量の低下がUT-SCC-70細胞におけるTXTのIC₅₀値の有意な低下を引き起こし、2) *NINJ2*の遺伝子発現量の低下はUT-SCC-89細胞のCDDPに対するIC₅₀

(A)



(B)

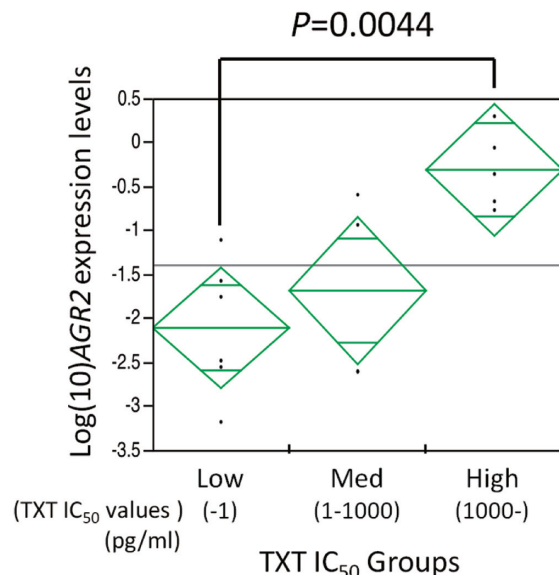


Fig. 1. Correlation between IC₅₀ values for TXT and *AGR2* expression levels in various pharyngeal cancer cells. The expression levels of *AGR2* were positively correlated with IC₅₀ values for TXT with a statistical significance (linear regression analysis, R²=0.4864, P=0.0038) (A). *AGR2* expression levels were normalized against the geometric mean of *GAPDH*, *ACTB* and *HPRT1* genes. When pharyngeal cells were divided into 3 categories, namely low, medium, and high IC₅₀ values for TXT: low (less than 1), medium (1-1000), and high (above 1000), the mean *AGR2* expression level in high IC₅₀ group cells was significantly higher than that in low IC₅₀ group cells (Dunnnett's test, P=0.0044) (B). TXT(docetaxel)

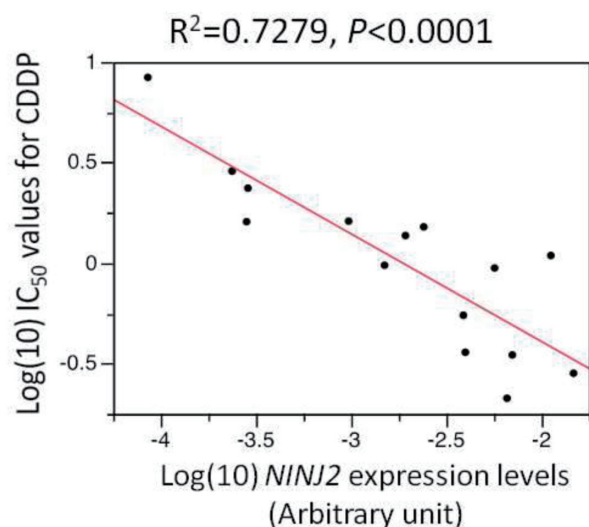


Fig. 2. Correlation between IC_{50} values for CDDP and *NINJ2* expression levels in various pharyngeal cancer cells. The expression levels of *NINJ2* were inversely correlated with IC_{50} values for CDDP with a statistical significance (linear regression analysis, $R^2=0.7279$, $P<0.0001$). *NINJ2* expression levels were normalized against the geometric mean of *GAPDH*, *ACTB* and *HPRT1* genes. CDDP(cisplatin)

値を有意に増加させることを示した。この結果は、各咽頭癌細胞株における *AGR2* の遺伝子発現量と TXT の IC_{50} 値が正の相関関係を示し、*NINJ2* の遺伝子発現量と CDDP の IC_{50} 値との間には負の相関関係が見られたことと一致しており、*AGR2* と *NINJ2* が、単なるバイオマーカーではなく、各薬剤 (TXT, CDDP) の感受性/耐性に直接影響を与えることを示している。

AGR2 遺伝子は、腸管のゴブレット細胞に特異的に発現する遺伝子として単離された²⁷⁾。*AGR2* タンパク質は分子量が約2万で、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼの活性を有し、主に粗面小胞体に局在することが報告されており、腸管における粘液産生に必須であることが示されている²⁸⁾。*AGR2* ノックアウトマウスでは、ゴブレット細胞における Mucin2 が減少し、微生物感染に対する腸管自然免疫を担当するパネート細胞構造が顕著に拡大すると報告されている²⁹⁾。これまでに、*AGR2* 遺伝子と様々な疾患 (喘息、炎症性腸疾患、等) との関連が明らかになってきており^{30, 31)}、特に、腫瘍においては、エストロゲン受容体 α (ER α) 陽性乳癌、高グレード漿液性卵巣癌および前立腺癌で *AGR2* 遺伝子発現と予後との関連が報告されている³²⁻³⁴⁾。さらに、*in vitro* 実験によって、*AGR2* の過剰発現が乳癌細胞株の増殖を引き起こし、また、グリオ

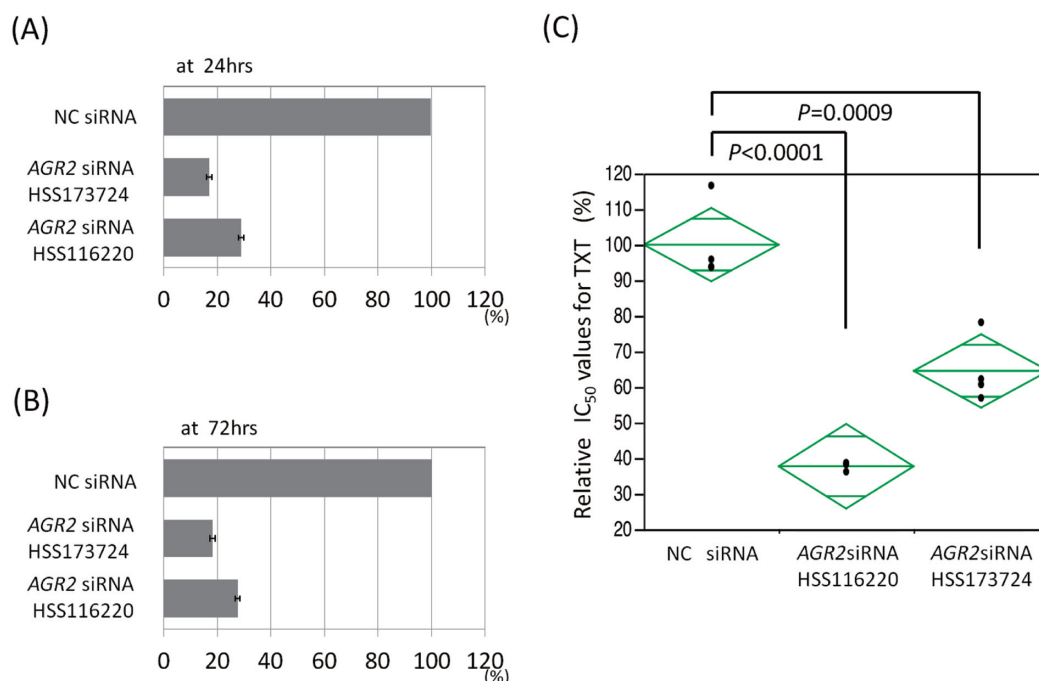


Fig. 3. Effect of *AGR2* knockdown by siRNA on the TXT sensitivity in UT-SCC-70 cells. Treatment with siRNA specific for *AGR2* decreased the relative expression levels of the *AGR2* gene normalized against the geometric mean of *GAPDH*, *ACTB* and *HPRT1* genes in UT-SCC-70 cells at 24hrs (A) and 72hrs (B) after transfection, and significantly attenuated the resistance of UT-SCC-70 cells to TXT (HSS116220 : $p<0.0001$, HSS17372 : $p=0.0009$) (C). Error bars expressed standard errors (SE). Relative IC_{50} values of TXT were expressed as taking the levels treated with NC siRNA to be 100%. TXT(docetaxel), NC (Negative Control)

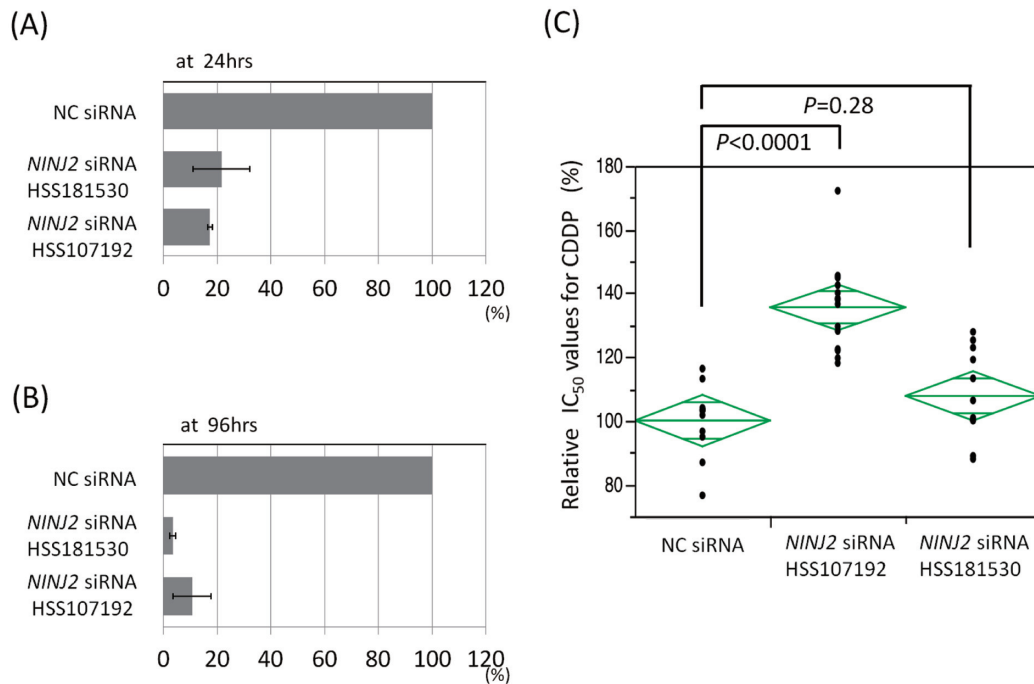


Fig. 4. Effect of *NINJ2* knockdown by siRNA on the CDDP sensitivity in UT-SCC-89 cells. Treatment with siRNA (HSS181530, HSS107192) specific for *NINJ2* decreased the relative expression levels of the *NINJ2* gene normalized against the geometric mean of *GAPDH*, *ACTB* and *HPRT1* genes in UT-SCC-89 cells at 24hrs (A) and 96hrs (B) after transfection, and significantly attenuated the sensitivity of UT-SCC-89 cells to CDDP (HSS107192 : $p < 0.0001$) (C). Error bars expressed standard errors (SE). Relative IC_{50} values of CDDP were expressed as taking the levels treated with NC siRNA to be 100%. CDDP (cisplatin), NC (Negative Control)

ブラストーマ細胞株では増殖と血管新生を亢進させることが示された^{35, 36)}。一方で、*AGR2*のノックダウンは前立腺癌細胞株の細胞老化を誘導し、膀胱癌細胞株の浸潤能を抑えることが報告されている^{37, 38)}。さらに、*AGR2*の強制安定発現はNIH3T3細胞に足場非依存性増殖能を獲得させるなど、形質転換を促し、ヌードマウス移植系では腫瘍化する³⁹⁾というように、*AGR2*が癌遺伝子として機能することが示されているが、その詳細な作用機序についてはいまだ充分には明らかにされていない。

*AGR2*は、前立腺癌細胞株PC3と、そのTXT耐性株であるPC3-Rxを比較したプロテオーム解析によって、TXTの治療応答性に関わるバイオマーカー候補の一つとして報告された⁴⁰⁾。PC3-Rxでは*AGR2*の発現量が低下しており、親株であるPC3細胞で*AGR2*遺伝子をノックダウンすると、TXTに対する IC_{50} 値が約5倍に増大することが示された。この結果は、本研究で見いだした結果と相反するものである。

先に、*AGR2*はDNA傷害に応答する癌抑制遺伝子p53のSer¹⁵およびSer³⁹²のリン酸化を阻害し、p53の転写因子としての活性化を抑制することが報告されている⁴¹⁾さらに最近、前立腺癌細胞株において、p53のSer¹⁵リン酸化がTXTの感受性を規定していることも報告されている⁴²⁾。これらのことから、*AGR2*が、p53の

活性化に重要なリン酸化を抑制することによってTXTに対する耐性獲得に寄与する可能性が考えられ、これは今回の観察結果と一致している。今後、咽頭癌細胞株において*AGR2*がどのような作用機序でTXTの耐性を獲得するか、詳細に検討する必要がある。

高グレード漿液性卵巣癌では、白金製剤ベースの標準化学療法において、*AGR2*の高発現症例が予後不良となることが報告されている⁴³⁾。この論文では白金製剤ベースの標準化学療法の詳細について記述されていないが、Gynecologic Cancer InterGroupが推奨する卵巣癌の標準的な化学療法では、白金製剤と共にパクリタキセル (paclitaxel/TXL) のようなタキサン系抗癌剤を併用するのが一般的である。今回の解析では、咽頭癌細胞株において*AGR2*の発現量とTXTの IC_{50} 値との間に有意な正の相関関係を示しており、卵巣癌においても*AGR2*の高発現がタキサン系抗癌剤の耐性獲得に関与している可能性が示唆される。これまでの報告で示されているように、*AGR2*が腫瘍の増殖や浸潤能に関与していることを考慮すると、*AGR2*の発現低下が化学療法剤に対する感受性に寄与することは、十分に頷ける結果であると考えられる。

*NINJ2*タンパク質は細胞接着分子*NINJ1*の相同体として2000年にArakiらが単離した⁴⁴⁾。相同体である*NINJ1*は神経障害後にシュワン細胞で誘導される遺

伝子として単離され⁴⁵⁾, *NINJ2*も同様に神経障害によって誘導されることが報告されている⁴⁴⁾. *NINJ2*は、その分子量が約2万で、膜貫通ドメインを2個有する膜結合タンパク質である。末梢神経系の成熟感覚ニューロン、腸管ニューロンに恒常的に発現し、初代培養された後根神経節ニューロンで神経突起の伸長を促進させた⁴⁴⁾. 疾患との関わりでは、Genome Wide Association Study (GWAS) により、脳卒中の発症リスクと*NINJ2*の2つのSNP, rs11833579とrs12425791が関連していることが報告され、注目された⁴⁶⁾. その後、この相関は欧州人を対象としたメタ解析では否定されたものの⁴⁷⁾, アジア人を対象とした2つのメタ解析で、rs12425791が有意に関連することが確認された^{48, 49)}. また、*NINJ2*のrs11833579多型がアルツハイマー病の低リスクと関連することも報告されている⁵⁰⁾.

しかしながら、腫瘍との関連についてはいまだ報告がない。*NINJ2*の相同体である*NINJ1*では、pTaならびにpT1の膀胱癌において、免疫染色で発現陽性のものが陰性のものに比べ、増悪のリスクが有意に低いことが報告されている⁵¹⁾. *NINJ2*の生物学的機能については、いまだほとんど明らかにされていないが、*NINJ1*ならびにショウジョウバエでの相同体であるNinjurin Aでいくつかの報告がなされている。*NINJ1*のN末にあるエクドメインがMMP9に切断されると、既知のケモカインと類似した構造をとり、この*NINJ1*可溶型はケモカイン様の誘因効果を示した⁵²⁾. また、*NINJ1*はマクロファージにおいて、細胞-細胞間接着を介して細胞死のシグナルを増加させることが示唆されている⁵³⁾. また、ショウジョウバエのNinjurin Aが非アポトーシス的な細胞死を誘導することも報告されている⁵⁴⁾. これらの報告は、いずれもNinjurinファミリータンパク質が細胞死に関与することを示しており、今回の観察結果である、*NINJ2*の発現抑制によるCDDPに対する感受性低下と矛盾しない。

今回、*AGR2*および*NINJ2*以外の候補遺伝子についても、siRNAを用いたノックダウン実験を行っている。*PDE4D*, *KLK11*に関しては、使用したStealth RNAiでは、MTTアッセイによる細胞毒性評価まで発現抑制効果を維持できず、細胞毒性試験に至らなかった。また、*PTGS1*, *SEPW1* および*CDC25B*については、ノックダウンした細胞株を用いて細胞毒性試験を行ったが、Stealth RNAiネガティブコントロールを導入した細胞株と比較して、各薬剤(CDDP : *PTGS1*, 5FU : *SEPW1*, *CDC25B*)のIC₅₀値に大きな変化が見られなかった。これは、各遺伝子の遺伝子発現量は、Stealth RNAiを導入して24時間後には5～10%に、96時間後では20～40%に抑制されていたものの、遺伝子発現抑制が各遺伝子の機能阻害には至らなかった可能性がある。

このように、*AGR2*および*NINJ2*以外の候補遺伝子については、siRNAを用いたノックダウン実験で機能を確認することはできなかった。しかし、これらの候補遺伝子についても、単なるバイオマーカーではなく、各種薬剤の感受性／耐性に直接的に結びついている可能性が考えられる。したがって、今後はこれらの候補遺伝子が、各薬剤の感受性／耐性規定因子となり得るかについて、安定発現形質転換株を用いた実験等により検討を進める予定である。さらに、薬剤の感受性との関連が明らかになった遺伝子は、その作用機序についても明らかにしたい。

現在、本研究と併行して、下咽頭癌に対するTPF療法の第2相臨床試験を進行中である。この試験では、1) 進行下咽頭扁平上皮癌におけるTPF療法の有効性と安全性を検証すること、2) 治療効果ならびに有害事象の予測因子として既存の遺伝子情報の有用性を検証するとともに新たな個人応答の予測因子を策定することを目的としている。この研究では種々の臨床情報の集積を行っており、併せて、治療前の内視鏡切除組織ならびに末梢血リンパ球DNAを収集している。検体数が解析に耐え得る数まで到達した際には、今回の研究で示唆されたTXT, CDDP, 5-FUの効果予測候補遺伝子について、その発現量を定量し、腫瘍縮小効果や腫瘍再発あるいは全生存期間の予測モデルが構築できるかについて検討する。その際、新規バイオマーカー候補を、既存の知見により得られている因子と比較検討し、これらの因子を有機的に結びつけた多因子による予測式の策定を行う予定である。

結 語

本研究により、咽頭癌細胞株でTXT, CDDP, 5-FUの3剤の感受性と発現量が強く相関する10個の遺伝子を見いだした。そのうち、*AGR2*と*NINJ2*については、siRNAを用いた*in vitro*実験で、各薬剤(TXT / CDDP)の感受性／耐性に直接影響を与えることが確認された。今後、これらのバイオマーカー候補について、臨床検体を用いた検証を行うと共に、その作用機序についても明らかにしていく。

謝 辞

大学院における研究活動において、代表指導教員として終始ご指導ご鞭撻をいただきました、埼玉医科大学病院歯科・口腔外科 依田哲也教授、埼玉医科大学国際医療センター頭頸部腫瘍科 菅澤正教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、様々なご指導をいただきました、群馬大学大学院医学研究科病態腫瘍薬理学 西山正彦教授、埼玉医科大学ゲノム医学センタートランスレーショナルリサーチ部門 江口英孝准教授、埼玉医科大学情報技術支援推進センター 和田智助教

に心より感謝申し上げます。

また、本研究と併行して、現在進行中である下咽頭癌に対するTPF療法の第2相臨床試験にてご協力くださいました、埼玉医科大学国際医療センター頭頸部腫瘍科 中平光彦准教授および医局員の皆様方に謹んで感謝申し上げます。

実験の進行に多大なご協力をいただきました、埼玉医科大学ゲノム医学センタートランスレーショナルリサーチ部門 熊澤千佳さん、埼玉医科大学国際医療センター乳腺腫瘍科 秋山典子さんに感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 国立がんセンターがん対策情報センター
- 2) Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffman HT, Weber RS, Ang KK, et al. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck* 2009;31(6):748-58.
- 3) Sewnaik A, Hoorweg JJ, Knegt PP, Wieringa MH, van der Beek JM, Kerrebijn JD. Treatment of hypopharyngeal carcinoma: analysis of nationwide study in the Netherlands over a 10-year period. *Clin Otolaryngol* 2005;30(1):52-7.
- 4) 日本頭頸部癌学会編. 頭頸部癌診療ガイドライン 2013年版. 東京: 金原出版; 2013. p. 23-6.
- 5) Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1695-704.
- 6) Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winkquist E, Gorbounova V, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1705-15.
- 7) Pointeau Y, Garaud P, Chapet S, Sire C, Tuchais C, Tortochaux J, et al. Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:498-506.
- 8) Murray S, Briasoulis E, Linardou H, Bafaloukos D, Papadimitriou C. Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat Rev* 2012;38(7):890-903.
- 9) Smith NF, Acharya MR, Desai N, Figg WD, Sparreboom A. Identification of OATP1B3 as a high-affinity hepatocellular transporter of paclitaxel. *Cancer Biol Ther* 2005;4(8):815-8.
- 10) Svoboda M, Wlcek K, Taferner B, Hering S, Stieger B, Tong D, et al. Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 in ovarian cancer cells: relevance for paclitaxel transport. *Biomed Pharmacother* 2011;65(6):417-26.
- 11) Baker SD, Verweij J, Cusatis GA, van Schaik RH, Marsh S, Orwick SJ, et al. Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85(2):155-63.
- 12) Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* 2010;10(3):194-204.
- 13) Chaturvedi P, Sudakin V, Bobiak ML, Fisher PW, Mattern MR, Jablonski SA, et al. Chfr regulates a mitotic stress pathway through its RING-finger domain with ubiquitin ligase activity. *Cancer Res* 2002;62(6):1797-801.
- 14) Pillai RN, Brodie SA, Sica GL, Shaojin Y, Li G, Nickleach DC, et al. CHFR protein expression predicts outcomes to taxane-based first line therapy in metastatic NSCLC. *Clin Cancer Res* 2013;19(6):1603-11.
- 15) Ekhardt C, Rodenhuis S, Smits PH, Beijnen JH, Huitema AD. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treat Rev* 2009;35(1):18-31.
- 16) Vaezi A, Feldman CH, Niedernhofer LJ. ERCC1 and XRCC1 as biomarkers for lung and head and neck cancer. *Pharmacogenomics Pers Med* 2011;4:47-63.
- 17) Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):330-8.
- 18) Fumoto S, Shimokuni T, Tanimoto K, Hiyama K, Otani K, Ohtaki M, et al. Selection of a novel drug-response predictor in esophageal cancer: a novel screening method using microarray and identification of IFITM1 as a potent marker gene of CDDP response. *Int J Oncol* 2008;32(2):413-23.
- 19) Mohammed Ael S, Eguchi H, Wada S, Koyama N, Shimizu M, Otani K, et al. TMEM158 and FBLP1 as novel marker genes of cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer cells. *Exp Lung Res* 2012;38(9-10):463-74.
- 20) Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, et al. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck* 2007;29(2):163-88.
- 21) Edington KG, Loughran OP, Berry IJ, Parkinson EK. Cellular immortality: a late event in the progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck associated with p53 alteration and a high frequency of allele loss. *Mol Carcinog*

- 1995;13(4):254-65.
- 22) Mandic R, Schamberger CJ, Muller JF, Geyer M, Zhu L, Carey TE, et al. Reduced cisplatin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cell lines correlates with mutations affecting the COOH-terminal nuclear localization signal of p53. *Clin Cancer Res* 2005;11:6845-52.
 - 23) Beder LB, Gunduz M, Hotomi M, Fujihara K, Shimada J, Tamura S, et al. T-lymphocyte maturation-associated protein gene as a candidate metastasis suppressor for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Sci* 2009;100(5):873-80.
 - 24) Dietz A, TSCHÖP K, Wichmann G, Granzow C. Method and kit for the ex vivo evaluation of the response of a tumor to conditions to be tested. 特許文献 公告番号 WO 2009124997 A1. 2009 年 10 月 15 日公開
 - 25) Köberle B, Ditz C, Kausch I, Wollenberg B, Ferris RL, Albers AE. Metastases of squamous cell carcinoma of the head and neck show increased levels of nucleotide excision repair protein XPF in vivo that correlate with increased chemoresistance ex vivo. *Int J Oncol* 2010;36(5):1277-84.
 - 26) Shimokuni T, Tanimoto K, Hiyama K, Otani K, Ohtaki M, Hihara J, et al. Chemosensitivity prediction in esophageal squamous cell carcinoma: novel marker genes and efficacy-prediction formulae using their expression data. *Int J Oncol* 2006;28(5):1153-62.
 - 27) Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S. Cloning of the gene gob-4, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. *Biochim Biophys Acta* 1999;1444(3):434-8.
 - 28) Park SW, Zhen G, Verhaeghe C, Nakagami Y, Nguyenvu LT, Barczak AJ, et al. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(17):6950-5.
 - 29) Zhao F, Edwards R, Dizon D, Afrasiabi K, Mastroianni JR, Geyfman M, et al. Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2*^{-/-} mice. *Dev Biol* 2010;338(2):270-9.
 - 30) Schroeder BW, Verhaeghe C, Park SW, Nguyenvu LT, Huang X, Zhen G, et al. AGR2 is induced in asthma and promotes allergen-induced mucin overproduction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;47(2):178-85.
 - 31) Zheng W, Rosenstiel P, Huse K, Sina C, Valentonyte R, Mah N, et al. Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease. *Genes Immun* 2006;7(1):11-8.
 - 32) Hrstka R, Nenutil R, Fourtouna A, Maslon MM, Naughton C, Langdon S, et al. The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers. *Oncogene* 2010;29(34):4838-47.
 - 33) Darb-Esfahani S, Fritzsche F, Kristiansen G, Weichert W, Sehouli J, Braicu I, et al. Anterior gradient protein 2 (AGR2) is an independent prognostic factor in ovarian high-grade serous carcinoma. *Virchows Arch* 2012;461(2):109-16.
 - 34) Zhang Y, Forootan SS, Liu D, Barraclough R, Foster CS, Rudland PS, et al. Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007;10(3):293-300.
 - 35) Salmans ML, Zhao F, Andersen B. The estrogen-regulated anterior gradient 2 (AGR2) protein in breast cancer: a potential drug target and biomarker. *Breast Cancer Res* 2013;15(2):204.
 - 36) Hong XY, Wang J, Li Z. AGR2 Expression is Regulated by HIF-1 and Contributes to Growth and Angiogenesis of Glioblastoma. *Cell Biochem Biophys* 2013;67(3):1487-95.
 - 37) Hu Z, Gu Y, Han B, Zhang J, Li Z, Tian K, et al. Knockdown of AGR2 induces cellular senescence in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2012;33(6):1178-86.
 - 38) Ramachandran V, Arumugam T, Wang H, Logsdon CD. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival. *Cancer Res* 2008;68(19):7811-8.
 - 39) Wang Z, Hao Y, Lowe AW. The adenocarcinoma-associated antigen, AGR2, promotes tumor growth, cell migration, and cellular transformation. *Cancer Res* 2008;68(2):492-7.
 - 40) Zhao L, Lee BY, Brown DA, Molloy MP, Marx GM, Pavlakis N, et al. Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling. *Cancer Res* 2009;69(19):7696-703.
 - 41) Pohler E, Craig AL, Cotton J, Lawrie L, Dillon JF, Ross P, et al. The Barrett's antigen anterior gradient-2 silences the p53 transcriptional response to DNA damage. *Mol Cell Proteomics* 2004;3(6):534-47.
 - 42) Liu C, Zhu Y, Lou W, Nadiminty N, Chen X, Zhou Q, et al. Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. *Prostate* 2013;73(4):418-27.

- 43) Darb-Esfahani S, Fritzsche F, Kristiansen G, Weichert W, Sehouli J, Braicu I, et al. Anterior gradient protein 2 (AGR2) is an independent prognostic factor in ovarian high-grade serous carcinoma. *Virchows Arch* 2012;461(2):109-16.
- 44) Araki T, Milbrandt J. Ninjurin2, a novel homophilic adhesion molecule, is expressed in mature sensory and enteric neurons and promotes neurite outgrowth. *J Neurosci* 2000;20:187-95.
- 45) Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron* 1996;17(2):353-61.
- 46) Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, Fornage M, DeStefano AL, Aulchenko YS, et al. Genomewide association studies of stroke. *N Engl J Med* 2009;360(17):1718-28.
- 47) International Stroke Genetics Consortium, Wellcome Trust Case-Control Consortium 2. Failure to validate association between 12p13 variants and ischemic stroke. *N Engl J Med* 2010;362(16):1547-50.
- 48) Li BH, Zhang LL, Yin YW, Pi Y, Guo L, Yang QW, et al. Association between 12p13 SNPs rs11833579/rs12425791 near NINJ2 gene and ischemic stroke in East Asian population: evidence from a meta-analysis. *J Neurol Sci* 2012;316(1-2):116-21.
- 49) Lian G, Yan Y, Jianxiong L, Juanjuan X, Qing C, Guangliang W, et al. The rs11833579 and rs12425791 polymorphisms and risk of ischemic stroke in an Asian population: a meta-analysis. *Thromb Res* 2012;130(3):e95-e102.
- 50) Lin KP, Chen SY, Lai LC, Huang YL, Chen JH, Chen TF, et al. Genetic polymorphisms of a novel vascular susceptibility gene, Ninjurin2 (NINJ2), are associated with a decreased risk of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2011;6(6):e20573.
- 51) Mhawech-Fauceglia P, Ali L, Cheney RT, Groth J, Herrmann FR. Prognostic significance of neuron-associated protein expression in non-muscle-invasive urothelial bladder cancer. *J Clin Pathol* 2009;62(8):710-4.
- 52) Ahn BJ, Le H, Shin MW, Bae SJ, Lee EJ, Wee HJ, et al. The N-terminal ectodomain of Ninjurin1 liberated by MMP9 has chemotactic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;428(4):438-44.
- 53) Lee HJ, Ahn BJ, Shin MW, Jeong JW, Kim JH, Kim KW. Ninjurin1 mediates macrophage-induced programmed cell death during early ocular development. *Cell Death Differ* 2009;16(10):1395-407.
- 54) Broderick S, Wang X, Simms N, Page-McCaw A. *Drosophila* Ninjurin A induces nonapoptotic cell death. *PLoS One* 2012;7(9):e44567.