

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19867

研究課題名(和文)大腸癌に対するCripto-1標的療法の実現に向けて

研究課題名(英文)The function and prognostic significance of Cripto-1 in colorectal cancer

研究代表者

唐澤 秀明(Hideaki, Karasawa)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30547401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌手術検体におけるCripto-1発現を検討したところ、35%で陽性を示した。Cripto-1陽性例は腫瘍径が有意に大きく、リンパ節転移症例、肝転移症例で有意に多く認められた。またCripto-1陽性例は無再発生存期間、全生存期間が有意に短く、独立した予後不良因子であった。大腸癌細胞株においてCripto-1の発現抑制を行ったところ、細胞増殖能や細胞遊走能が有意に低下し、AktやMAPKのリン酸化が抑制されていた。さらに免疫不全マウスへの皮下移植、ならびにマウス盲腸への同所移植を行ったところ、Cripto-1の発現抑制により有意に腫瘍形成能が低下し、リンパ節転移が減少した。

研究成果の概要(英文)：Purpose: This study is aimed to evaluate the clinical and biological significance of Cripto-1 in colorectal cancer. Material and Methods: Colorectal cancer specimens were obtained from 192 patients. The Cripto-1 expression was evaluated by immunohistochemistry and clinicopathological features were statistically analyzed. Functions of Cripto-1 were investigated using Cripto-1 silencing colorectal cancer cell lines. Results: In clinicopathological analysis, the number of Cripto-1-positive cases was 68 out of 192 (35%). The Cripto-1 expression was significantly associated with worse prognosis, and was an independent prognostic factor. Cripto-1 silencing colorectal cancer cell lines reduced cell proliferation, migration and activation of Akt and MAPK signaling pathways in vitro and decreased tumor growth and lymph node metastasis in vivo. Conclusion: Cripto-1 has potential for a prognostic marker and therapeutic target in colorectal cancer.

研究分野：大腸癌

キーワード：Cripto-1 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、全悪性腫瘍の中で米国において男女とも3番目に死亡数が多く、本邦では部位別年齢調整死亡率が男性3位、女性1位であり、部位別年齢調整罹患率は男性女性ともに2位(2012年)である。スクリーニングによる早期癌の発見や分子標的薬の導入、集学的治療の進歩により治療成績は向上しているものの、本邦における大腸癌の死亡数は増加傾向にあり、罹患率も高いのが現状である。本邦の全大腸癌における5年生存率は、結腸癌で70.1%、直腸癌で67.5%であり、悪性腫瘍の中で比較的良好であるが、遠隔転移例になると13%と著しく低下しており、進行癌の制御が課題であると考えられる。近年、進行再発大腸癌に対して、EGFR(epidermal growth factor receptor: 上皮増殖因子受容体)、VEGF(vascular endothelial growth factor: 血管内皮増殖因子)さらにはPD-1(programmed cell death-1: プログラム細胞死1)を標的とした治療が導入され一定の治療効果を上げているが、さらなる治療成績の向上や個別化医療の推進には新たな治療標的の発見が必要である。また既存のステージ分類では抽出されない予後不良例も少なからず存在しており、術後補助療法等の治療戦略の再考に繋がる新規バイオマーカーの同定も求められている。

Cripto-1はヒト胎児性癌細胞株であるNTERA-2とマウス胎児性癌細胞株であるF9からクローニングされた遺伝子であり、GPIアンカー型タンパク質として細胞膜の脂質ラフト上に存在している。その発現は胎生期に高く、TGF- β (transforming growth factor: 形質転換増殖因子ベータ)ファミリーの共受容体として初期胚発生に重要な役割を果たしており、Cripto-1ノックアウトマウスは胎生致死となる。成体になると発現がほとんど認められないが、腫瘍細胞では再び高発現し、PI3-K(phosphatidylinositol

3-kinase: フォスファチジルイノシトール3キナーゼ)/Aktや、c-Src/MAPK、Wnt/ β -catenin、TGF- β シグナルなど様々な細胞内シグナル伝達経路を介して腫瘍進展に関わることが報告されている。

Cripto-1に関する研究は1990年代から種々の癌腫で行われており、乳癌、大腸癌、肺癌、肝細胞癌、胃癌などの腫瘍組織で正常組織より発現が高いことが示され、さらにその発現が予後と関連していることが報告されてきた。大腸癌では、MiyoshiらによってCripto-1のmRNA高発現例において無再発生存期間が有意に短く、異時性肝転移症例ではCripto-1発現が独立した予後因子となることが報告され、Francescangeliらは、Cripto-1がGlypican-1/c-Src/Aktシグナルを活性化して腫瘍進展に関与することを明らかにしている。しかしながら、大腸癌におけるCripto-1のタンパク質発現は、症例数や臨床情報の不足等により十分な臨床病理学的検討がなされておらず、予後との関連や、その生物学的機能が明らかにされていない。Cripto-1タンパク質の発現意義やその機能を解明することは、新規バイオマーカーや治療標的として臨床応用に繋がる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

Cripto-1は乳癌、胃癌などの様々な悪性腫瘍で高発現していると報告されているが、大腸癌における発現意義や腫瘍増殖に関する作用機序は十分に解明されていない。そのため、本研究では大腸癌におけるCripto-1発現の意義を検討し、さらにその機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

2000年~2008年に東北大学病院で手術を施行された大腸癌切除検体192例(男性115例、女性77例)でCripto-1の免疫組織化学を行い、その臨床病理学的因子の検討を行った。Cripto-1の生物学的機能解析では、Cripto-1

特異的 siRNA を用いて大腸癌細胞株 HT-29、DLD-1 の Cripto-1 発現を抑制し、*in vitro* における腫瘍増殖能や遊走能、また Cripto-1 が制御する細胞内シグナル伝達経路について検討した。さらに、生体内における Cripto-1 の生物学的機能を解析するため、Cripto-1 特異的 miRNA が組み込まれたベクターを大腸癌細胞株 HT-29 に導入し、Cripto-1 安定発現抑制株を作成した。作成した細胞株を用いて皮下移植モデル、同所移植モデルを作成し、生体内における増殖能、転移能について検討した。

4. 研究成果

大腸癌手術検体 192 例における Cripto-1 の発現を検討したところ、68 例 (35%) で陽性を示した。Cripto-1 陽性例は腫瘍径が有意に大きく ($P < 0.001$)、深達度 pT3 以深症例 ($P < 0.001$)、リンパ節転移症例 ($P = 0.044$)、肝転移症例 ($P < 0.001$)、TNM 分類 Stage III-IV 症例 ($P = 0.002$) で有意に多く認められた。また Cripto-1 陽性例は無再発生存期間、全生存期間が有意に短く (無再発生存期間、全生存期間ともに $P < 0.001$)、独立した予後不良因子であった。続いて、大腸癌細胞株 HT-29、DLD-1 において Cripto-1 の発現抑制を行ったところ、細胞増殖能や細胞遊走能が有意に低下し、Cripto-1 の発現低下に伴い Akt や MAPK (mitogen-activated protein kinase: 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ) のリン酸化が抑制されていた。さらに、Cripto-1 安定発現抑制大腸癌細胞株を作成し、免疫不全マウスへの皮下移植、ならびにマウス盲腸への同所移植を行ったところ、Cripto-1 の発現抑制により有意に腫瘍形成能が低下し、リンパ節転移が減少した。以上の結果より、Cripto-1 が Akt や MAPK を介した細胞内シグナル伝達経路により大腸癌細胞の増殖、腫瘍進展を制御している事が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Yamamura A, Miura K, Karasawa H, et al. (11人中3番目) NDRG2, suppressed expression associates with poor prognosis in pancreatic cancer, is hypermethylated in the second promoter in human gastrointestinal cancers. (2017) *Biochem Biophys Res Commun.* 484(1):138-43 (査読あり)

Katagiri M, Karasawa H, Takagi K, et al. (11人中2番目) Hexokinase 2 in colorectal cancer: a potent prognostic factor associated with glycolysis, proliferation and migration. (2017) *Histol Histopathol.* 32(4):351-360. (査読あり)

Sato J, Karasawa H, Suzuki T, et al. (10人中2番目) The expression and functional role of Cripto-1 in human colorectal cancer (2016) *Ann Oncol* 27 (suppl_9). (査読あり)

[学会発表](計4件)

佐藤 純, 唐澤秀明, 鈴木 貴, 中山 瞬, 片桐宗利, 前田晋平, 大沼 忍, 元井冬彦, 内藤 剛, 海野倫明: Cripto-1 as a potent prognostic factor for human colorectal cancer. 第75回日本癌学会学術総会(横浜、パシフィコ横浜)(平成28年10月7日)

唐澤秀明, 佐藤 純, 中山 瞬, 井本博文, 青木 豪, 工藤克昌, 大沼 忍, 渡辺和宏, 田中直樹, 阿部友哉, 長尾宗紀, 大塚英郎, 水間正道, 坂田直昭, 武者宏昭, 森川孝則, 林 洋毅, 中川 圭, 元井冬彦, 内藤 剛, 海野倫明: 大腸癌に対する新規バイオマーカー・治療標的:

Cripto-1. 第116回日本外科学会定期学術集会（大阪、大阪国際会議場）（平成28年4月16日）

Karasawa H, Sato J, Nakayama S, Maeda S, Ohnuma S, Motoi F, Naitoh T, Unno M: Cripto-1 expression and its function for tumor progression in human colorectal cancer . 10th AACR-JCS Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research (Maui, Hawaii, USA)（平成28年2月19日）

佐藤 純, 唐澤秀明, 中山 瞬, 前田晋平, 大沼 忍, 元井冬彦, 内藤 剛, 海野倫明: Cripto-1 expression and its prognostic value in human colorectal cancer patients. 第74回日本癌学会学術総会（名古屋、名古屋国際会議場）（平成27年10月8日）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

唐澤 秀明 （KARASAWA, Hideaki）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30547401