

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08668

研究課題名（和文）高浸潤性増殖を呈する大腸癌における微小環境の病態解明とその増殖制御

研究課題名（英文）Pathophysiology and growth control of the microenvironment in colorectal cancer with highly invasive growth

研究代表者

諸橋 一（Morohashi, Hajime）

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30598628

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：高浸潤性増殖を呈する大腸癌では、癌細胞周囲に線維化が生じ、脈管侵襲・神経侵襲が顕著となることが知られており、大腸壁に浸潤性に発育して比較的早期より転移をきたしうるような高浸潤性増殖を特徴とする大腸癌症例が認められる。この進展形式と癌微小環境に注目した本研究の成果により、直腸癌の側方リンパ節転移に対する進展形式を解明し、術前治療とリンパ節郭清を組み合わせた治療方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により癌細胞増殖、癌細胞・間質との相互作用の機序を解明し、高浸潤性増殖を呈する大腸癌における癌微小環境の病態解明と、その増殖制御についての手がかりを解明した。その結果、進行直腸癌の側方リンパ節転移の進展形式に対して、癌微小環境をターゲットとした治療の重要性を解明した。臨床応用として早期からの癌微小環境をターゲットとした術前化学療法とロボット手術を組み合わせた新たな治療戦略の開発に至った。

研究成果の概要（英文）：Colorectal cancer with highly invasive growth is known to have fibrosis around the cancer cells, and vascular and nerve invasion is prominent. The results of this study, which focused on this form of development and the cancer microenvironment, have elucidated the form of development of lateral lymph node metastasis of rectal cancer and developed a treatment method that combines preoperative treatment and lymph node dissection.

研究分野：消化器外科

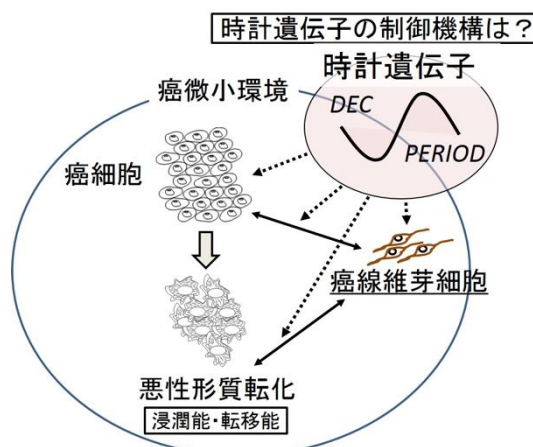
キーワード：癌微小環境 リンパ節転移 腹膜播種 大腸癌 ロボット手術

1. 研究開始当初の背景

高浸潤性増殖を呈する大腸癌は癌細胞周囲に線維化が生じ、脈管侵襲・神経侵襲が顕著となることが知られており、大腸壁に浸潤性に発育して比較的早期より腹膜播種をきたしうるような高浸潤性増殖を特徴とする大腸癌症例が認められる。このような過程で癌細胞と間質との相互作用で形成される微小環境が癌の悪性度に重要な役割を果たしていると考えられる。また、これらの相互作用は、概日リズムを形成する時計遺伝子[bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 型転写因子]を基盤に形成されるという仮説に基づき、時計遺伝子の発現と、癌細胞増殖、癌細胞・間質との相互作用の機序を証明することを解明し、高浸潤性増殖を呈する大腸癌における癌微小環境の病態解明と、その増殖制御を目的とした研究である。

2. 研究の目的

本研究は、高浸潤性増殖を呈する大腸癌の高悪性度を規定する癌微小環境因子を、時計遺伝子との相互作用に着目し、(1)癌微小環境を規定する細胞外基質としてヒアルロン酸に注目する。癌細胞周囲のヒアルロン酸の多寡と、時計遺伝子・血管新生因子との相互作用をする。(2)癌細胞-間質の相互作用の機序を解明するため、大腸癌細胞株と癌関連線維芽細胞の共培養を行い、癌細胞の悪性形質転化・上皮間葉転換 (EMT) を解析するとともに、ヒアルロン酸合成制御による影響を探索する。(3)リンパ管・血管を有する三次元培養組織モデルを作製し、癌細胞の脈管侵襲、間質との相互作用、時計遺伝子の関与を明らかにする。また、ヒアルロン酸合成・時計遺伝子発現の制御により、癌微小環境への影響、癌細胞の悪性形質転化・上皮間葉転換への影響を明らかにする。(4)ヒト腫瘍マウス異種移植による個体レベルでの癌微小環境の解析を行う。

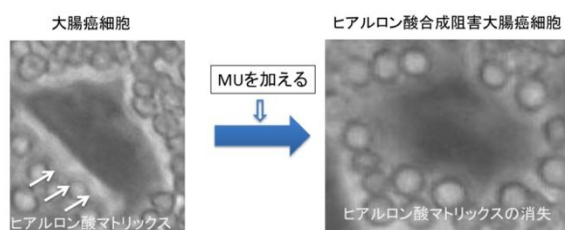


3. 研究の方法

- (1) 癌微小環境を形成するために、癌細胞とヒト間葉系幹細胞を共培養し、ヒト間葉系幹細胞の癌関連線維芽細胞への分化を明らかにする。
- (2) 癌細胞と癌関連線維芽細胞との共培養により、癌の悪性形質転化、時計遺伝子の発現を確認する。
- (3) リンパ管・血管を有する三次元培養組織モデルを作製し、癌細胞の脈管侵襲、間質との相互作用、時計遺伝子の関与を明らかにする。また、時計遺伝子を過剰発現、またはノックダウンすることで、癌微小環境への影響、癌細胞の悪性形質転化への影響を明らかにする。
- (4) マウス異種移植モデルを用いての癌微小環境の解析を行う。

4. 研究成果

- (1) 癌細胞とヒト間葉系幹細胞を共培養により、癌周囲ヒアルロン酸量が癌悪性度と相関することが明らかになった。特に、大腸癌細胞や膵癌細胞でこの傾向が顕著であり、周囲のヒアルロン酸をノックダウンすることで癌細胞の遊走能や浸潤能を脆弱化することが分かった。また、このように癌微小環境を変化させることに加えて、抗癌剤



を追加することや放射線を追加することで、癌局所での悪性転化を防ぐ可能性が示唆された。

- (2) 癌細胞の悪性形質転化への時計遺伝子の発現は転写抑制因子の機能がヒアルロン酸合成を制御し、癌細胞の増殖や癌微小環境で何らかの影響を持つことが示唆されたが、具体的な遺伝子の作用や作用機序については明らかにすることはできなかった。
- (3) リンパ管・血管を有する三次元培養組織モデルにより、リンパ節そのものだけでなく、リンパ管や間質細胞への微細な浸潤形態が明らかにされた。特に、時計遺伝子の過剰発現状況により、癌の悪性転化とリンパ管侵襲が相関する可能性が示唆された。直腸癌の最大断面における癌細胞量を定量化することを試み、サイトケラチン AE1/AE3 の免疫染色を実施した。サイトケラチン AE1/AE3 染色面積 ($P=0.04$)、有糸分裂 ($P=0.0027$)、抗癌剤投与後の放射線ドーナツ型画像 ($P=0.010$) は放射線癌量減少率高値群で低値群に比べ低値であることを明らかにした。

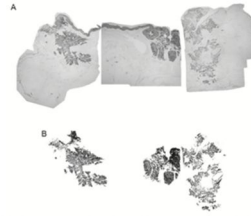


Figure 3. Cytokeratin AE1/AE3 stained area. (A) Immunohistochemistry and (B) binary image for cytokeratin AE1/AE3 staining (magnification, $\times 12.5$).

- (4) 以上の *in vivo* での基礎研究を土台としてマウス異種移植モデルを用いて抗癌剤を投与が癌微小環境に変化をもたらすことが、癌治療の初期において極めて重要であることを確認し、現状における早期大腸癌の病態や診断、集学的治療の問題点、手術適応が困難な患者の絞り込みの課題が明らかとなった。
- (5) 直腸癌に対する集学的治療において治療初期からの腫瘍微小環境を標的とした治療の有効性に着目して臨床応用を行った。直腸癌の側方リンパ節転移は直腸癌の局所への転移と捉えるか、全身病と捉える議論が分れるところであるが、本研究におけるヒアルロン酸と癌の微小環境の関連性は大腸癌において局所の制御に関して重要な働きがあることが示唆された。進行直腸癌患者に対し、術前に S-1 と oxaliplatin を 3 コース投与し、その後手術を行う治療を計画した。臨床症状では重篤な副作用はなかった。その結果、52 例中 51 例 (98.1%) で R0 切除が達成された。病理学的完全奏効は 10 例 (19.2%) であった。また、術前化学療法後の括約筋温存率は N 術前化学療法施行群が非施行群より高かった ($P = .024$)。総手術時間は術前化学療法施行群が非施行群に比べ有意に長かった ($P < 0.001$)。側方リンパ節郭清の割合は、術前化学療法施行群が非施行群に比べ有意に高かった ($P < 0.001$)。切開部位の手術部位感染 (SSI)、臓器・空間の SSI 術後出血、小腸閉塞、吻合部漏出、排尿障害、尿路感染症の発生率に群間で有意差は認められなかった。術前化学療法施行群では側方リンパ節転移が 8 例 (15%)、切除断端陽性が 2 例 (4.0%) であった。術前化学療法施行群は括約筋温存率も高く、安全性、根治性に優れた治療方法であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Morohashi Hajime, Sakamoto Yoshiyuki, Miura Takuya, Kagiya Takuji, Ogasawara Kenta, Takahashi Yoshiya, Sato Kentaro, Hara Yutaro, Ogasawara Hirokazu, Hakamada Kenichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Short-term outcomes of robotic-assisted laparoscopic versus laparoscopic lateral lymph node dissection for advanced lower rectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Endoscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00464-020-07979-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morohashi Hajime, Sakamoto Yoshiyuki, Miura Takuya, Ichinohe Daichi, Umemura Kotaro, Akaishi Takanobu, Sato Kentaro, Kuwata Daisuke, Yamazaki Keisuke, Wakiya Taiichi, Hakamada Kenichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Effective dissection for rectal cancer with lateral lymph node metastasis based on prognostic factors and recurrence type	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00384-021-03870-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto Yoshiyuki, Morohashi Hajime, Miura Takuya, Tsutsumi Shinji, Takahashi Seiji, Hiramaki Kimiaki, Wakiya Taiichi, Hakamada Kenichi	4. 巻 -
2. 論文標題 A Prospective Multicenter Phase II Study on the Feasibility and Efficacy of S-1 and Oxaliplatin Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diseases of the Colon & Rectum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/DCR.0000000000001927	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato, K. Morohashi, H. Tsushima, F. Sakamoto, Y. Miura, T. Fujita, H. Umemura, K. Suzuki, T. Tsuruta, S. Kura, R. Ono, S. Aoki, M. Hakamada, K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Dual energy CT is useful for the prediction of mesenteric and lateral pelvic lymph node metastasis in rectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 625-630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2019.1834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yutaro Hara, Takuya Miura*, Yoshiyuki Sakamoto, Hajime Morohashi, Hayato Nagase and Kenichi Hakamada	4. 巻 20
2. 論文標題 Organ/space infection is a common cause of high output stoma and outlet Open Access 10.1186/s12893-020-00734-7 obstruction in diverting ileostomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Surgery	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12893-020-00734-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morohashi H, Uchida C, Ogasawara H, Hara Y, Akaishi T, et al.	4. 巻 45
2. 論文標題 Outcomes of Total Mesorectal Excision and Lateral Lymph Node Dissection following Neoadjuvant Chemotherapy for Lower Rectal Cancer with Lateral Lymph Node Metastasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho	6. 最初と最後の頁 1922-1924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Miura T, Ishido K, Kakamoto Y, Kudo D, Kimura N, Morohashi H, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Necrotizing fasciitis of the thigh due to penetrated descending colon cancer: a case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-018-0544-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morohashi Hajime, Sakamoto Yoshiyuki, Miura Takuya, Ichinohe Daichi, Kubota Shunsuke, Yamazaki Keisuke, Ichisawa Aika, Mitsuhashi Yuto, Wakiya Taiichi, Hakamada Kenichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Short term outcomes of robotic assisted surgery following neoadjuvant chemotherapy for lower rectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Endoscopic Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ases.13055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Yoshiyuki, Morohashi Hajime, Miura Takuya, Tsutsumi Shinji, Takahashi Seiji, Hiramaki Kimiaki, Wakiya Taiichi, Hakamada Kenichi	4. 巻 65
2. 論文標題 A Prospective Multicenter Phase II Study on the Feasibility and Efficacy of S-1 and Oxaliplatin Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diseases of the Colon & Rectum	6. 最初と最後の頁 663 ~ 671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/DCR.0000000000001927	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 諸橋 一, 坂本義之, 佐藤健太郎, 三浦卓也, 袴田健一
2. 発表標題 予後規定因子から考える側方郭清の適応
3. 学会等名 2018大腸肛門病学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	袴田 健一 (Kenichi Hakamada) (30271802)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	
研究分担者	三浦 卓也 (Takuya Miura) (30722136)	弘前大学・医学部附属病院・講師 (11101)	
研究分担者	坂本 義之 (Yoshiyuki Sakamoto) (60361010)	弘前大学・医学研究科・准教授 (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鬼島 宏 (Hiroshi Kijima) (90204859)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関