

平成 21 年 6 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790275
 研究課題名 (和文) 大腸がん浸潤先進部におけるがん間質相互作用に関する分子機構の研究
 研究課題名 (英文) Study of the mechanism on cancer-stroma interaction at the invasive front of colorectal cancer
 研究代表者
 深澤 由里 (FUKASAWA YURI)
 国立がんセンター (研究所及び東病院臨床開発センター)・病理部・研究員
 研究者番号：90392331

研究成果の概要：

大腸がんの浸潤先進部において、がん細胞周囲に存在する間質組織に注目し、圧排性発育を呈するがん間質と、浸潤性発育を呈するがん間質の発現を比較した。浸潤性発育を呈する腫瘍の周囲において発現の高かった候補遺伝子のうち、CXCL12 (ケモカインのリガンドの一種) においてヒト大腸がん症例 165 例を用いた免疫組織化学染色を施行した。浸潤性発育を呈する腫瘍部分に高頻度に CXCL12 の発現を認め、CXCL12 高発現群は有意な差をもって予後不良であることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：消化器・がん

1. 研究開始当初の背景

がん症例の予後は腫瘍の浸潤・転移能に依存しており、それらはがん周囲の微小環境によってしばしば規定される。すなわちがん細胞とがんを囲繞する間質細胞との相互作用ががん細胞の生存・増殖に関わり、さらにはがんの浸潤・転移メカニズムの重要な因子になっている事が明らかになってきている [Bhowmick NA. etc. Science 2004, Raghu Kalluri etc. Nat Rev, 2006 等]。

がん細胞の生物学的特性ががんの浸潤・転移能に影響する事は既に周知の事実である。がん細胞の発生と増殖の後、その一部からより悪性度を増したがん細胞が出現する。これらの細胞では、細胞間接着能が抑制されていると同時に運動能が増し、より高い浸潤・転移能を有する様になる。それらの現象は特にがんの浸潤先進部で著明であり、がん細胞の細胞間接着性ならびに細胞基質間接着性異常

や脱分化等の変化は、組織形態像や分子病理学的解析により証明されている。例えばがん浸潤先進部において、がん細胞の細胞接着性異常により腫瘍腺管あるいは腫瘍胞巣の構築が崩れ個細胞性に浸潤している組織像にほぼ一致して、腫瘍細胞の E-カドヘリン、 α 、 β -カテニン、ディスアドヘリン、ラミニン 5 γ 2 鎖の発現の異常が認められる。さらにそれらの異常と臨床病理学的因子との関係について申請者が所属する部所より多数の報告がなされている [Aoki S. etc. Br J Cancer. 2003, Nakanishi Y. etc. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2004. 他]。申請者は以前に心筋梗塞後の線維化等の創傷治癒過程に発現する分子の発現を免疫組織化学染色にて検討する実験の実験協力者として細胞外基質の沈着に関する実験に携わっていた [Ishikawa Y. Histopathology, 2003]。またリンパ管内皮細胞を同定出来るペプチド抗体を作製し、全身の臓器における正常組織構築とがん組織のリンパ管の分布を観察してきた [Akishima Y. Virchows Arch. 2004]。その後血管新生およびリンパ管新生の分布や形態、予後との相関などの実験の協力者となっている [Ishikawa Y. Histopathology, 2006, Nakano T. Hum Pathol, 2005, Soh S, Prostate, 2004]。さらにリンパ管内皮細胞に腫瘍が侵入し、リンパ節転移する分子機構の解明を目指す実験を行ってきた。今まで免疫組織化学染色を中心とした間質を構成する細胞や組織の線維化の機構に関心をもち研究を継続している。その様な知識・経験を基盤とし申請者は日常的な外科病理診断の現場において、がんの種類、分化度、発生部位によりがん細胞の形態や形質に多様性があるだけでなく、それらのがんを囲繞する間質にも多様性がある事を見いだしている。例えば実際の外科病理標本において間質を構成する細胞の分布、炎症細胞浸潤の程度、新生血管の数や形態、細胞外基質の種類や分布等に違いが観察される。よって、がんの heterogeneity の様に間質にも多様性があり、がんの生物学的特徴により、がん周囲の間質の形態や形質、そしてがんと間質の相互作用に違いがあるのではないかと考えている。がん間質に関して形態学的な解析はされていたが、がん間質に関する分子レベルの解析はあまりなされていなかった。近年 in vitro の解析を中心とし間質を構成する線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症細胞とがん細胞の相

相互作用やがん間質形成の分子機構が個々の分子単位で明らかになってきている。線維芽細胞の分泌する HGF、IGF、EGF 等の成長因子、MMPs、IL-1, 6, 8, SDF-1 等のサイトカイン・ケモカイン、フィブロネクチンやコラーゲン等の細胞外基質ががん細胞に作用し、がんの増殖能や遊走能を促進する事がわかっている。しかし、がん間質相互作用は、がん細胞と間質との作用以外に間質を構成する細胞同士においても相互作用が存在することが示唆されており、未だがん間質相互作用に関する分子機構の全体像の詳細は明らかではない。がん間質は多種の細胞が相互作用し合う複雑な領域であることから、細分化された細胞単位の解析だけでなく、その集合体である組織という総合的な視点で解析をする必要があると考える。近年がん周囲の活性化した線維芽細胞を標的とする分子標的治療の開発等、がん周囲の間質を構成する細胞に対する分子標的治療も検討されて、がんの生物像に重要な役割を果たすがん間質相互作用における分子機構に関する総合的理解が求められている。

2. 研究の目的

がんの浸潤先進部におけるがん間質相互作用に関わるがん間質の分子機構の一端を解明する事を目的とする。

本研究では、手術検体から採取したヒト大腸がん組織を用い、浸潤先進部のがん細胞を囲繞する間質細胞の遺伝子発現変化を核酸レベルで網羅的に解析する事により、がんの増殖・浸潤・転移の分子機構の一端を解明できると考える。これらの解析から、より詳細ながんの病態診断及び予後予測を可能にし、さらには治療標的となる候補分子を同定する事を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) cDNA マイクロアレイによるがん間質の発現プロファイル解析

①ヒト大腸がん組織の凍結切片からの RNA 抽出：ヒト大腸がんの手術検体より、診断に支障のない残余部分からがんの浸潤先進部が含まれる様サンプリングを行い、凍結標本を作製する。凍結標本から HE 染色切片を作製し観察する。組織学的に、腫瘍先進部において腺管構造が保持されているがん部を含む凍結標本、あるいは腺管構造が崩れ小胞巣状あるいは個細胞性に間質内に浸潤する脱分化傾向を伴うがん部を含む凍結標本のみを選び出す。上記の形

態学的特徴を持ち、さらに極端な炎症細胞浸潤を認める部分や処置後等のがんの浸潤以外の影響の認められる部位は除外する。腺管構造が保持されているがん周囲の間質を Type1、腺管構造が崩れ脱分化傾向を認めるがん周囲の間質を Type2 と分類する。各群 10 例ずつ症例を選び、レーザーマイクロダイセクション法により、上記の形態学的特徴を有するがん間質組織のみを回収する。具体的には 10 μ m 厚凍結標本を作製し、エタノールで固定後 HE 染色を行う。レーザーマイクロダイセクションは Cell Cut (MMI 社) を用い、顕微鏡下で腫瘍細胞を厳密に取り除いた後、がん近傍の間質のみを個々に回収し、RNA を抽出する。

②cDNA マイクロアレイと候補遺伝子の選出：抽出した RNA をサンプルとし Affymetrix 社の Gene Chip (HumanU133 Plus2.0) による発現解析を施行する。得られたデータを遺伝子発現データ解析ソフトウェアである Expressionist を用い両群で有意に差を認める遺伝子 (例えば複数症例で両群間の発現の差を認め、群の平均値で 5 倍以上の差を認める等) を候補遺伝子として選出する。

(2) 候補遺伝子の検証

候補遺伝子に対し Gene Chip で使用したサンプルと異なる症例を複数例選び、レーザーマイクロダイセクション法により各群の形態学的特徴を示すがん間質組織を回収し抽出した RNA を用いた定量的 PCR を行う。さらにヒト大腸がん組織切片 (ホルマリン固定パラフィン包埋切片または凍結切片) を使用し、候補遺伝子のコードするタンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を施行する。市販の抗体が存在する分子に関しては市販の抗体を用い、抗体が市販されていない分子に関しては、Protomist DT を用いて合成したペプチドを免疫源とし、ウサギあるいはマウスに免疫し抗体を作製する。定量的 PCR で有意な差を認め、さらに免疫染色切片において、がん間質の構成細胞に特異的に発現を認める分子を候補分子とする。

(3) 候補遺伝子として挙げられた CXCL12 の大腸がん組織を用いた臨床病理学的因子との相関に関する検討

候補分子として挙げられた CXCL12 に対す

る抗体を用いて、予後等の臨床情報が得られている国立がんセンター中央病院で外科的に切除されたヒト大腸がん約 165 症例について免疫組織化学染色を施行し、分子の発現や形態学的特徴と臨床病理学的因子との関係について解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸がんにおけるがん間質相互作用の発現解析を行うため、ヒト大腸がんの手術検体より、がんの浸潤先進部が含まれる凍結標本を作製し、レーザーマイクロダイセクション法によりがん間質のみを回収した。組織学的に、腺管構造が保持されているがん周囲の間質を Type1、腺管構造が崩れ脱分化傾向を認めるがん周囲の間質を Type2 と分類し、発現解析をした。得られたデータを遺伝子発現データ解析ソフトウェアである Expressionist を用い、fold 値 2 倍以上、 $p < 0.05$ の条件で絞り込み、567 個の候補遺伝子を選び出した。

(2) 候補遺伝子として選ばれた遺伝子に対して、定量的 PCR にて検証を行い、定量的 PCR においても有意な差を認めた候補遺伝子をコードするタンパクに対する抗体を用いて、様々ながん組織を免疫組織化学的に検討した。Type1 と比較し Type2 で発現の高い候補遺伝子の中には、間質の線維芽細胞や血管内皮細胞に発現を認める分子と共に、腫瘍の浸潤先進部の低分化傾向を示す腫瘍細胞に強く発現を認める分子も複数認められた。

(3) そのうち、ケモカインの一つである CXCL12 (または SDF-1: stromal derived factor-1) は、間質にも弱い発現を認めるが、大腸がん細胞により強い発現を認めた。特に浸潤先進部において、腫瘍細胞が明瞭な腺管を形成せず、個細胞性、あるいは小集塊状に浸潤性に増殖するがん細胞において、CXCL12 の発現が目立って観察された。そこで、臨床経過のおえるヒト大腸がん症例のホルマリン固定切片 165 症例を用いた免疫組織化学的検討を行い、CXCL12 の発現と臨床病理学的因子との相関、予後との相関を検討した。腫瘍全体における CXCL12 の発現程度と、腫瘍の浸潤先進部における CXCL12 陽性の budding の個数により大腸がん症例 165 例を各 2 群に分けた。CXCL12 高発現群は CXCL12 低発現群に比して、budding 多数群は budding 少数群に比して有意に予後不良であることがわかった。またそれら 2 つの因子を組み合わせた CXCL12 高発現・budding 多数群は、それ以外の症例と比して、統計学的にさらに強力な予後予測因子となることが分かった。多変量解析を行い、2 つの因子を組み合わせた CXCL12 高発現・budding 多数群は、リンパ節転移と共に、生存予後において独立した因子であり、

さらに再発においても独立した因子であることがわかった。

(4) その他の候補遺伝子として挙げられた Lumican、TLE4 などにおいても免疫組織化学染色を施行し、これら分子の間質における発現程度と大腸がんの予後との間に相関があることが分かった。加えて、候補遺伝子の上位に挙げられたが免疫組織化学染色に適応する抗体が手に入らなかった MARCO、EphrinB3、SERPINB5 については、モノクローナル抗体を作製した。EphrinB3 に関しては免疫組織化学染色が可能な抗体を作製することができ、EphrinB3 はがん間質に focal に発現することが確認された。

以上より、がん間質に発現し、その発現が大腸癌の予後と相関する重要な分子を多数選出することができた。

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 1 件)

Yuri Akishima-Fukasawa, Yukihiro Nakanishi, Yoshinori Ino, Yoshihiro Moriya, Yae Kanai, Setsuo Hirohashi
Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. AJCP, 2009 August in press

[学会発表] (計 1 件)

大腸癌における CXCL12/SDF-1 の発現の意義.
第 97 回日本病理学会総会, 2008. 5. 15. 石川県立音楽堂 (金沢市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 由里 (FUKASAWA YURI)

国立がんセンター (研究所及び東病院臨床開発センター)・病理部・研究員

研究者番号 : 90392331