

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08398

研究課題名(和文)大腸低分化腺がんの分子病態からアプローチするリンパ節転移診断・治療への応用

研究課題名(英文)A molecular analysis in colorectal poorly differentiated adenocarcinoma and its clinical application

研究代表者

青木 敬則 (Aoki, Hironori)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：40749496

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)：早期大腸がんにおける低分化成分の存在は、リンパ節転移と密接に関連することが知られているが、分化度を規定する分子機構はいまだ不明である。我々は、臨床検体を対象としたトランスクリプトーム解析から、早期低分化腺がんを高発現する一連の遺伝子を同定し、その中でもSAA1 (serum amyloid A1) に着目した。SAA1は早期大腸がんの浸潤先進部の低分化腺がん領域において特異的に高発現していた。大腸がん細胞株を用いた解析から、SAA1が遊走・浸潤を促進することが分かった。さらに我々は、マクロファージによるIL-1 刺激が大腸がん細胞のSAA1発現を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は早期大腸低分化腺がんの解析から、SAA1が浸潤先進部の低分化成分に極めて特異的に発現することを見いだした。低分化腺がんは著しく進行が早いために早期で発見することは困難である。本研究は、最先端の消化管内視鏡診断技術をもつ専門施設と強力で連携することで初めて可能となった、独自性の高い研究である。本研究から、SAA1が早期大腸がんの予後予測マーカーや、治療標的となりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Submucosal invasion and lymph node metastasis are important issues affecting treatment options for early colorectal cancer (CRC). We performed RNA-sequencing (RNA-seq) with poorly differentiated components (PORs) and their normal counterparts isolated from T1 CRC tissues, and detected significant upregulation of SAA1 in PORs. Immunohistochemical analysis revealed that SAA1 was specifically expressed in PORs at the invasive front of T1b CRCs. Upregulation of SAA1 in CRC cells promoted cell migration and invasion. We also found that interleukin 1 (IL-1) produced by macrophages induces SAA1 expression in CRC cells. Immunohistochemical analysis of primary T1 CRCs showed accumulation of macrophages at SAA1-positive invasive front regions. Our data suggest that macrophages at the invasive front of early CRCs promote cancer cell migration and invasion through induction of SAA1, and that SAA1 may be a predictive marker and a therapeutic target.

研究分野：消化器内科学

キーワード：早期大腸がん 低分化腺がん 浸潤・転移 トランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸粘膜下層浸潤がん(SMがん)の約10%はリンパ節転移を伴うことから、内視鏡切除後の病理診断により転移リスクを層別化して追加外科治療を考慮するが、十分にリンパ節転移リスクを予測できていたとは言い難い。大腸がん治療ガイドラインにおいて、SMがんに対する内視鏡的摘除後の追加外科治療を考慮する因子として、低分化腺がんが示されている。また、浸潤先進部の低分化成分とリンパ節転移との関連が報告されているが、大腸がんの分化度・悪性度を規定するメカニズムは未だ不明な点が多い。

これまでの研究から、大腸SMがんでは浸潤先進部の低分化成分の存在がリンパ節転移と密接に関わることが明らかにされている(Ueno H et al. Am J Surg Pathol, 2014)。この分子メカニズムを解明することで、浸潤・転移を克服するための重要な知見が得られると期待される。しかし早期がんの低分化組織はごく微量であり、また進行がんでは既に多数の染色体異常や遺伝子変異が蓄積していることから、分化度を規定する分子を同定することはこれまで困難であった。

2. 研究の目的

本研究は、早期大腸低分化腺がんにおける新たな分子マーカーや治療標的分子を同定することを目的とする。そのために、早期低分化腺がんの臨床例を対象にトランスクリプトーム解析を行い、特徴的な遺伝子発現変化を明らかにする。また低分化腺がんに特異的に発現する分子を同定し、分子マーカーや治療標的としての有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

組織検体

外科切除されたT1大腸がんから低分化成分をレーザーキャプチャーマイクロディセクションで分離し、RNAを抽出した。また、97例の早期大腸がん症例を免疫染色解析した。

RNA-seq 解析

抽出したRNAの品質をバイオアナライザで検証した後、HiSeq2500によるRNA-seq解析を行った。データをStrand NGS (Agilent Technologies)により解析した。

定量 RT-PCR

臨床検体および培養細胞におけるSAA1、CD80、CD163、IL1Bの発現を定量RT-PCRにて解析した。

免疫染色

SAA1、CD80、CD163の発現を免疫染色により解析した。画像データをImageJソフトにより解析し、発現量を定量化した。

細胞培養

大腸がん細胞株(CaCO2, HCT116, RKO, SW48, SW480, SW620, T84)を発現解析、機能解析に用いた。ヒト急性単球性白血病細胞株THP-1を、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)で処理し、マクロファージ様細胞を得た。また大腸がん細胞株と共培養し、腫瘍関連マクロファージ様細胞を得た。

ノックダウンと機能解析

siRNAを用いて、SAA1のノックダウンを行った。Cell Counting Kit-9を用いてCell viabilityアッセイを行った。Boydenチャンバーを用いて、遊走アッセイ、浸潤アッセイを行った。また三次元コラーゲンゲル培養を用いて、浸潤能を解析した。

4. 研究成果

T1大腸がん低分化成分におけるSAA1高発現の同定

RNA-seq解析から、T1大腸がん低分化成分において高発現する遺伝子を10個同定した。その中から、Serum amyloid A1 (SAA1)に着目した。T1大腸がん症例の免疫染色の結果、SAA1発現は腫瘍深達度、リンパ管浸潤、ならびに低分化成分の存在と有意に相関することが明らかとなった。特に我々は、SAA1が低分化成分を有する症例の浸潤先進部に染まる事に着目した。

SAA1は大腸がん細胞の遊走と浸潤を促進する

大腸がん細胞株を用いた発現解析から、SAA1が多くの大腸がん細胞において発現することを見出した。その中から、特にSAA1を高発現するSW480をノックダウン実験に、比較的発現が低いHCT116を過剰発現実験に選択した。SAA1のノックダウンは、SW480細胞の増殖能に影響を与えなかったが、遊走・浸潤を抑制した。一方、SAA1の過剰発現はHCT116細胞の遊走・浸

潤を促進した。

IL-1 β は大腸がん細胞のSAA1発現を誘導する

SAA1は肝細胞で産生される炎症マーカーとして有名であり、IL-1 β によって発現が誘導されることが知られている。そこで大腸がん細胞をIL-1 β 処理した結果、SAA1の発現上昇が確認された。IL-1 β は大腸がん細胞の遊走・浸潤を促進したが、その効果はSAA1ノックダウンにより部分的に抑制された。このことから、IL-1 β による遊走・浸潤促進は、少なくとも一部はSAA1を介することが示された。

マクロファージ由来のIL-1 β が大腸がん細胞のSAA1発現を誘導する

大腸がん組織においてIL-1 β を産生する細胞として、がん線維芽細胞(CAF)とマクロファージが考えられた。大腸がん細胞とCAFの共培養はSAA1発現に影響を与えなかった。一方、大腸がん細胞とマクロファージとの共培養により、大腸がん細胞のSAA1発現、ならびにマクロファージのIL1B発現が誘導された。また、臨床検体における免疫染色から、SAA1発現陽性の浸潤先進部におけるマクロファージの集積が認められた。これらの結果から、マクロファージと大腸がん細胞が、IL-1 β とSAA1を介して相互作用することが、浸潤が促進されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sudo Gota, Aoki Hironori, Yamamoto Eiichiro, Takasawa Akira, Niinuma Takeshi, Yoshido Ayano, Kitajima Hiroshi, Yorozu Akira, Kubo Toshiyuki, Harada Taku, Ishiguro Kazuya, Kai Masahiro, Katanuma Akio, Yamano Hiro o, Osanai Makoto, Nakase Hiroshi, Suzuki Hiromu	4. 巻 112
2. 論文標題 Activated macrophages promote invasion by early colorectal cancer via an interleukin 1 serum amyloid A1 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4151 ~ 4165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15080	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 NIINUMA TAKESHI, KITAJIMA HIROSHI, YAMAMOTO EIICHIRO, MARUYAMA REO, AOKI HIRONORI, HARADA TAKU, ISHIGURO KAZUYA, SUDO GOTA, TOYOTA MUTSUMI, YOSHIDO AYANO, KAI MASAHIRO, NAKASE HIROSHI, SUGAI TAMOTSU, SUZUKI HIROMU	4. 巻 41
2. 論文標題 An Integrated Epigenome and Transcriptome Analysis to Clarify the Effect of Epigenetic Inhibitors on GIST	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2817 ~ 2828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15062	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 Aoki Hironori, Adachi Yasushi, Yamamoto Eiichiro, Yoshida Yukinari, Ishii Yoshifumi, Yamano Hiro o, Suzuki Hiromu, Endo Takao	4. 巻 71
2. 論文標題 The continuum of transformation of TSA to low grade neoplasia and cancer with BRAF mutation ? A case with molecular analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 368 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13078	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 Aoki Hironori, Omori Yuko, Katanuma Akio	4. 巻 20
2. 論文標題 A Case of Pedunculated Esophageal Neuroendocrine Tumor G1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 e651 ~ e652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cgh.2021.02.039	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 Ishii Tatsuya, Harada Taku, Tanuma Tokuma, Yamazaki Hajime, Tachibana Yasuhiro, Aoki Hironori, Shinohara Toshiya, Katanuma Akio	4. 巻 93
2. 論文標題 Histopathologic features and fragmentation of polyps with cold snare defect protrusions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastrointestinal Endoscopy	6. 最初と最後の頁 952 ~ 959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gie.2020.07.040	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木拓, 須藤豪太, 青木敬則, 山本英一郎, 高澤啓, 新沼猛, 吉戸文乃, 北嶋洋志, 久保俊之, 原田拓, 小山内誠, 仲瀬裕志.
2. 発表標題 腫瘍関連マクロファージはIL-1 -SAA1 axisを介して早期大腸がんの浸潤を促進する.
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木敬則, 山本英一郎, 高澤啓, 新沼猛, 山野泰穂, 萬頭, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小山内誠, 仲瀬裕志, 菅井有, 鈴木拓.
2. 発表標題 SMOC1の大腸腫瘍診断マーカーとしての臨床的有用性の検討.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須藤豪太, 山本英一郎, 青木敬則, 高澤啓, 新沼猛, 久保俊之, 萬頭, 吉戸文乃, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小山内誠, 仲瀬裕志, 鈴木拓.
2. 発表標題 活性化マクロファージはIL-1 -SAA1 axisを介して早期大腸がんの浸潤を促進する.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木 敬則、山本 英一郎、高澤 啓、新沼 猛、山野 泰穂、萬 顕、北嶋 洋志、甲斐 正広、小山内 誠、仲瀬 裕志、菅井 有、鈴木 拓
2. 発表標題 SMOC1 の大腸腫瘍診断マーカーとしての臨床的有用性の検討
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須藤豪太，山本英一郎，青木敬則，高澤啓，新沼猛，久保俊之，萬顕，北嶋洋志，甲斐正広，小山内誠，仲瀬裕志，鈴木拓．早期大腸がん浸潤先進部の分子解析．
2. 発表標題 早期大腸がん浸潤先進部の分子解析．
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木拓，青木敬則，山本英一郎，高澤啓，新沼猛，北嶋洋志，原田拓，山野泰穂，松下弘雄，菅井有．
2. 発表標題 大腸鑑歯状病変におけるSMOC1遺伝子メチル化異常の検討．
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hironori Aoki, Eiichiro Yamamoto, Akira Takasawa, Takeshi Niinuma, Hiro-o Yamano, Akira Yorozu, Hiroshi Kitajima, Masahiro Kai, Makoto Osanai, Hiroshi Nakase, Tamotsu Sugai, Hiromu Suzuki
2. 発表標題 Clinical usefulness of SMOC1 as a diagnostic marker of colorectal precancerous lesions
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hironori Aoki, Eiichiro Yamamoto, Akira Takasawa, Hiro-o Yamano, Taku Harada, Tamotsu Sugai, Hiromu Suzuki
2. 発表標題 Clinical usefulness of SMOC1 as a diagnostic marker for colorectal serrated lesions and colorectal precancerous lesions
3. 学会等名 ACG2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木敬則, 山本英一郎, 高澤啓, 山野泰穂, 原田拓, 松下 弘雄, 菅井有, 鈴木拓
2. 発表標題 大腸鋸歯状腺腫の発育進展に関わるSMOC1メチル化異常の検討
3. 学会等名 第16回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2020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	山本 英一郎 (Yamamoto Eiichiro) (60567915)	札幌医科大学・医学部・訪問研究員 (20101)	

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
---------	---------