

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09134

研究課題名(和文)大腸癌肝転移におけるメタドヘリンの分子機構の解明と新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文)Biological role of metadherin in liver metastases of colon cancer and development of novel molecular target therapy

研究代表者

清水 宏明(Shimizu, Hiroaki)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：80272318

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)：上皮間葉転換(EMT)は癌が転移する際の重要なプロセスである。大腸癌におけるEMTのKey moleculeとして知られるメタドヘリン(MTDH)およびSnail1に着目し、EMTマーカーと臨床病理学的因子および患者予後との関連を検索した。結果は、同時性肝転移大腸癌原発巣ではMTDHおよびSnail1の高発現がみられ、EMT機構が亢進しており、肝転移形成のプロセスへの関与が強く示唆された。また、同時性肝転移巣においてのMTDHおよびSnail1発現の意義についてはさらなる検討を要するが、Snail1高発現を認めた症例は肝切除後の予後が不良であり、予後因子となる可能性が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では大腸癌の原発巣、肝転移巣を一連の実験系で検討し、肝転移メカニズムを考察することを主眼とする。転移浸潤過程でのMTDH/Snail1の転移制御機構における役割が明らかとなれば、それに応じたinterventionによる治療戦略の可能性も考えられる。つまり、MTDH、Snail1をターゲットとした治療を確立することで現行の化学療法とは異なった視点から、肝転移再発の抑制に対しての治療が考えられる。また、癌の浸潤転移のメカニズムに重要な上皮間葉転換(EMT)は、癌の転移に関する普遍的な分子機構の謎を解く上で非常に有用であり、今後の新しい癌治療への展開の可能性切り開くものとする。

研究成果の概要(英文)：Metadherin(MTDH) and Snail1 are known to be key molecules in epithelial-mesenchymal transition(EMT) and an important process in cancer metastasis. To investigate clinical significance of EMT markers in colorectal cancer(CRC), especially relation between the expression of MTDH and Snail1 in CRC/liver metastasis and clinical outcome. Surgically resected specimens were investigated the expression of MTDH and Snail1 by immunohistochemical staining. Results: MTDH was strongly expressed in the liver metastasis, as compared to the primary CRC. Expression of Snail1 in the primary CRC with liver metastasis was significantly increased, as compared to CRC without liver metastasis. Furthermore, high Snail1 expression in liver metastases was associated with poor prognosis. These results suggest that EMT may strongly contribute to the mechanism of liver metastasis from primary CRC. Furthermore, high Snail1 expression in liver metastasis may be a significant prognostic factor after hepatectomy.

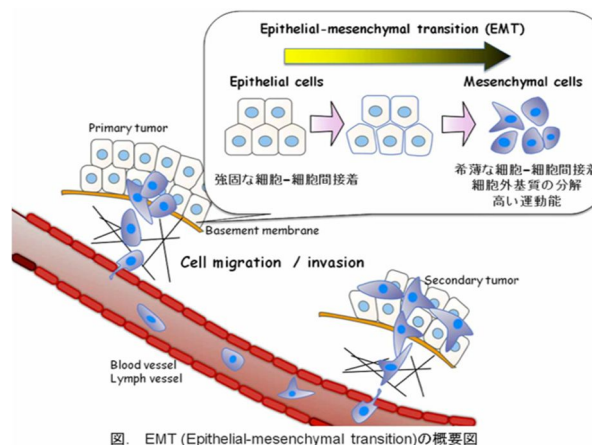
研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 肝転移 メタドヘリン Snail1 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化器癌の他臓器転移は重要な予後規定因子の一つである。肝臓は癌の転移好発臓器であり、大腸癌肝転移は積極的切除により予後が改善するとされるが、その治療成績は未だ十分とは言い難いのが現状であり、癌転移形成のメカニズムの解明と新たな治療ターゲット、治療法の開発は喫緊の課題である。腫瘍の転移は、複雑な多段階プロセスであり、まず、腫瘍細胞は、原発腫瘍塊から離れて血液循環に侵入し、原発腫瘍からの血流パターンに応じてあるいは特定の臓器へ優先的に運ばれ、臓器特異的部位で転移性病巣を樹立する。

近年、癌の増殖、転移形成には癌細胞自身だけでなく原発巣、転移巣周囲の間質細胞含む微小環境 (microenvironment) が重要な役割を果たすことが注目されている。また、癌細胞は転移の過程において右図に示す如く、EMT (epithelial-mesenchymal transition) により脱分化し、より遊走能の高い間葉系細胞の形質を獲得することが転移成立の鍵である。また、転移の



成立には stemness の獲得あるいは、維持が不可欠であり、がんの悪性度を左右することが知られている。(Thompson WE and Raviv I, The social aspect of EMT and MET plasticity. *Nat Med* 2011).

(2) これまでに癌微小環境や EMT の制御に関わる分子には様々なものが報告されているが、最近その一つとしてメタドヘリン (MTDH) が報告された。MTDH は乳癌の肺転移を促進する因子として初めて報告され (Brown DM et al, *Cancer Cell*. 2004)、最近では他癌種でも転移にかかわる予後不良因子としてレポートされている。しかしながら、MTDH の生物学的役割は明確でなく、転移腫瘍形成における MTDH の機能的な重要性は依然として不明なままである。MTDH は癌の転移の biology を解き明かす上では、魅力的な分子であり、また、新たな有力な治療ターゲットの一つとして考えられる。

2. 研究の目的

大腸癌における MTDH の発現と大腸癌肝転移 cascade の一連の分子機構について臨床サンプル (外科切除標本) を用いた検討と in vitro における基礎的検討を行い、肝転移腫瘍形成における MTDH の役割と、癌の転移の biology を解き明かすことを目的とした。

(1) 免疫組織染色による大腸癌原発巣、肝転移巣癌切除検体における MTDH の発現と臨床病理学的因子や予後との関連に関する臨床的検討: 大腸癌原発巣、肝転移巣外科切除症例のサンプルを用いて MTDH の発現を免疫染色にて評価する。癌細胞での発現に加え周囲微小環境を構成する細胞、また、腫瘍周囲 (非癌部) 組織における発現の有無、その発現の多寡にも注目し評価を行い、各患者の予後、臨床病理学的因子と

の相関につき検討する。また、原発巣の大腸癌サンプルについても同様に検討を行い、原発巣、転移巣との対比を行い、転移形成の一連の流れの中で MTDH の発現がどのような変化をおこしているのかを解析する。

(2) in vitro の実験： 原発巣、転移巣からヒト大腸癌細胞株における MTDH の多寡を評価し、Epithelial-Mesenchymal markers の発現の評価を行い、MTDH の発現が EMT-MET との関連、さらには癌細胞増殖、浸潤、遊走能、EMT へ及ぼす影響を解き明かすことを目的とした。

3 . 研究の方法

免疫組織染色による大腸癌原発巣、肝転移巣癌切除検体における MTDH の発現と臨床病理学的因子や予後との関連の検討。

大腸癌原発巣、肝転移巣癌切除症例のサンプルを用いて MTDH と Snail1 の発現を免疫染色にて評価する。さらに、EMT マーカー、上皮系マーカー、間葉系マーカーの発現を免疫染色 (表1) によって評価し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

表 1. Methods

<ul style="list-style-type: none"> Immunohistochemical staining Surgically resected specimen (1) primary CRC and (2) liver metastasis
EMT markers:
MTDH (D5Y8R, Cell Signaling, Danvers, MA)
Snail1 (ab85936, Abcam, Cambridge, UK)
Epithelial markers:
E-cadherin (36B5, Leica Biosystems, Germany)
Mesenchymal markers:
Vimentin (V9, Agilent, Santa Clara, CA)
N-cadherin (IAR06, Leica Biosystems, Germany)

対象は、2017 年 1 月から 2018 年 9 月までに大腸癌原発巣の切除を施行された大腸癌同時性肝転移症例のうち、2 期的に肝切除を施行した 15 例とした。また、コントロール群として、同時期に大腸癌原発巣切除を受けた Stage II, III、深達度 SS/A の 15 例を選択した。癌細胞での発現に加え周囲微小環境を構成する細胞、また、腫瘍周囲 (非癌部) 組織における発現の有無、その発現の多寡にも注目し評価を行い、各患者の予後、臨床病理学的因子との相関につき検討した。また、原発巣の大腸癌サンプルについても同様に検討を行い、原発巣、転移巣との対比を行い、転移形成の一連の流れの中で MTDH の発現がどのような変化をおこしているのかを考察した。また、それぞれの群の末梢血における血清 MTDH 値を ELISA (Human MTDH ELISA Kit, LifeSpan BioSciences, INC, WA) にて測定し、比較検討した。

4 . 研究成果

(1) 年齢、性別、原発部位、分化度、腫瘍径、リンパ節転移、脈管侵襲については両群とも有意差はなく、深達度はすべての症例で T3 であった (表 2)。

(2) 大腸癌同時性肝転移群とコントロール群の原発巣における MTDH と Snail1 の発現：

原発巣における MTDH は両群のほとんどの症例で発現しており、その強度も両群に有意差は認めなかった。一方、Snail1 は、同

表 2. Patient characteristics

Comparison between CRC with liver metastasis and without liver metastasis

Factors	CRC with synchronous liver metastasis (n =15)	Stage II, III CRC (n = 15)	P value	
Clinicopathological factors				
Age	years	65.4± 8.6	70.6± 8.6	n.s.
Sex	male/female	10/5	9/6	n.s.
Site of primary tumors	colon/rectum	9/6	10/5	n.s.
Differentiation	tub, pap/por, muc	11/4	11/4	n.s.
Tumor diameter	mm	58.8± 17.6	46.2± 20.2	n.s.
pT stage	T3(SS/A)	15	15	n.s.
pN	- / +	4/11	7/8	n.s.
Lymphatic invasion	- / +	0/15	0/15	n.s.
Venous invasion	- / +	2/13	1/14	n.s.
Immunohistochemical staining of primary CRC				
E-cadherin	- / +, ++	0/15	0/15	n.s.
N-cadherin	- / +, ++	15/0	15/0	n.s.
Vimentin	- / +, ++	15/0	15/0	n.s.
MTDH	- / +, ++	2/13	0/15	n.s.
Snail1	- / +, ++	7/8	12/3	0.054

時性肝転移症例において、肝転移の無い症例に比べて発現が亢進する (p=0.054) 傾向

を認めた。また、原発巣では、上皮系マーカーである E-cadherin は、全例において発現を認めるものの、間葉系マーカーである N-cadherin, Vimentin の発現は全例認めなかった(表 3)。

(3) 次に、原発巣における MTDH、Snail1 の発現強度と臨床病理学的因子との間で検討を行った。MTDH 陽性例は有意に高齢であった他は、いずれの因子間においても統計学的有意差は認めなかった。また、MTDH 発現と Snail1 発現との間にも有意差は認めなかった(表 3)。

さらに、同時性肝転移を有する症例の原発巣と肝転移巣における EMT マーカーの発現強度解析を行った。同時性肝転移巣における MTDH は原発巣に比べ、有意に強い発現 ($p < 0.05$) を認めた。一方、同時性肝転移巣における Snail1 の発現は 6 例 (40%) において認められたが、原発巣との間にその発現の強度には、有意差は認めなかった(表 4)。また、ELISA で測定した末梢血における血清 MTDH 値は、大腸癌同時性肝転移陽性群と陰性群との間には、差異は認めなかった ($26.9 \pm 17 \text{ pml/ml}$ vs $32.5 \pm 15 \text{ pml/ml}$)

実際の MTDH の免疫染色像を示す。Case 1 では原発巣、肝転移巣ともに強発現を呈したが、Case 2 では原発巣は陰性である一方、転移巣において発現を認めた(図 1)。

表 3. Relationship between clinicopathological factors and EMT marker expression in primary CRC

Clinicopathological factors	MTDH		P value	Snail1		P value
	-	+ / ++		-	+ / ++	
Age (years)	51.5 ± 2.1	69.8 ± 7.2	0.002	69.5 ± 9.6	65.3 ± 7.2	n.s.
Sex (male/female)	2/0	11/7	n.s.	7/6	6/1	n.s.
Site of primary tumors (colon/rectum)	0/2	14/4	n.s.	9/4	5/2	n.s.
Differentiation (tub,pap,por,muc)	2/0	14/4	n.s.	10/3	6/1	n.s.
Tumor diameter (mm)	57 ± 1.4	52 ± 20.6	n.s.	52.0 ± 17.8	53.4 ± 24.0	n.s.
pT stage T3(S5/A)						n.s.
pN (- / +)	0/2	7/11	n.s.	5/8	2/5	n.s.
Lymphatic invasion (- / +)	0/2	1/17	n.s.	1/12	0/7	n.s.
Venous invasion (- / +)	0/2	1/17	n.s.	1/12	0/7	n.s.
Immunohistochemical staining of primary CRC						
MTDH	- / +, ++			1/12	1/6	0.64
Snail1	- / +, ++	1/1	12/6			

表 4. Pathological factors

Comparison between primary tumor and corresponding liver metastasis

Factors	Primary tumor (n = 15)	Corresponding Liver metastasis (n = 15)	P value
MTDH	-	2	0
	+	9	1
	++	4	14
Snail1	-	7	9
	+	6	4
	++	2	2
			n.s.

図 1. MTDH expression (1)

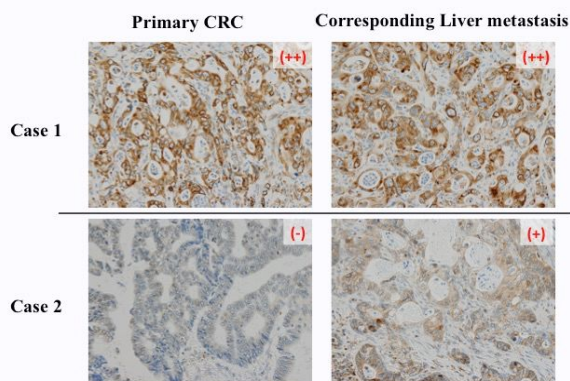
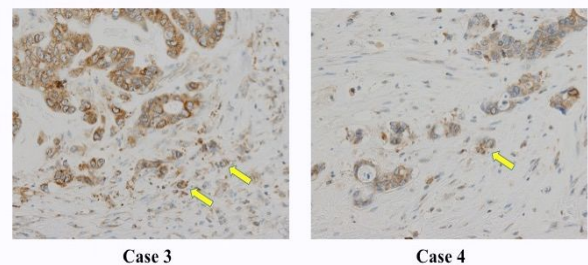


図 2. MTDH expression (2)

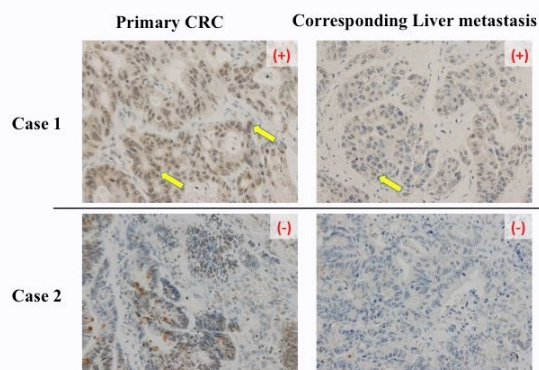
• MTDH was strongly expressed in isolated cancer cell clusters at invasive tumor front in liver metastasis.



さらに、Case3-4 では、肝転移巣腫瘍先進部においては、Budding 様の個々の癌細胞が間質浸潤を示す部位で強い MTDH 発現を認めた(図 2)。

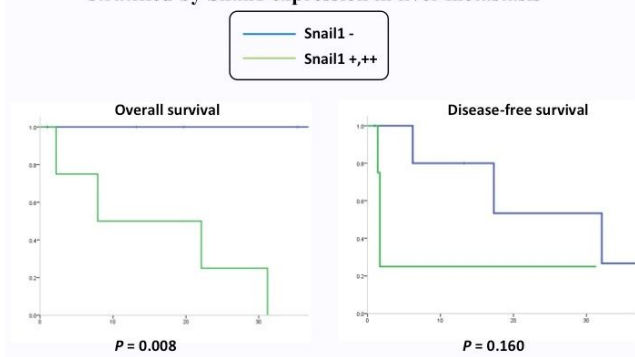
Snail1 発現に関しては、Case1 の矢印で示すように核の染色が見られる細胞を陽性と判定した。Case2のように、原発巣、転移巣とも陰性の例も散見された。(図 3)

図 3. Snail expression



(4) 転移巣における Snail1 発現により層別化した生存曲線を見ると Snail1 発現例では、有意に Overall survival が短く、Disease-free survival も短い傾向を認めた(図 4)。

図 4. Kaplan-Meier analysis stratified by Snail1 expression in liver metastasis



(5) 研究成果のまとめ

- ・同時性肝転移を有する大腸癌では、原発巣よりも転移巣で強く MTDH 発現がみられ、とくに腫瘍先進部で強い発現が認められた。
- ・同時性肝転移を有する大腸癌原発巣の Snail1 発現は、同時性肝転移のない大腸癌原発巣よりも亢進していたことから、大腸癌肝転移には EMT が強く関与していることが示唆された。
- ・同時性肝転移巣における Snail1 発現の意義については今後のさらなる検討を要するが、Snail1 高発現を認めた症例は肝切除後の予後が不良であり、予後因子となる可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hosokawa Isamu, Shimizu Hiroaki, Ohtsuka Masayuki, Miyazaki Masaru	4. 巻 27
2. 論文標題 Liver Transection-First Approach in Left Trisectionectomy for Perihilar Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 2381 ~ 2386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08306-y	査読の有無 無
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 Hosokawa I, Ohtsuka M, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M, Shimizu H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Right intersectional transection plane based on portal inflow in left trisectionectomy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgical and Radiologic Anatomy	6. 最初と最後の頁 489-498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00276-018-2135-9	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 Hosokawa I, Shimizu H, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Koda K, Miyazaki M, Ohtsuka M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Outcomes of left trisectionectomy and right hepatectomy for perihilar cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HPB (Oxford).	6. 最初と最後の頁 589-593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hpb.2018.08.017.	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 Yokota T, Nojima H, Kuboki S, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Takano S, Ohtsuka M	4. 巻 259
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate Receptor-1 Promotes Vascular Invasion and EMT in Hepatocellula	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Reserch	6. 最初と最後の頁 200-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss	査読の有無 無
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 Kosugi C, Koda K, Denda T, Ishibashi K, Ishida H, Seike K, Sakata H, Yanagisawa S, Miyazaki A, Takayama W, Koike N, Shimizu H, Matsubara H	4. 巻 36
2. 論文標題 Multicenter phase clinical study of the efficiency and safety of capecitabine plus intermittent oxaliplatin with bevacizumab as first-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer(VOICE trial)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 2637-2547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00384-021-03995-7	査読の有無 無
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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kosugi C, Koda K, Shimizu H, Yamazaki M, Shuto K, Nojima H, Murakami T, Ashizawa Y.
2. 発表標題 Safety and efficacy of down staging of neoadjuvant chemotherapy with modified FOLFOX6 (combination chemotherapy of infusional 5-FU/I-Leucovorin and intermittent oxaliplatin) with bevacizumab in patients with advanced lower rectal cancer .
3. 学会等名 The 30th Biennial Congress of ISUCRS (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小杉千弘、幸田圭史、山崎将人、首藤潔彦、碓井彰大
2. 発表標題 局所進行下部直腸癌に対する術前分子標的薬併用化学療法のは非
3. 学会等名 第75回日本大腸肛門病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosugi C, Koda K, Shimizu H, Yamazaki M, Shuto K, Nojima H, Hosokawa I, Murakami T, Takhashi M, Miyazawa Y
2. 発表標題 Evaluation of neoadjuvant chemotherapy with modified FOLFOX6 (Combination chemotherapy of infusional 5-FU/I-Leucovorin and intermittent Oxaliplatin) with Bevacizumab/ Cetuximab in patients with advanced lower rectal cancer
3. 学会等名 IASGO 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 崇、清水 宏明、野島 広之、芦澤 陽介、碓井 彰大、小杉 千弘、首藤 潔彦、山崎 将人、幸田 圭史
2. 発表標題 大腸癌同時性肝転移切除例の原発巣と転移巣におけるMTDHおよびSnai1の発現からみたEMT関連マーカーの意義
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021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	幸田 圭史 (Koda Keiji) (50260477)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	
研究分担者	山崎 一人 (Yamazaki Kazuhito) (60302519)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	
研究分担者	小杉 千弘 (Kosugi Chihiro) (60375681)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	
研究分担者	細川 勇 (Hosokawa Isamu) (60623676)	帝京大学・医学部・助教 (32643)	
研究分担者	首藤 潔彦 (Syutou Kiyohiko) (90372359)	帝京大学・医学部・准教授 (32643)	

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	野島 広之 (Nojima Hiroyuki) (10507320)	帝京大学・医学部・助教 (32643)	
研究分担者	村上 崇 (Murakami Takashi) (80621870)	帝京大学・医学部・助教 (32643)	

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