

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目： 若手研究 (A)
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20689010
 研究課題名 (和文) 免疫染色を用いたシグナル伝達分子の発現パターンによる腫瘍のプロファイリング
 研究課題名 (英文) Immunoprofiling of signaling molecule on malignant tumor

研究代表者
 西原 広史 (NISHIHARA HIROSHI)
 北海道大学・大学院医学研究科・特任准教授
 研究者番号：50322805

研究成果の概要 (和文)：

悪性腫瘍に対するテーラーメイド治療を行うためには、個々の症例に対して個別に生物学的悪性度を評価する個別化診断を行う必要がある。本研究は、その基盤となるデータを作製するために、選定した腫瘍において免疫染色によりシグナル伝達分子の発現パターンをプロファイルするパイロット研究である。胃癌における結果では、新規分子標的薬の治療対象となる分子の発現などが見つかかり、この方法の有用性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

The development of molecular targeted therapy for cancer treatment is necessary to establish the “Taylor made medicine”, and also requires the personalized diagnostic system to evaluate the individual biological malignancy. In this study, we have performed the immunostain on the human cancer specimens for multiple signaling molecules, such as receptor tyrosine kinases and adaptor proteins, to establish the pathological basis for the personalized pathological diagnosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,200,000	3,660,000	15,860,000

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：診断病理学

1. 研究開始当初の背景

現在、腫瘍の病理診断は、癌取り扱い規約あるいは WHO 分類などにに基づき、組織型・分化度や深達度、脈管侵襲の程度について評価を行うことで標準化されている。しかし、例

えば大腸癌において同じ高分化型管状腺癌 (tub1) であっても、脈管侵襲 (ly, v) の有無や浸潤様式 (med, scirrhou) が顕著に異なる症例が存在することは、診断を行う病理医が日常抱く疑問の一つであり、同じ組織型・分化

度でも個々の患者に於いては、その浸潤・転移などの生物学的悪性度が大きく異なるため、抗癌剤などの治療成績も異なる場合が多い。従って、個々の患者にあった最適な治療法を選択するためには、個々の腫瘍の生物学的悪性度を個別に診断するシステムが必要である。

2. 研究の目的

本研究においては組織型・分化度に寄らない、シグナル伝達分子の発現パターンに基づく新しい腫瘍のプロファイリング法を確立することで、個々の腫瘍の生物学的悪性度を客観的に評価することを目的とする。また、抗癌剤など治療に対する感受性を同時に検討することで、プロファイリングのパターンにより最適な治療法を選択する、オーダーメイド治療の基盤作成を目指す。

3. 研究の方法

【免疫染色によるプロファイリング】

(1) 対象組織の選定： まず、対象分子の選定のため、大腸癌及び胃癌組織を用いる。大腸癌については既に、浸潤部間質量(med, int, sci)により3-5例ずつ選定し、後述するように条件検討を開始している。

(2) 対象分子の選定と分類： 以下の群に分類して検討を行う。

- ・細胞増殖群（リン酸化を検出） [ERK1/2, p38MAPK, JNK, MEK1/2, MKK3/4/6/7]
- ・アポトーシス群（発現量、リン酸化の検出） [p53, AKT, PTEN, Bad, Bcl-2/6/xL, c-IAP1/2, Caspase 3/9]
- ・細胞周期群（発現量、リン酸化） [CDK2/4/6/7, CyclinD1/3, p21waf1, p27kip1, p16INK4a, Rb, CHK1/2]
- ・受容体群（発現量、リン酸化） [EGFR, Her2, cKit, Met, PDGFR, FGFR]
- ・その他（転写制御、細胞接着、シグナル伝達分子など） [Crk, Abl, Syk, ZAP70, β -Catenin, Jak, STAT, CREB, Nf-kB, Ikb, mTOR, S6K, COX-2, ADCY6, Claudin5, Neuroglycan 2]

(3) 免疫染色： 上記に列挙した抗体は、大部分がCell Signaling Technology、DAKO、ZYMED社から免疫染色用の抗体として購入し、パラフィン包埋切片を用いて通常免疫染色を行う。免疫染色用として販売されていないものについては、賦活方法・濃度について初期検討を行ってから使用する。

(4) 評価と検討： 免疫染色の陽性判定は、4名の病理医に依頼し、0~+3の4段階にて判定を行い、その平均値を用いる。各グループ毎に+1以上となった項目の個数を算出し、プロファイルする。得られた発現パターン

を元に、グループ分類を再編し、同時に、癌取り扱い規約に従った病理診断と比較し、リンパ節転移、間質量、浸潤様式との対比を行うことで、どの分子群がどの因子と関連しているのかを検討する。

4. 研究成果

【免疫染色によるプロファイリング】

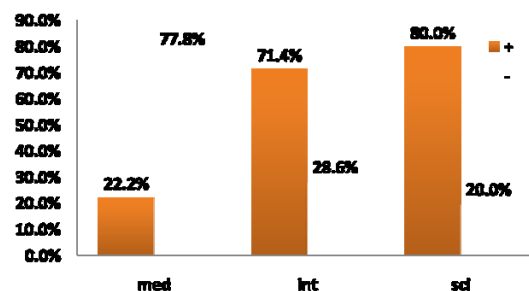
(1) 対象組織の選定： 胃癌20例を選定し、脈管侵襲の程度、発症年齢にて分類し下記の染色を施行。また悪性リンパ腫（T細胞、B細胞、それぞれ20例ずつ）についても、シグナル分子の検討を行った。

(2) 対象分子の選定と分類、免疫染色の条件検討： 平成20年度までに条件検討を終了した以下の抗体を用いて、プロファイリングを行った。**【シグナル伝達分子群】** Crk, CrkL, DOCK180, DOCK2, pP38, COX-2, bcl-2, p53 **【チロシンキナーゼ型受容体群】** EGFR, PDGFR-alpha, PDGFR-beta, c-Kit, VEGFR2, Her2 **【細胞接着分子群】** E-cadherin, Claudin-5, beta-Catenin, Integrin alpha5, Integrin alphaV, Integrin beta1, CD44, MMP2, MMP7

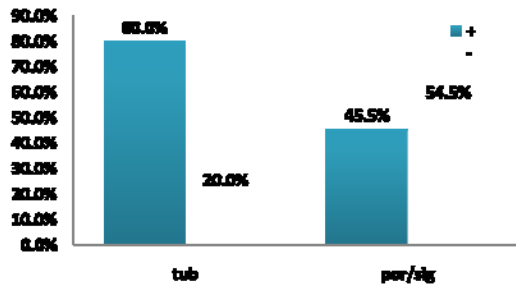
(3) 結果：【胃癌】正常部に比して腫瘍部で明らかな発現上昇を認めたのが、DOCK180、COX-2、PDGFR-beta、CD44、MMP7であった。また、c-Kit、EGFRについては、明らかな発現を認める症例が20-30%認められた。脈管侵襲や間質量と関連のある分子群は同定出来なかった。40歳以下の若年発症例では、40歳以上の症例に比して有意にbeta-Cateninの核染色性が認められた。これらの結果をまとめた表を以下に示す。

	+(正常上度より高発現)	-
EGFR	11 (57.3%)	10 (47.6%)
PDGFR- α	1 (4.8%)	20 (95.2%)
PDGFR- β	0 (0.0%) ※腫瘍間質では高発現	21 (100%)
c-kit	5 (23.8%)	16 (76.2%)
Her2	13 (61.9%)	8 (38.1%)
cKit	1 (4.8%)	20 (95.2%)
CrkL	2 (9.5%)	19 (90.5%)
DOCK180	4 (19.0%)	17 (81.0%)
COX-2	6 (28.6%)	15 (71.4%)
E-cadherin	9 (42.9%)	12 (57.1%) ※正常上度より低発現なもの
β -catenin	9 (42.9%) ※核染色性を示したもの	12 (57.1%) ※核染色性を示したもの
cyclinD1	14 (66.7%)	7 (33.3%)
p53	17 (81.0%)	4 (19.0%)
MMP7	11 (52.3%)	10 (47.6%)

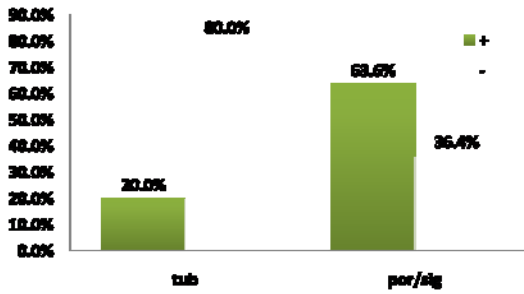
<各間質量におけるEGFRの陽性率>



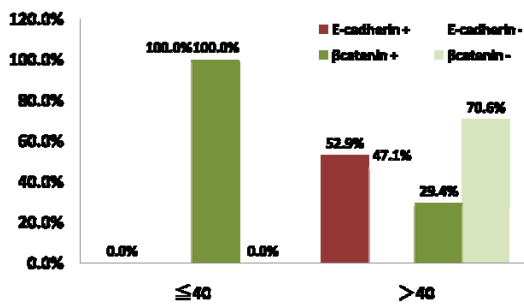
<各組織型におけるHer2の陽性率>



<βカテニンの核陽性率>

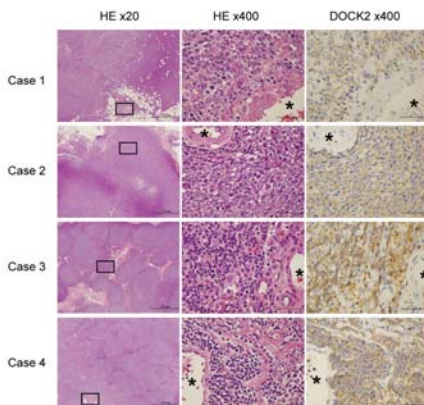


<発症年齢における E-cadherin 及び β-catenin の陽性率>



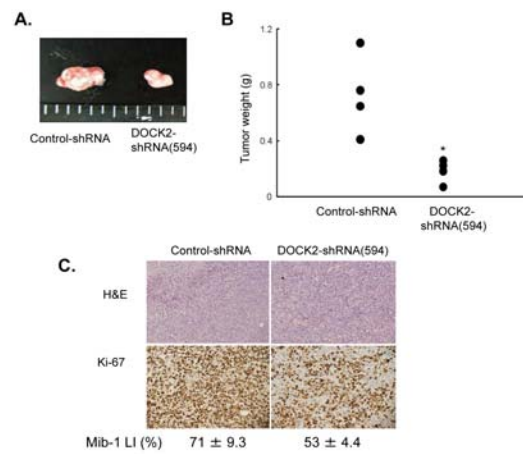
【悪性リンパ腫】検討を行った全ての症例において DOCK2 の発現が認められた。

Fig. 1



(4) **考察、意義、重要性**：胃癌において、EGFRやc-kitの発現している症例については、分子標的治療が有効である可能性があり、治療法の選択枝を増やすことが期待できる。また、予後不良な若年例でb-cateninが陽性となることから、Wnt-pathwayの関与や示唆され、新たな治療戦略の策定が期待できる。また、悪性リンパ腫における DOCK2 の発現については、本研究に関連して分子生物学的手法を用いて検討を行ったところ、DOCK2 の発現を siRNA を用いて抑制することで、有意に腫瘍の増生を抑えることが可能であることが証明できた (以下の Fig4 参照)。従って、今後の悪性リンパ腫の診断・治療に大きく貢

Fig. 4



献するデータを得ることが出来た。

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6件)

①Wang L, Nishihara H, Kimura T, Kato Y, Tanino M, Nishio M, Obara M, Endo T, Koike T, Tanaka S. DOCK2 regulates cell proliferation through Rac and ERK activation in B cell lymphoma. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2010 Mar 27. [Epub ahead of print]

②Tabu K, Kimura T, Sasai K, Wang L, Bizen N, Nishihara H, Taga T, Tanaka S. Analysis of an alternative human CD133 promoter reveals the implication of

Ras/ERK pathway in tumor stem-like hallmarks. Mol Cancer. 査読有 2010 Feb 19;9(1):39.

③Takiyama A, Wang L, Tanino M, Kimura T, Kawagishi N, Kunieda Y, Katano H, Nakajima N, Hasegawa H, Takagi T, Nishihara H, Sata T, Tanaka S. Sudden death of a patient with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection by acute respiratory distress syndrome. Jpn J Infect Dis. 査読有 2010 Jan;63(1):72-4.

④ Nishihara H, Nakasato M, Sawa H, Murakami H, Yamamoto D, Moriyama K, Kato N, Hashimoto I, Kamada H, Tanaka S. A case of central nervous system lymphomatoid granulomatosis; characteristics of PET imaging and pathological findings. J Neurooncol. 査読有 2009 Jun;93(2):275-8.

⑤ Kimura T, Sakai M, Tabu K, Wang L, Tsunematsu R, Tsuda M, Sawa H, Nagashima K, Nishihara H, Hatakeyama S, Nakayama K, Ladanyi M, Tanaka S, Nakayama KI. Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. Lab Invest. 査読有 2009 Jun;89(6):645-56.

⑥ Watanabe T, Tsuda M, Makino Y, Konstantinou T, Nishihara H, Majima T, Minami A, Feller SM, Tanaka S. Crk adaptor protein-induced phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration. Cell Res. 査読有 2009 May;19(5):638-50.

[学会発表] (計 8 件)

①2009年12月13-15日 (アメリカ、サンディエゴ) AACR Special Conference on Genetics and Biology of Brain Cancers Hiroshi Nishihara, Mitsunobu R. Kano, Hiromi Kanno, Shinya Tanaka Clinicopathological analysis for glioma-specific vascular structures.

②2009年10月1-3日 (横浜) 第68回日本癌学会学術総会; Hiroshi Nishihara, Kazuo Nagashima, Shinya Tanaka; CNS-lymphomatoid granulomatosis; as a primary lesion for CNS-T cell lymphoma

③2009年7月9-11日 (淡路島) 第49回日本リンパ網内系学会総会; 西原広史, 高阪真路、久保田佳奈子、田中伸哉、松野吉

宏; MDS患者のリンパ節に発生した trilineage extramedullary myeloid cell tumor の1例

④2009年7月3日 (東京) 第25回日本DDS学会学術集会 ワークショップDDSとがん組織 (間質、脈管); 西原広史; Pathological analysis for cancer-mesenchymal and vascular structure associated with drug delivery system. (招待講演)

⑤2009年6月6-8日 (香川) 第50回日本神経病理学会学術研究会; 西原広史、村上普美、木村憲一、佐和弘基、鎌田一、田中伸哉; 髄膜腫におけるDOCK180の発現の検討

⑥2009年5月8-9日 (福岡) 第27回日本脳腫瘍病理学会総会; 西原広史、狩野光伸、田中伸哉; 脳腫瘍血管壁の組織病理学的解析: Glomeruloid vesselは肥厚した幼若な Pericyteで構成されている

⑦2009年5月23-24日 (東京) 第26回日本脳腫瘍病理学会総会; 西原広史、長嶋和郎、田中伸哉; Pilomyxoid patternを示す Anaplastic oligoastrocytoma (AOA)の病理学的検討

⑧2009年4月12-16日 (アメリカ、サンディエゴ) AACR (American Society of Cancer Research); Hiroshi Nishihara, Hiroshi Yokouchi, Shinya Tanaka, Lars Eckmann, Paul A. Insel. Cyclic AMP-dependent regulation of colon cancer growth and apoptosis: A key role for COX-2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西原 広史 (NISHIHARA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任准教授
研究者番号: 50322805

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: