

平成 22年 5月 28日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790965

研究課題名 (和文)

SM 浸潤大腸癌治療戦略確立のための新規バイオマーカーの開発

研究課題名 (英文)

Gene expression analyses for predicting lymph node metastasis of T1 colorectal cancer.

研究代表者

奥 喜全 (OKU YOSHIMASA)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：10453185

研究成果の概要 (和文)：

網羅的遺伝子発現解析から同定した大腸癌の悪性化に関与する10の候補遺伝子の遺伝子発現解析を進めることで、Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich COOH-terminal domain 1 (CITED1) が、SM 浸潤大腸癌のリンパ節転移と関連することが示された。これまで、この分子が大腸癌の転移に関連するという報告はなく、CITED1 は新規遺伝子マーカーであるといえる。

研究成果の概要 (英文)：

Prediction of lymph node metastasis before treatment enables individualized treatment of colorectal cancer (CRC), especially in T1 CRC. We have reported that 10 genes were found to correlate with dedifferentiation at the invasion front of colorectal cancer by cDNA microarray analysis (*Clin Cancer Res* 2008; 14:7215-7222). These 10 genes might be clinical markers to predict the lymph node metastasis in CRC. Real-time RT-PCR and immunohistochemical studies showed expression levels of CITED1 were statistically related with lymph node metastasis in T1 CRC. CITED1 expression level may predict lymph node metastasis in T1 CRC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 消化器外科学

キーワード：早期大腸癌 遺伝子診断 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸癌においてリンパ節転移の有無は重要な予後因子である。特に粘膜下層浸潤癌 (SM 癌) のリンパ節転移率は 10%程度であり、内視鏡治療のみを行うか、リンパ節廓清を伴う外科的切除を行うかは浸潤距離や脈管侵襲などの病理因子によって判断されている。これは個々の患者にとって至適治療が行われているとはいえない状況であり、SM 癌のリンパ節転移の有無を予測する分子生物学的マーカーの開発が急務である。

(2) 「癌先進部での癌の脱分化」という大腸癌のリンパ節転移に関与するとされる現象に着目し、網羅的遺伝子発現解析を行い、この現象に関わる 10 個の候補遺伝子を選定した。これらの候補遺伝子は、大腸癌にリンパ節転移をもたらす過程において重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

候補遺伝子のなかから、SM 浸潤大腸癌のリンパ節転移を予測する遺伝子の同定を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

和歌山県立医科大学第2外科にて2003年9月～2004年12月に手術を施行した進行大腸癌 85 症例と、1999年11月～2009年5月に手術を施行した SM 癌 126 症例を対象とした (表 2)。

### (2) サンプルング

進行癌は摘出直後に潰瘍形成の無い表層部を含む腫瘍組織を OCT コンパウンドに包埋し、液体窒素で凍結させ、mRNA 抽出用に  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また免疫化学組織染色のための早期癌を含む全症例は摘出後すみやかに 10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した後に常温で保存した。

### (3) Laser Microdissection

OCT コンパウンドに包埋した進行癌組織を、ライカクリオスタットを用いて  $10\mu\text{m}$  の厚さの薄切切片を作成した。この薄切切片に対し、ライカ LMD を用いて Laser Microdissection (LM) を施行した。LM は潰瘍形成を認めない部位のうち癌表層部から  $1000\mu\text{m}$  以内の部位のみ施行しサンプル採取した。

### (4) t-RNA の抽出・real time RT-PCR

癌組織の LM サンプルから t-RNA を抽出した。Bioanalyser 2100 で t-RNA の質を評価し、cDNA を作製した。real time RT-PCR を行い、10 個の候補遺伝子 mRNA の発現を定量した。

### (5) 免疫染色

パラフィン包埋した癌組織から薄切切片を作成し、脱パラフィン後にクエン酸バッファー内で  $121^{\circ}\text{C}$  30 分間熱処理を行い抗原賦活化した。メタノール処理後に Protein Block を用いてブロッキングし、一次抗体を滴下し  $4^{\circ}\text{C}$  で over night した。TTBS で洗浄後に二次抗体 (Hist Fine) を滴下し室温で 30 分間静置した。TTBS で洗浄後に DAB で発色を行った。

### (6) 統計解析

real time RT-PCR で得られた mRNA 発現量は GAPDH で補正し、正常組織に対する相対的定量を行った。検量線は Human Reference total RNA を用いた。タンパク発現量は Allred 法を用いて定量し、cut off 値は ROC curve により決定した。臨床病理因子は median で 2 群に分けた 2 値変数を用いた。単変量解析 (univariate logistic regression model) および多変量解析 (multiple logistic regression model) を行いリンパ節転移に関する独立因子を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 進行癌 mRNA 発現量とリンパ節転移関連因子

10 候補遺伝子の mRNA 発現量および臨床・病理因子のうちリンパ節転移に関与する因子を検討したところ、単変量解析ではリンパ管侵襲陽性 (p=0.003; odds ratio [OR], 24.889; 95% confidence interval [95% CI], 3.032-204.3) と Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich COOH-terminal domain 1 (CITED1) mRNA 高発現 (p=0.043; OR, 5.562; 95% CI, 1.051-29.42) がリンパ節転移の危険因子であった。多変量解析では CITED1 mRNA 高発現 (p=0.040; OR, 4.514; 95% CI, 1.068-19.07) のみがリンパ節転移の独立した危険因子であった。

##### (2) 進行癌タンパク発現量とリンパ節転移関連因子

免疫組織化学染色を用いて、mRNA 発現量の解析でリンパ節転移の独立因子であった CITED1 蛋白発現量を定量し、臨床病理因子とともにリンパ節転移に関与する因子を検討した。単変量解析ではリンパ管侵襲陽性 (p=0.003; OR, 24.89; 95% CI, 3.032-204.3) と CITED1 タンパク高発現 (p=0.014; OR, 5.587; 95% CI, 1.408-22.22) がリンパ節転移の危険因子であった。多変量解析でもリンパ管侵襲陽性 (p=0.007; OR, 18.90; 95% CI, 2.194-162.9) と CITED1 タンパク高発現 (p=0.035; OR, 5.052; 95% CI, 1.125-22.73) がリンパ節転移の独立した危険因子であった。

##### (3) 早期癌 (SM 癌) タンパク発現量とリンパ節転移関連因子

免疫組織化学染色を用いて CITED1 蛋白発現量を定量し、臨床・病理因子とともに SM 癌のリンパ節転移に関与する因子を検討した

ところ、単変量解析では budding 陽性 (p=0.001; OR, 8.403; 95% CI, 2.331-30.30), リンパ管侵襲陽性 (p=0.006; OR, 3.921; 95% CI, 1.481-10.42), 静脈侵襲陽性 (p=0.025; OR, 3.030, 95% CI, 1.148-8.000), CITED1 タンパク高発現 (p=0.009; OR, 7.752; 95% CI, 1.650-35.71) がリンパ節転移の危険因子であった。多変量解析では CITED1 タンパク高発現 (p=0.023; OR, 13.89; 95% CI, 1.445-142.9) がリンパ節転移の独立した危険因子であった。

CITED1 は TGF- $\beta$  のシグナル伝達において核内での転写活性に寄与している。甲状腺癌や Wilms 腫瘍で CITED1 が高発現していると報告されているが、大腸癌での報告はない。また、癌の悪性度やリンパ節転移との関連性を示した報告はこれまでになく、CITED1 と大腸癌リンパ節転移との関連性は新たな知見である。特に SM 癌での検討において CITED1 高発現はリンパ節転移の危険因子となることから、CITED1 は SM 癌の治療方針を決定する分子マーカーとなる可能性が示唆された。

#### 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)

① Oku Y, Shimoji T, Takifuji K, Hotta T, Yokoyama S, Matsuda K, Higashiguchi T, Tominaga T, Nasu T, Tamura K, Matsuura M, Miyata S, Kato Y, Yamaue H, Miki Y

Identification of the molecular mechanisms for dedifferentiation at the invasion front of colorectal cancer by a gene expression analysis.

*Clin Cancer Res.* 2008;14(22): 7215-22

査読 有

[学会発表] (計 7 件)

①奥 喜全, 瀧藤克也, 堀田 司, 横山省三, 松田健司, 渡辺高士, 橋本忠通, 田村耕一, 家田淳司, 山本直之, 山上裕機 :

Stage II 大腸癌の再発形式の検討

第 71 回日本臨床外科学会 2009.11.2, 京都

②奥 喜全, 瀧藤克也, 堀田 司, 横山省三, 松田健司, 渡辺高士, 那須 亨, 田村耕一, 家田淳司, 山本直之, 山上裕機

腹腔鏡補助下低位前方切除術の有用性

第 64 回日本消化器外科学会 2009.7.17 大阪

③奥 喜全, 瀧藤克也, 堀田 司, 横山省三, 松田健司, 渡辺高士, 那須 亨, 田村耕一, 家田淳司, 山本直之, 山上裕機 :

Stage II 大腸癌の治療戦略

第 71 回大腸癌研究会 2009. 7, 3 大宮

④奥 喜全, 下地 尚, 瀧藤克也, 堀田 司, 横山省三, 松田健司, 東口崇, 富永敏治, 松浦 正明, 宮田 敏, 加藤 洋, 野田哲生, 三木義男, 山上裕機 :

大腸癌先進部脱分化に関する機能ネットワークの構築

第 63 回日本大腸肛門病学会 2008. 10.17, 東京

⑤奥 喜全, 下地 尚, 瀧藤克也, 堀田 司, 横山省三, 松田健司, 東口崇, 富永敏治, 松浦 正明, 宮田 敏, 加藤 洋, 野田哲生, 三木義男, 山上裕機 :

網羅的遺伝子発現解析による大腸癌先進部脱分化規定因子の同定

第 17 回日本癌転移学会 2008. 7.25, 鹿児島

⑥奥 喜全, 瀧藤克也, 堀田 司, 横山省三, 松田健司, 東口 崇, 富永敏治, 那須亨, 田村耕一, 山上裕機

外科的肛門管にかかる超低位悪性腫瘍に対する肛門機能温存術

第 63 回日本消化器外科学会 2008.7.17, 札幌

⑦奥 喜全, 瀧藤克也, 堀田 司, 横山省三, 松田健司, 富永敏治, 渡辺高士, 那須亨, 田村耕一, 家田淳司, 山上裕機 :

リンパ節転移のない MP 癌 (T2-Stage1)

大腸癌の再発危険因子の検討

第 69 回大腸癌研究会 2008. 7, 4 横浜

[その他]  
ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/inwmn/2nd-surgery/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥 喜全 (OKU YOSHIMASA)

和歌山県立医科大学 医学部 学内助教

研究者番号 : 10453185

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :