

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09095

研究課題名(和文) 時計遺伝子を基盤とした直腸癌術前化学療法における治療効果予測と新規治療薬への応用

研究課題名(英文) Prediction of therapeutic effect in preoperative chemotherapy for rectal cancer based on clock genes and its application to novel therapeutic agents

研究代表者

諸橋 聡子 (Morohashi, Satoko)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90569592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：直腸癌術前化学療法症例50例と化学療法前後で、Computed Tomography (CT)ないしMagnetic Resonance Imaging (MRI)で高い縮小率を示す群と低い縮小率を示す群に分けて(23%をカットオフ値とした)、その臨床病理学的因子と比較検討した。大腸癌組織で、大腸癌組織透明化(tissue clearing)の手法を用いて、サイトケラチン(腫瘍細胞を染色する抗体)とCD34(血管を染色する抗体)等を用いて、蛍光多重染色を行い、三次元構造を詳細に観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は、食習慣の変化等により日本人の罹患数が増えている疾患の一つである。術前に化学療法を行い、適切な時期に手術を行うことで、患者のQOLを高く保ち、さらに手術の根治性を上げることが期待される。化学療法効果を予測することは、治療ストラテジーを構築する上で、非常に有用な情報となる。個々の腫瘍の治療効果予測が立てられれば、手術優先か化学療法優先かの選択が適切に決められ、病期進行を制御した状態をなるべく維持し、時期を逸しない根治治療が可能になるものと考えられる。

術前化学療法でより腫瘍縮小効果を認めた症例群における病理組織学因子を解析することにより、化学療法効果良好症例の特徴を理解することができた。

研究成果の概要(英文)： Fifty cases of preoperative chemotherapy for rectal cancer and pre- and post-chemotherapy were divided into a group showing a high reduction rate and a group showing a low reduction rate (23% cut off value) by computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI). A comparison was made with clinicopathological factors.

In order to understand the invasion and progression of colorectal cancer, we used tissue clearing techniques and used cytokeratin (an antibody that stains tumor cells) and CD34 (an antibody that stains blood vessels) to detect fluorescence. Multiple staining was performed to observe the three-dimensional structure in detail.

研究分野：外科病理学

キーワード：直腸癌 時計遺伝子 術前化学療法 治療効果予測

1. 研究開始当初の背景

近年直腸癌治療における術前化学療法 (Neoadjuvant chemotherapy; NAC) が注目されている。その化学療法治療効果予測は、手術時期のタイミングや治療薬選択を最適化し、手術による根治切除と機能性維持 (肛門機能・排尿機能・生殖機能) に寄与する。一方、放射線画像も目覚ましい進化を遂げ、血流動態把握が詳細に可能になり、化学療法治療効果判定を定量的に評価できるモダリティとして開拓されつつある。本研究では、これまでの我々の時計遺伝子 DEC の機能解析 (癌微小環境への役割: 血管新生・癌細胞の上皮間葉転換・癌のアポトーシス・低酸素応答など) の実績を生かし、時計遺伝子機能を基盤とし放射線画像情報を統合した独創的な治療効果予測法の開発・確立および治療薬への応用を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、直腸癌術前化学療法の治療効果予測を時計遺伝子 DEC という斬新な切り口で、臨床検体・三次元組織モデルを用いて検討し、予後との相関を解析することである。

3. 研究の方法

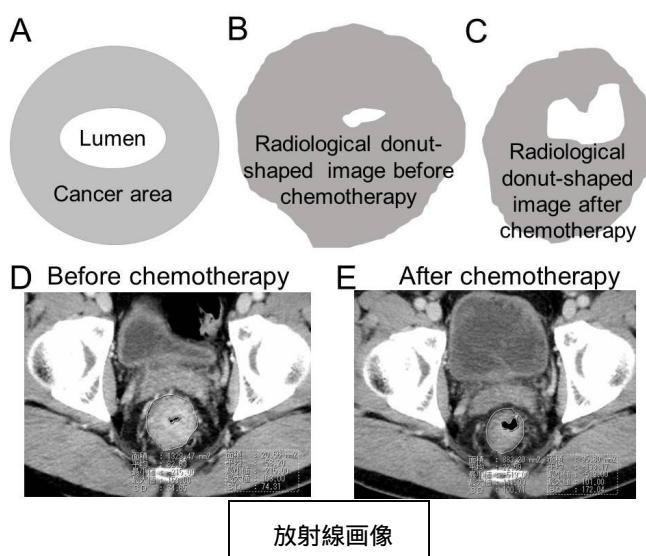
直腸癌術前化学療法症例 50 例を化学療法前後で、Computed Tomography (CT) ないし Magnetic Resonance Imaging (MRI) で高い縮小率を示す群と低い縮小率を示す群に分けて (23% をカットオフ値) その臨床病理学的因子を比較検討した。

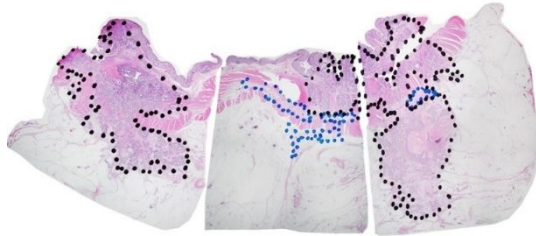
大腸癌の浸潤・進展の解析にあたり、大腸癌の立体的・空間的構造を理解するために、大腸癌 (直腸癌・結腸癌) 外科切除材料で組織透明化 (tissue clearing) を行い、サイトケラチン (腫瘍) と CD34 (血管) と Desmin (平滑筋) による蛍光多重染色を用いて、三次元構造を共焦点顕微鏡にて、詳細に観察した。さらに、実際の病理組織標本 (Hematoxylin-Eosin 染色) で見られる二次元組織の形態と三次元組織 (3D tissue clearing) の形態を比較した。

直腸癌 NAC 後に壁外病変が残存する直腸癌、NAC 抵抗性直腸癌の生物学的特徴を明らかにするために、NAC 後壁外病変消失群 (NAC 奏効群) と NAC 後壁外病変残存群 (NAC 抵抗群) に分類し、両症例の外科切除組織標本を用いて、プロテオーム解析を行った。2 群間の発現タンパク質を確認、パスウェイ解析を施行した。

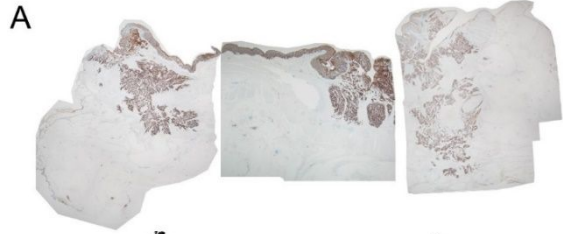
4. 研究成果

直腸癌術前化学療法施行例において、術前化学療法後高い縮小率を示す群では、サイトケラチン AE1/AE3 に染色性を示す腫瘍細胞面積・腫瘍細胞の核分裂数・化学療法後の CT/MRI の面積が低下していた。画像の縮小率と病理組織学的に評価した癌細胞の残存量との相関を明らかにした。





ヘマトキシリンエオジン染色



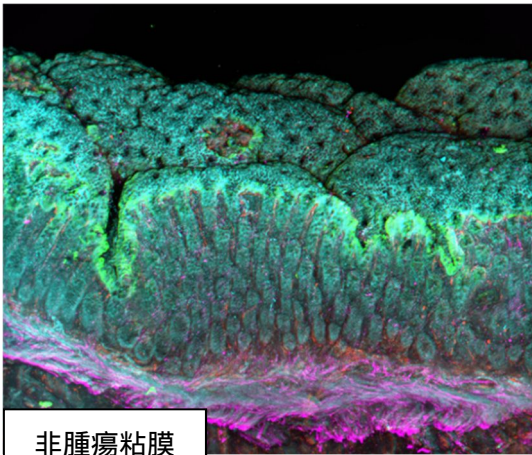
A



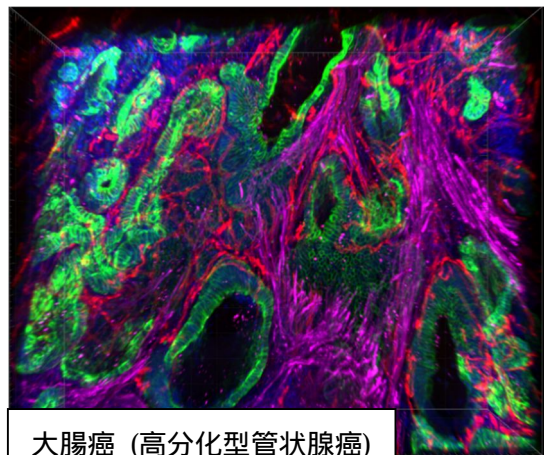
B

腫瘍細胞の binary image

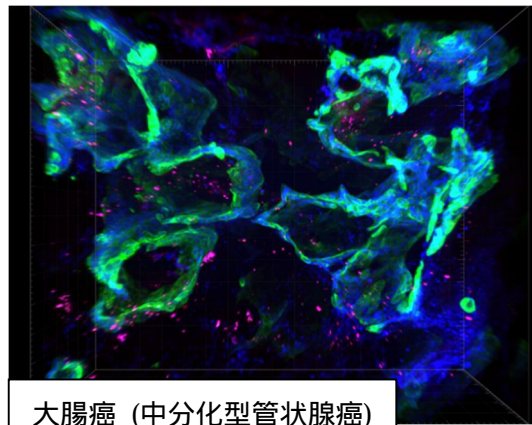
大腸の非腫瘍粘膜と大腸癌組織に対して蛍光染色（血管を CD34、上皮（癌）をサイトケラチン 20、平滑筋を Desmin で染色）して、tissue clearing 法で立体構造を観察した。



非腫瘍粘膜



大腸癌 (高分化型管状腺癌)



大腸癌 (中分化型管状腺癌)

非腫瘍性大腸粘膜と比較して、癌組織では、間質の血管系の増加が確認され、癌細胞と血管が密接に絡み合い、癌細胞が浸潤していることが明らかになった。

癌組織の 3 次元解析により、中分化型腺癌は連続性に管腔構造が複雑に絡み合った構造を呈することが明らかになった。

3 次元画像では、高分化型管状腺癌と中分化型管状腺癌との移行像が確認された。

NAC 抵抗群に特異的な発現変動がみられたタンパク質は、Sulfur metabolism pathway と高い関連性を示した。そのうち Selenium binding protein1 (SELENBP1) に着目して、免疫組織学的染色を施行した。結果、NAC 後切除標本における SELENBP1 の発現低下が NAC 治療組織学的治療効果の低さと段階的に関連していることを明らかにした。また、NAC 前生検組織においても SELENBP1 の免疫組織学的染色を施行し、NAC 前後の SELENBP1 の発現比較を行ったところ、NAC 後直腸癌切除標本と NAC 前生検組織においても同様の発現傾向が確認された。本結果は、SELENBP1 が NAC 抵抗性の指標として診断に応用可能であるだけでなく、sulfur metabolism pathway が新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshioka Haruhiko, Herai Anna, Oikawa Sota, Morohashi Satoko, Hasegawa Yoshie, Horie Kayo, Watanabe Jun	4. 巻 65
2. 論文標題 Fractal Analysis Method for the Complexity of Cell Cluster Staining on Breast FNAB	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Cytologica	6. 最初と最後の頁 4~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000509668	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 Wakiya T, Ishido K, Kimura N, Nagase H, Yoshizawa T, Morohashi S, Fujita H, Kanda T, Tatara Y, Saruwatari Junji, Kijima H, Hakamada K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Eukaryotic initiation factor 2 signaling behind neural invasion linked with lymphatic and vascular invasion in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00727-3	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 Shintaro Goto, Hiroko Seino, Tadashi Yoshizawa, Satoko Morohashi, Keinosuke Ishido, Kenichi Hakamada, Hiroshi Kijima.	4. 巻 21
2. 論文標題 Time density curve of dynamic contrast enhanced computed tomography correlates with histological characteristics of pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12537	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 Goto Shintaro, Nakazawa Atsuko, Yoshizawa Tadashi, Aoki Masahiko, Hirabayashi Takeshi, Seino Hiroko, Morohashi Satoko, Kijima Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Case Report: A Giant Epignathus with a Well-Developed Skeleton of Head and Neck	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/10668969221133739	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 Yoshioka Haruhiko, Shimoda Tsubasa, Oikawa Sota, Morohashi Satoko, Hasegawa Yoshie, Horie Kayo, Watanabe Jun	4. 巻 66
2. 論文標題 Usefulness of Fractal Analysis of Kirsch Edge Images for the Tissue Fragment Inner Structure in Breast FNAB	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Cytologica	6. 最初と最後の頁 149 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000519490	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 Yachi Takafumi, Yoshizawa Tadashi, Kimura Norihisa, Seino Hiroko, Morohashi Satoko, Goto Shintaro, Ishido Keinosuke, Kijima Hiroshi, Hakamada Kenichi	4. 巻 25
2. 論文標題 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts recurrence and histological grade of extrahepatic bile duct cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2023.13711	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 Goto Shintaro, Yoshizawa Tadashi, Ishido Keinosuke, Seino Hiroko, Morohashi Satoko, Ogasawara Hirokazu, Kubota Shunsuke, Ogasawara Kenta, Nakamura Akie, Hakamada Kenichi, Kijima Hiroshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Use of time density curves of dynamic contrast-enhanced computed tomography for determination of the histological therapeutic effects of neoadjuvant chemotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2023.8498	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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