

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591731

研究課題名（和文） 大腸癌肝臓転移制御をめざしたRAS・TGFβ経路活性化の検討

研究課題名（英文） Ras/TGF-beta pathway downstream in liver metastasis of colorectal cancer

研究代表者

渡邊 昌彦 (WATANABE MASAHIKO)

北里大学・医学部・

研究者番号：80146604

研究成果の概要（和文）：

大腸癌の進展において最も重要と考えられる K-ras 変異の下流変化のうち機能的に重要な分子機序を同定し、根治不能な大腸癌における新規治療法の確立、根治可能な大腸癌における補助療法の開発を目指した研究を企画した。具体的には K-ras 変異と MAL-I レクチンの相関をレクチンアレイで見出したポイントが研究の開始点にあった。MAL-I は alpha 2,3 シアル酸の結合した糖鎖構造であり、大腸癌や胃癌において悪性度の高い癌の特徴であることが報告されている。したがって、本機序に関わる遺伝子の同定およびその酵素活性の抑制は大腸癌の治療戦略に極めて重要である可能性が示唆される。われわれは、2,3 シアル酸認識糖鎖に構造に影響を与えることで知られる 2つの糖鎖合成酵素 ST6GalNac6, DTDST の発現に注目して研究を進めた。その結果、両酵素の発現が K-ras 変異の状態によって変化することは判明したが、その両者が 2,3 シアル酸を認識する MAL-I 増加に一致するものではないことが判明した。また、これらの遺伝子変化は細胞密度によって大きく影響されるものではないことも判明し、K-ras 変異を有する癌細胞は、細胞密度および細胞の状態により多種多様な遺伝子変化を有することが明らかになった。この問題を解決すべく、われわれは K-ras 変異によるレクチンシグナル変化が細胞、培養密度の条件に関わらないことを示し、その両者の条件において説明しうる等鎖遺伝子を包括的に検討すべく研究を展開中である。K-ras 変異株の TGF-beta とのかかわりについて新たな知見を得たいと当初考えていたが、K-ras 変異時代に複雑性がみられまずはこちらの解明が重要だと考え後半のテーマは進めていない。一方、K-ras 変異についての臨床病理学的解析は順調に進行し Dukes C における予後因子として報告できた。面白いことにその臨床的意義は若年結腸癌に限った場合に特に強く、MSI 陽性癌との関係が今後特に注目されると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

(Background) In colorectal cancer (CRC), K-ras mutation is found in nearly 40% of the patients, and it is of prognostic significance (Onozato W et al, J Surg Oncol, 2010). Moreover, its knockdown in CRC cell lines with mutated K-ras gene results in robust reduction of ability of cell proliferation and anchorage independent growth (Shirasawa S, Science, 1993), both of which reflect metastatic ability. On the other hand, robust alterations of glycan structures have been reported in CRC promotion steps, accompanied by remarkable phenotypic changes, however there is no report that mentions the relationship of K-ras mutation and glycan change. (Materials and Methods) We examined glycan change of CRC cell lines (DLD1 and HCT116) somatically knocked out for K-ras gene by lectin array including 41 lectins to elucidate whether K-ras mutation-induced glycan changes play a critical role in CRC promotion. (Result) (1) In DLD1, we compared DLD1

wild type genotype cells (DLD1, DKS-5) with those that were knocked out for mutated K-ras gene (DKO-3, DKS-8), and the signals of MAL, MPA, UEA-I, and TJA-II were remarkably decreased in the knockdown cells. (2) In HCT116, we compared HCT116 wild type genotypic cells (HCT116, Hk2-10) with those that were knocked out for the mutated K-ras gene (Hke-3), and both MAL and MPA were remarkably declined. (3) In both cell lines, expression changes of glycans which can bind with MAL and MPA were consistent with the results of the lectin blotting, and both lectin signals were confirmed to be commonly altered by removing the mutated K-ras gene. (Conclusion) Mutated K-ras may be involved in critical phenotype change of CRC, accompanied by abnormal sialic acid recognition.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：大腸癌・肝転移

#### 1. 研究開始当初の背景

MAL-I は alpha 2,3 シアル酸の結合した糖鎖構造であり、大腸癌や胃癌において悪性度の高い癌の特徴であることが報告されている。具体的には K-ras 変異と MAL-I レクチンの相関をレクチンアレイで見出したポイントが研究の開始点にあった。

#### 2. 研究の目的

大腸癌の進展において最も重要と考えられる K-ras 変異の下流変化のうち機能的に重要な分子機序を同定し、根治不能な大腸癌における新規治療法の確立、根治可能な大腸癌における補助療法の開発を目指した研究を企画した。

#### 3. 研究の方法

われわれは、2,3 シアル酸認識糖鎖に構造に影響を与えることで知られる2つの糖鎖合成酵素 ST6GalNac6, DTDST の発現に注目して研究を進めた。

#### 4. 研究成果

その結果、両酵素の発現が K-ras 変異の状態によって変化することは判明したが、その両者が 2,3, シアル酸を認識する MAL-I 増加に一致するものではないことが判明した。また、これらの遺伝子変化は細胞密度によって大きく影響されるものではないことも判明し、K-ras 変異を有する癌細胞は、細胞密度および細胞の状態により多種多様な遺伝子変化を有することが明らかになった。この問題を解決すべく、われわれは K-ras 変異によるレクチンシグナル変化が細胞、培養密度の条件に関わらないことを示し、その両者の条件において説明しうる等鎖遺伝子を包括的に検討すべく研究を展開中である。K-ras 変異株の TGF-beta とのかかわりについて新たな知見を得たいと当初考えていたが、K-ras 変異時代に複雑性がみられまずはこちらの解明が重要だと考え後半のテーマは進めていない。一方、K-ras 変異についての臨床病理学的解析は順調に進行し Dukes C における予後因子として報告できた。面白い

ことにその臨床的意義は若年結腸癌に限った場合に特に強く、MSI 陽性癌との関係が今後特に注目されると考えられた。

#### 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 4 件)

1. Onozato W, Yamashita K, Yamashita K, Kuba T, Katoh H, Nakamura T, Sato T, Ihara A, Okayasu I, Watanabe M.: Genetic alterations of K-ras may reflect prognosis in stage III colon cancer patients below 60 years of age. J Surg Oncol, 103(1):25-33, 2011. 01
2. Ozawa H, Iwatsuki M, Mimori K, Sato T, Johansson F, Toh H, Watanabe M., Mori M.: FANCD2 mRNA overexpression is a bona fide indicator of lymph node metastasis in human colorectal cancer. Ann Surg oncol, 17(9):2341-8, 2010. 09
3. Kikuchi M, Mikami T, Sato T, Tokuyama W, Araki K, Watanabe M., Saigenji K, Okayasu I.: High Ki67, Bax, and thymidylate synthase expression well correlates with response to chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancers: proposal of a logistic model for prediction. British Journal of cancer, 101(1):116-123, 2009. 07
4. Katoh H, Yamashita K, Sato T, Ozawa H, Nakamura T, Watanabe M.: Prognostic significance of peritoneal tumour cells identified at surgery for colorectal cancer. Br J Surg, 96(7):769-777, 2009. 07

[学会発表] (計 10 件)

1. 中村隆俊, 三浦啓寿, 筒井敦子, 小倉直人, 内藤正規, 池田篤, 佐藤武郎, 渡邊昌彦: 高齢者腹腔鏡下結腸癌手術の腫瘍学的アウトカムの検討(64歳以下と75歳以上の比較). 第49回日本癌治療学

会学術集会, 2011年10月27日, 名古屋 (日本癌治療学会誌, 46巻2号:565頁, 2011.09発行)

2. 中村隆俊, 小野里航, 佐藤武郎, 池田篤, 内藤正規, 小倉直人, 大木暁, 渡邊昌彦: 高齢者腹腔鏡下結腸癌手術の腫瘍学的アウトカムの検討(64歳以下と75歳以上の比較). 第53回日本消化器病学会大会, 2011年10月20日, 福岡 (日本消化器病学会雑誌, 108巻臨時増刊号: 872頁, 2011.09発行)
3. 内藤正規, 佐藤武郎, 池田篤, 小野里航, 小倉直人, 中村隆俊, 渡邊昌彦: 大腸癌腹膜転移症例に対する治療アルゴリズムの妥当性の検討: 第66回日本消化器外科学会総会, 2011年7月13日, 名古屋 (第66回日本消化器外科学会抄録集: 351頁, 2011.07発行)
4. 内藤正規, 佐藤武郎, 池田篤, 小倉直人, 小野里航, 大木暁, 中村隆俊, 渡邊昌彦: 当院における大腸癌腹膜転移症例に対する至適な治療方針の検討. 第48回日本癌治療学会学術集会, 2010年10月28日, 京都 (日本癌治療学会誌, 45巻1号118頁, 2010発行)
5. 小野里航, 山下継史, 中村俊隆, 大木暁, 鎌田弘樹, 小倉直人, 内藤正規, 池田篤, 小澤平太, 佐藤武郎, 井原厚, 渡邊昌彦: 若年結腸癌におけるK-ras遺伝子変異の意義. 第73回大腸癌研究会, 2010年7月2日, 鹿児島 (日本大腸肛門病学会雑誌, 64巻4号: 282頁, 2011発行)
6. 内藤正規, 佐藤武郎, 小澤平太, 池田篤, 中村隆俊, 小野里航, 井原厚, 渡邊昌彦: 当院における大腸癌腹膜転移に対する治療指針の検討: 第110回日本外科学会定期学術集会, 2010年4月8日, 名古屋 (日本外科学会雑誌 111巻臨増2号: 500頁, 2010.03発行)
7. 内藤正規, 佐藤武郎, 小澤平太, 中村隆俊, 池田篤, 小野里航, 井原厚, 渡邊昌彦: 結腸癌における転移陽性リンパ節個数と予後の検討: 第72回大腸癌研

究会, 2010年1月15日, 久留米(日本大腸肛門病学会雑誌, 63巻7号:450頁, 2010.07発行)

8. 中村隆俊, 小野里航, 井原厚, 佐藤武郎, 小澤平太, 旗手和彦, 内藤正規, 渡邊昌彦: 大腸 sm, mp 癌のリンパ節転移の危険因子および再発、予後の検討: 第 64 回日本大腸肛門病学会学術集会, 2009 年 11 月 6 日, 福岡(日本大腸肛門病学会雑誌, 62 巻 5 号: 358 頁, 2009.05 発行)
9. 内藤正規, 佐藤武郎, 旗手和彦, 小澤平太, 小野里航, 中村隆俊, 井原厚, 渡邊昌彦: Stage II 大腸癌の再発危険因子の検討. 第 71 回大腸癌研究会, 2009 年 7 月 7 日, 埼玉(日本大腸肛門病学会雑誌, 63 巻 5 号: 319 頁, 2010 発行)
10. 小野里航, 山下継史, 中村隆俊, 大木暁, 加藤弘, 内藤正規, 旗手和彦, 小澤平太, 佐藤武郎, 井原厚, 渡邊昌彦: 大腸癌における K-ras 遺伝子変異と活性型 EGFR(pEGFR)の予後との関連. 第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009 年 4 月 2 日, 福岡(日本外科学会雑誌, 110 巻臨増 2 号: 583 頁, 2009.02 発行)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 昌彦 (WATANABE MASAHIKO)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 80146604