様式Ｃ－１９

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 4 月 20 日現在

機関番号： 37104
研究種目： 基盤研究（C）
研究期間：2009 ～ 2011
課題番号： 21591740
研究課題名（和文） ヒト大腸癌の再発・転移における Claudin-1 の機能解析と治療戦略
研究課題名（英文） The functional analysis and treatment strategy of claudin-1 in a recurrence and metastasis of human colorectal cancer

研究代表者
衣笠 哲史 （KINUGASA TETSUSHI）
久留米大学・医学部 ・ 講師
研究者番号： 90279266

研究成果の概要（和文）：
Claudin（以下 CL）-1 の発現と大腸癌術後の再発や転移との関連性や、潰瘍性大腸炎（以下 UC）に合併した大腸癌における関与について手術標本を用いて検討した。Stage II and III 直腸癌手術症例 306 例の検討では CL-1 の発現低下は Stage II and III 直腸癌の再発や予後不良因子となりえると考えられた。同様に、癌合併した UC 症例の切除標本を用いて検討したところ、明らかにその発現は増強しびまん性に発現していた。CL-1 は UC の病態や発癌に関与している可能性が示唆された。
研究成果の概要（英文）：
To investigate the potential involvement of claudin-1(CL-1) in the tumorigenesis of rectal cancer by analyzing the correlation between CL-1 expression, clinicopathological factors and prognosis. Rectal cancer tissue specimens from 306 patients were evaluated using immunohistochemical analysis for expression of CL-1 and correlated with clinicopathological factors. Loss of claudin-1 expression is a strong predictor of disease recurrence and poor patient survival in stage II and III rectal cancer.
The possible involvement of CL-1 was investigated in the tumorigenesis of UC-associated CRC. The immunostaining pattern of the high-grade dysplasia and UC-associated CRC for CL-1 showed much stronger and more diffuse staining in comparison to the normal or UC colonic mucosa. CL-1 plays a pivotal role in the regulation of cellular morphology and behavior in UC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学
科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・ 小腸・大腸肛門外科学
キーワード：
①大腸癌再発・転移 ②Claudin-1 ③機能解析 ④大腸癌治療戦略

１．研究開始当初の背景

申請者は細胞間接着の一つである Tight Junction（以下 TJ）の特異的蛋白質 Claudin (以下 CL)-1 の発現に関して、正常大腸粘膜に比べ大腸癌組織での発現が著明あることを示すとともに、その発現が大腸癌病変の深達度に関連性があることを明らかにし、ヒト大腸癌の病態に CL-1 の発現が深くかかわってい

ることを報告してきた。

CL は 1998 年に TJ の新規膜タンパク質として、まず CL-１および CL-２が同定され 、これまでに 26 種の遺伝子が CL-family として同定されている。最近では CL-family の発現と tumorigenesis との関連性が注目されている。

一方近年、日本では主要死因別死亡数の年次推移をみると悪性新生物による死亡率が第１位となり、年齢調整死亡率で大腸癌は男性で第３位、女性で第１位と著明に増加してきている。その死亡の直接的原因は大腸癌病変そのものより、術後のリンパ節転移・肝転移・肺転移および局所再発などによるものと考えられ、これらを早期に把握し治療できれば患者の生存率改善が期待できる。

そこで今回我々は、「CL-1 と大腸癌術後の転移や局所再発などの関連性」や「CL-1 が強発現した大腸癌細胞が機能的にどのような変化をきたすか」を研究の目的とした。

CL-1 に関してその発現と転移・再発に関する基礎的研究にまだいくつか未解明のことが残されており、また臨床応用への展開に関しても検討することが多い。

２．研究の目的

本研究は細胞間接着の一つである TJ 特異的蛋白質である CL-1 の発現と大腸癌術後の再発や転移との関連性や、大腸癌細胞株における CL-1 の機能的な役割など未だ解明されていない問題を解決し、大腸癌術後の患者における治療や生存率改善など臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

３．研究の方法

１）大腸癌患者からの同意を得る。
標本およびの検査・病理組織学的所見の把握

事前に患者本人に本研究の内容を十分に説明し、賛同していただいた方より同意書をいただいた。その上で摘出標本の確認と検査・病理組織学所見を正確に把握するように必要な情報を収集した。また、予後も今回の研究に関連するために予後調査の準備を行った。

２）大腸癌摘出標本における CL-1 発現と病理組織学的所見との関連性の検討

当教室で手術が施行された大腸癌手術症例から、最近 10 年間の手術症例から進行度（病期）などを参考に症例を選ぶ。各症例の大腸癌組織を CL-1 抗体で免疫染色を行い、その発現程度と局在を確認し、病理組織学的所見と照らし合わせ重要な要因の解析を行った。同時にパラフィン切片から蛋白質の抽出を試み、蛋白質レベルでの CL-1 発現をウエスタンブロット法にて確認することも試みた。これらの結果をふまえ、大腸癌における CL-1 発現を進行度別に比較検討し、それらの蛋白質発現が患者の症状や臨床病理学的因子など大腸癌の病態とどのように関連するのかを統計学的手法を用いて解析した。

３）血清中 CEA 濃度と CL-1 発現の比較検討

大腸癌患者の標本での CL-1 発現と大腸癌患者の術前血清中 CEA 値との相関関係についてさらに検討を行う。以前、申請者の報告では相関関係は認められなかったので、CL-1 が新しい腫瘍マーカーとなりえるかどうか検討した。

４）局所再発・転移（リンパ節、肝、肺など）した大腸癌原発巣と CL-1 発現との関連性の検討

上記症例より再発・転移した症例とない症例に分け、大腸癌原発巣における CL-1 発現との関連性を解析した。

５）再発・転移の機序における CL-1 の果たす役割（機能的）の検討

大腸癌患者で再発・転移した症例の再発・転移巣における CL-1 発現との関連性を解析した。また、転移や再発に関与している他の蛋白質など(EGFR,VEGF, VEGFR, MIB-１など)の発現も、各々の抗体を用いて比較検討を行った。

６） 新たな大腸の病態診断および治療法などへの臨床応用

上記 1)～5)の結果から、大腸癌術後の患者における治療や生存率改善など臨床応用へと展開するための研究基盤を検討した。CL-1 発現が大腸癌の病態、特に術後の再発・

転移にどのように関連しているかを解析し、病態把握や予後における独立した指標になるかも検討した。

４．研究成果

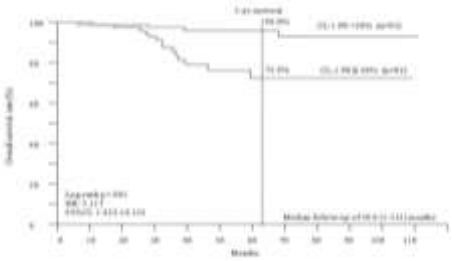
CL-1 の発現と大腸癌術後の再発や転移との関連性を検討し、それに基づく論文発表および国際学会発表（アメリカ消化器病学会(AGA) ： 2011 年 5 月 Chicago を含め)を行い報告した。

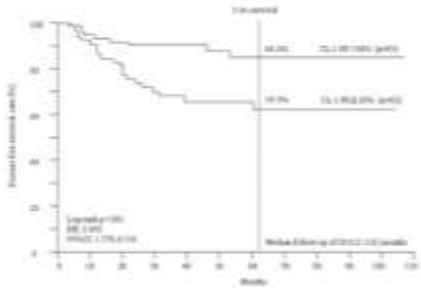
①直腸癌組織における CL-1 発現の減少は再発や予後不良因子となりえる

Decreased Expression of Claudin-1 in Rectal Cancer: A Factor for Recurrence and Poor Prognosis /

Yoshida T., Kinugasa T., et.al. Anticancer Res., 2011, 31: 2517-2526. :

Stage II and III 直腸癌手術症例 306 例を用いて、CL-1 の発現と臨床病理学的因子との関連性を検討した。ROC 曲線にて CL-1 発現の cut off 値を算出し、CL-1 発現が少ない症例は有意に予後不良で、低分化症例が多く神経周囲侵襲を認める症例が多かった。





CEA を含めその他の臨床病理学的因子との関連性は認められなかった。

②潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌では、CL-1 の発現は増強している

Increased Claudin-1 Protein Expression Contributes to Tumorigenesis in Ulcerative Colitic-associated Colorectal Cancer / Kinugasa T. et.al., Anticancer Res., 2010, 30: 3181-3186. :

潰瘍性大腸炎の診断にて大腸全摘術をうけた 39 症例のうち大腸癌合併 6 例の癌合併病変の CL-1 発現を検討した。癌組織では正常粘膜に比べ明らかにその発現は増強し、かつ、β-catenin の発現も癌病変の細胞質や核に強く染色を認めた。CL-1 は潰瘍性大腸炎の病態や形態に根本的な部分で関与し、その病変が癌化する過程での早い時期に関与してい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 33 件）

1) 下部直腸癌の治療　括約筋切除による肛門温存手術 / 赤木由人、白水和雄、衣笠哲史 外科、2009 71(2)：157-162

2) 直腸がん / 衣笠哲史、赤木由人、白水和雄　消化器外科 NURSING:、2009 春季増刊号 96 – 102 メディカ出版

3) 結腸右半切除術　開腹手術 / 石橋生哉、赤木由人、衣笠哲史、牛島正貴、白水和雄　手術、2009　63(6): 771 – 776

4) 狭窄を伴う下部大腸癌 / 石橋生哉、衣笠哲史、赤木由人、白水和雄　－　栄養－評価と治療　(2009、26(1)： 43 – 46)

5) 直腸癌－診断と治療法－ / 衣笠哲史、白水和雄、赤木由人　－　消化器外科

(2009、32 (4)：919-924)

6) 括約筋切除を伴う肛門温存手術（開腹）の術後成績－遠隔成績と QOL－ /

赤木由人、白水和雄、衣笠哲史、石橋生哉、

白土一太郎 – 消化器外科（2009、32(7) 1187-1194）

7) 肛門扁平上皮癌 / 赤木由人、白水和雄、衣笠哲史、石橋生哉－ 別冊日本臨床(2009、12：746 – 748)

8) 回腸瘻（人工肛門）造設術の縫合 / 衣笠哲史、赤木由人、白土一太郎、吉田武史、龍泰彦、白水和雄 － 臨床外科(2009、64(11) 213-216)

9) ISR・ESR 後の縫合（経肛門的結腸－肛門吻合術）/ 衣笠哲史、赤木由人、白土一太郎、龍 泰彦、吉田武史、白水和雄 － 臨床外科(2009、64(11) 259-261)

10) Claudin-1 Protein is a Major Factor Involved in the Tumorigenesis of Colorectal Cancer. Huo Q., Kinugasa T., Wang L., Huang J., Zhao J., Shibaguchi H., Kuroki Mo., Tanaka T., Yamashita Y., Nabeshima K., Iwasaki H. and Kuroki Ma. Anticancer Res., 2009, 29: 851-858.

11) 直腸癌手術における肛門温存 (4)肛門温存の適応－適応拡大の立場から/ 衣笠哲史、赤木由人、石橋生哉、白水和雄－臨床消化器内科(2010、25(1) 43-48)

12) 直腸癌における外科的切除断端の臨床的有用性について／ 衣笠哲史、赤木由人、白水和雄 大腸疾患 NOW:、2010 特別号 202 – 211. 日本メディカルセンター

13) 静脈・経腸栄養－基礎・臨床研究のアップデート－ XI. 在宅栄養治療 癌患者での在宅栄養 ／ 石橋生哉、赤木由人、牛島正貴、衣笠哲史、白水和雄 日本臨床、2010 68(増刊号 3): 683 – 686

14) Stage II 大腸癌の再発危険因子/ 白土一太郎、赤木由人,室谷健太、吉田武史、龍泰彦、牛嶋正貴、石橋生哉、衣笠哲史、白水和雄－臨床と研究 2010、87(2) 87-90

15)外科当直医必携：人工肛門造設術/ 衣笠哲史、赤木由人、白水和雄－消化器外科、2010、33 831-832

16) 内科医に必要な外科治療の知識：直腸癌の外科治療 /衣笠哲史、赤木由人、白水和雄－大腸疾患診療の Strategy、2010、389-397 日本メディカルセンター

17) 超低位直腸癌に対する内・外括約筋切除を伴う肛門温存術 / 赤木由人, 龍 泰彦、白土一太郎、吉田武史、衣笠哲史、石橋生哉、白水和雄－臨床外科 2010、65(5) 634-640

18) 消化管ストーマの造設と周術期管理 / 赤木由人, 海田真知子、平川道子、衣笠哲史、白水和雄－外科治療 2010、102(6) 903-908

19) Challenges in Staging Systems for Colorectal Cancer: Clinical Significance of Metastatic Lymph Node Number in Colorectal Cancer and Mesorectal Extension in Rectal cancer / Akagi Y., Fukushima T., Mizobe T., Shiratsuchi I., Ryu Y., Yoshida T., Ishibashi N., Kinugasa, T., and Shirouzu K. - Digestion (2010, 82 : 192-197)

20) 潰瘍性大腸炎の手術症例の解析－樹形モデルによる癌合併危険因子の検討／衣笠哲史、赤木由人、室谷健太、牛島正貴、白土一太郎、吉田武史、龍 泰彦、白水和雄－日本大腸肛門病学会雑誌 2010、63(7)：407-414

21) Increased Claudin-1 Protein Expression Contributes to Tumorigenesis in Ulcerative Colitic-associated Colorectal Cancer / Kinugasa T. Akagi Y., Yoshida T., Ryu Y., Shiratsuchi I., Ishibashi N. and Shirouzu K. Anticancer Res., 2010, 30: 3181-3186.

22) 外科医のための大腸癌の診断と治療：開腹手術 括約筋切除による肛門温存手術／赤木由人, 白水和雄、衣笠哲史、石橋生哉、田中克明、白土一太郎、龍 泰彦、吉田武史、五反田幸人、弓削浩太郎－臨床外科 2010、65(11) 256-263

23) 必読　セカンドオピニオン：結腸癌／衣笠哲史、赤木由人,石橋生哉、白水和雄－　外科　2010、72(12) 1347- 1350

24) 手術 VS 非手術－最新のエビデンス:1. 消化器疾患 g)直腸癌／衣笠哲史、赤木由人,石橋生哉、白水和雄－外科　2010、72(13) 1502- 1507

25) Decreased Expression of Claudin-1 in Rectal Cancer: A Factor for Recurrence and Poor Prognosis / Yoshida T., Kinugasa T., Akagi Y.,Kawahara A.,　Romeo K., Shiratsuchi I., Ryu Y., Gotanda Y.. and Shirouzu K.　Anticancer Res., 2011, 31: 2517-2526.

26) 手術偶発症を減らす手技の工夫：低位前方切除術時の偶発症と防止／赤木由人,衣笠哲史、石橋生哉、田中克明、白土一太郎、白水和雄－手術　2010、64(11) 1619-1626

27) 消化管疾患：痔核、裂肛、肛門周囲膿瘍、痔瘻、粘膜脱症候群／衣笠哲史－今日の治療指針私はこう治療している　2011、458- 489 医学書院

28) 大腸癌　－最近の研究の動向－　V. 大腸癌治療における予後因子解析の意義：概論／　衣笠哲史、白水和雄、赤木由人,石橋生哉－　日本臨床　2011、69(3) 181- 184

29) アトラスで学ぶ達人の手術：直腸・肛門の手術　内肛門括約筋切除術(ISR) / 衣笠哲史、白水和雄－　消化器外科、2011、34 863-868

30) Expression of IGF-1 and IGF-1R and Their Relation to Clinicopathological Factors in Colorectal Cancer / Shiratsuchi I., Akagi Y., Kawahara A., Kinugasa T., Romeo K., Yoshida T., Ryu Y., Gotannda Y., Kage M. and Shirouzu K.. Anticancer Res., 2011, 31: 2541-2546.

31) Relationship between Ulcerative Colitis Patients Treated with Leukocytapheresis and Ulcerative Colitis-associated Colorectal Cancer / Kinugasa T.　Akagi Y., Murotani K., Romeo K., Yoshida T., Ryu Y., Shiratsuchi I. and Shirouzu K. Anticancer Res., 2011, 31: 2547-2552.

32) 肛門温存下部直腸癌手術 intersphincteric resection (ISR)　/衣笠哲史、白水和雄、赤木由人、白土一太郎、龍康彦、五反田幸－手術　2011、65(9) 1267-1271

33) Clinicopathological study on poorly differentiated adenocarcinoma of the colon / Yoshida T. Akagi Y., Kinugasa T., Kawahara A., Shiratsuchi I., Ryu Y., Gotanda Y.. and Shirouzu K.　Kurume Medical Journal 2011, 2011, 58: 41-46

〔学会発表〕（計 15 件）

1) Oncologic and functional outcomes of intersphincteric resection with or without combined resection of external sphincter based on histological theory.　Kazuo Shirouzu, Yoshito Akagi, Tetsushi Kinugasa, Yutaka Ogata Digestive Disease Week (AGA) 2011（Chicago, USA, May, 2011）

2) Increased Expression of Claudin-1 Contributes to Tumorigenesis in Ulcerative Colitis-associated Colorectal Cancer.　Tetsushi Kinugasa, Yoshito Akagi, Takefumi Yoshida, Kazuo Shirouzu Digestive Disease Week (AGA) 2011（Chicago, USA, May, 2011）

3) The Expression of Claudin-1 is an Effective Indicator of Recurrence and Prognosis in Stage II and III Rectal Cancer. Takefumi Yoshida, Tetsushi Kinugasa, Kazuo Shirouzu, Yoshito Akagi　Digestive Disease Week (AGA) 2011（Chicago, USA, May, 2011）

4) Examination of endocrine cell carcinoma of colon and recfum: recent experience in a single institution　Y.Gotanda, Y.Akagi, T. Kinugasa, Y. Ryu, K. Tanaka, K. Shirouzu INTERNATIONAL SURGICAL WEEK (ISW2011) (Yokohama, Japan, Aug, 2011)

5) The actual situation of lateral lymph node

involvement in rectal cancer. Y. Akagi, T. Kinugasa, I. Shiratuchi, T. Yoshida, Y. Ryu, Y. Gotanda, K.Tanaka, K. Shirouzu INTERNATIONAL SURGICAL WEEK (ISW2011) (Yokohama, Japan, Aug, 2011)

6) Pathological study warrants intersphincteric resection. Tetsushi Kinugasa, Kazuo Shirouzu XIIth National Conference of Colorectal surgery （Valna, Bulgaria, Sep, 2011）

7) Surgical, Oncological and Functional Outcomes from Intersphincteric Resection with or without Combined Resection of the External Sphincter: As compared with those of Abdominoperineal Resection. Kazuo Shirouzu, Tetsushi Kinugasa XIIth National Conference of Colorectal surgery （Valna, Bulgaria, Sep, 2011）

8) 下部直腸癌 pSM 癌に対する治療方針／衣笠哲史、赤木由人、牛島正貴、石橋生哉、白水和雄― 第109回日本外科学会定期学術集会（2009 年 4 月 福岡）

9) 当科における直腸肛門癌に対する ISR の適応と成績／ 衣笠哲史、白水和雄、赤木由人、牛島正貴、白土一太郎、石橋生哉、緒方裕― 第 64 回日本消化器外科学総会（2009 年 7 月 大阪）

10) 潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌における claudin-1 発現の意義（口演）／衣笠哲史、赤木由人、吉田武史、白土一太郎、龍 泰彦、白水和雄 ―第 13 回バイオ治療法研究会（2009 年 12 月 高松）

11) 直腸癌における claudin-1 発現と臨床病理学的検討（口演）／吉田武史、衣笠哲史、赤木由人、白土一太郎、龍 泰彦、河原明彦、安部秀幸、室谷健太、白水和雄 ―第 13 回バイオ治療法研究会（2009 年 12 月 高松）

12) 直腸癌における側方リンパ節郭清の意義 -教室 30 年の経験から-／衣笠哲史、赤木由人、緒方 裕、磯本浩晴、白水和雄 ―第 110 回日本外科学会定期学術集会（2010 年 4 月 名古屋）

13) 潰瘍性大腸炎における癌合併症例の解析とサーベイランス／衣笠哲史、赤木由人、吉田武史、龍 泰彦、白土一太郎、石橋生哉、白水和雄― 第 8 回日本消化器外科学会大会（2010 年 10 月 横浜）

14) 潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌に claudin-1 発現は関与しているか？／衣笠哲史、赤木由人、吉田武史、五反田幸人、龍 泰彦、白土一太郎、石橋生哉、田中克明、白水和雄 第 111 回日本外科学会定期学術集会（2011 年 5 月 紙上開催）

15) 直腸癌における Claudin-1 発現と臨床病理学的検討／吉田武史、衣笠哲史、赤木由人、白土一太郎、龍 泰彦、五反田幸人、弓削浩太郎、白水和雄 第 66 回日本消化器外科学会総会（2011 年 7 月 名古屋）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
衣笠 哲史（KINUGASA TETSUSHI）
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：90279266

(2)研究分担者
なし （ ）

研究者番号：

(3)連携研究者
なし （ ）

研究者番号：