

## 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 9月28日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791305

研究課題名（和文） 腺管分離法とマイクロアレイを用いた大腸癌浸潤部・簇出での浸潤能の  
解明研究課題名（英文） Analysis of the invasive capacity at the invasive front of colon  
cancer, using crypt isolation technique and microarray

研究代表者

小林 敬明 (KOBAYASHI TAKAAKI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：10439169

研究成果の概要（和文）：

癌の浸潤能を解明するため、癌先進部特異的な変化を来す遺伝子のスクリーニングを行った。大腸癌手術20症例から、癌の先進部と中央部の癌細胞の採取を行った。採取方法として腺管分離法を試みたが、正確に分離・回収することは困難であった。このためマイクロダイゼクション法を用いて細胞回収を行い、マイクロアレイ解析を行い、先進部特異的な遺伝子発現を呈する遺伝子群を抽出した。t検定を用いた場合、先進部で発現が亢進する遺伝子群は5遺伝子、低下する遺伝子は1遺伝子であり、クラスター解析を行った場合は、先進部で発現が亢進する遺伝子群は24遺伝子、低下する遺伝子群は29遺伝子であった。

また近年、癌先進部において低分化傾向を呈する症例が予後不良である事が報告されている。上記症例中、先進部が低分化傾向を呈する11症例において同上の解析を行った結果、t検定を用いた場合、先進部で発現が亢進する遺伝子群は4遺伝子、低下する遺伝子は6遺伝子であった。クラスター解析を行った場合は、先進部で発現が亢進する遺伝子群は13遺伝子、低下する遺伝子群は18遺伝子であった。

今回の検討結果では、以前から報告のあったタンパク分解や細胞外基質以外にも多くの分子が癌の浸潤や先進部の低分化傾向に関与する可能性が示唆された。現在、RT-PCRによる発現確認を行っている。

研究成果の概要（英文）：

To analyze the invasive capacity of cancer cells, we screened the genes whose expression specifically changes at the invasive front. We harvested the cancer cells at the invasive front and the center of the tumor from 20 surgically resected samples. Though we attempted the crypt isolation technique at first, it was very difficult to isolate and harvest cancer cells from each part correctly. So we harvested cancer cells by laser micro-dissection technique, conducted microarray analysis, and identified the genes whose expression changed specifically at the invasive front. By Student-t test, we picked up five genes whose signals were up-regulated at the invasive front, and one gene whose signal was down-regulated. By cluster analysis, twenty-four genes were up-regulated, and twenty-nine genes were down-regulated. Moreover, some recent reports revealed that the presence of poorly differentiated clusters at the invasive front was correlated with poor prognosis.

When examined the eleven cases with this histological feature, we could elucidate four up-regulated and six down-regulated genes by Student-t test.

By cluster analysis, thirteen up-regulated and eighteen down-regulated genes were identified.

Our results suggested that many molecules not related with proteolysis or extra-cellular matrix might correlate with cancer cell invasion or poor differentiation. We are now confirming expression of the picked-up genes by RT-PCR.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：癌先進部、マイクロアレイ、レーザーマイクロダイゼクション

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は全世界的に増加傾向であり、我が国においても食事の欧米化に伴い増加の一途である。しかし、進行癌患者や転移を有する患者では根治手術が不可能であるため、新たな治療法の開発が求められている。

大腸癌は粘膜上皮に発生し、粘膜下層、固有筋層に浸潤し、脈管浸潤を介して遠隔転移をきたす。浸潤に関連する分子は諸家により報告されているが (MMP, TIMP, laminin-5,  $\beta$  catenine, PGE, Arp2/3 など)、殆どが細胞の運動やタンパク融解、もしくは細胞外基質に関する分子であるが、どの分子が重要で、また、その他に関与する分子の有無は不明である。

また予後規定因子として、stage、リンパ節・遠隔転移、組織型などに加えて、簇出や低分化胞巣などの先進部の低分化傾向の有無の重要性が報告されている。

したがって、大腸癌の先進部において特異的に変化する遺伝子は癌細胞の浸潤や低分化傾向に関与し、ひいては予後規定因子となる可能性がある。

### 2. 研究の目的

癌先進部と癌中央部の遺伝子発現の相違から、先進部特異的な変化を呈する遺伝子をス

クリーニングおよび同定することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

大腸癌手術検体から腺管分離法 (もしくはレーザーマイクロダイゼクション法) を用いて癌先進部と癌中央部から癌細胞を採取し、RNA を抽出する。癌先進部、癌中央部各々から RNA を抽出し、Microarray を用い発現プロファイルを作製する。同一症例内でシグナルの差を検討することで、先進部に特異的な変化を呈する遺伝子を抽出し、RT-PCR などで発現を確認する。

対象症例は 50~79 歳の大腸癌患者 (直腸癌を除く) で、高~中分化腺癌 20 例とし、腫瘍中央部、腫瘍最深部を各々採取し、腺管分離法を用い採取検体から癌腺管を採取する。なお、同方法による採取が困難な場合は、他の方法 (レーザーマイクロダイゼクション法など) を検討する。

採取した癌腺管より mRNA を抽出し、RNA の増幅を行った後、biotin によるラベリングを行い、Microarray 解析を行う。Affymetrix 社製の microarray を用い遺伝子発現解析を行う。同一症例内で、癌先進部と中央部のシグナルの差を検討することで、癌先進部で発現が亢進、もしくは低下している遺伝子を同定

する。同定された遺伝子発現状況は RT-PCR で、その遺伝子のコードするタンパクの発現状況は Western blotting、免疫染色を用いて確認を行う。

また、集積症例において、先進部の低分化胞巣を認めた場合は、さらにサブグループ解析を行い、低分化胞巣特異的遺伝子の探索も併せて行う。

#### 4. 研究成果

当初、腺管分離法を用い採取検体から癌腺管を採取する予定であった。しかしながら、低分化胞巣傾向を来した微小な癌細胞塊を顕微鏡で確認することが困難であったため、レーザーマイクロダイゼクション法による癌細胞の選別的な回収を行った。

癌先進部（先進部より 150  $\mu$ m 以内の部位）と癌中央部（先進部より 500  $\mu$ m 以上離れた部位）から各々癌細胞を採取した。

採取した癌細胞より RNA の抽出を行い、バイオアナライザーによる RNA の分解度のチェックを行い、分解がされていないサンプル（RIN7 以上）に対して増幅・ラベリングを行い、microarray を用いた遺伝子発現解析ソフトウェアの作製を行った。

同一症例内の癌先進部におけるシグナル値と癌中央部のシグナル値の差を用いて t 検定を行い、有意な差を有する遺伝子を癌先進部特異的変化を有する遺伝子として抽出した。癌先進部において発現が亢進している遺伝子群（5 遺伝子）、発現が低下している遺伝子群（1 遺伝子）を選出した。（Table 1）

また、上記方法以外にクラスター解析による抽出を行い、先進部で特異的な変化を有する遺伝子群を抽出した。クラスター解析では、先進部で発現が亢進している遺伝子群 24 遺

Table1 癌先進部で変化のある遺伝子群

（t 検定による抽出）

伝子、発現が低下している遺伝子群 29 遺

Expression at front	Categories	Difference (log <sub>2</sub> <sup>x</sup> )	P value $\times 10^{-7}$
Up	Chemokine	2.07	1.1
	Chemokine	2.18	1.1
	Fibrinolytic related-factor	0.97	1.2
	Ubiquitin-like protein	1.63	2.9
	Transcriptional factor	0.73	4.1
Down	Ribosomal protein	-0.36	4.7

子であった。（Table 2）

Table2 癌先進部で変化のある遺伝子群

（クラスター検定による抽出）

また、癌先進部において低分化胞巣などの低分化傾向を認める 11 症例を対象として同様

Expression at front	Categories miRNA	No
Up 24 genes	Secreted protein	5
	Protease	4
	ECM	4
	Chemokine	3
	Binding protein	3
	Enzyme	2
	Protease inhibitor	1
	miRNA	1
	Unknown	1
Down 29 genes	Unknown	6
	Binding protein	5
	Enzyme	3
	Chemokine	3
	Growth factor	2
	Protease	1
	Protease inhibitor	1
	Trypsin inhibitor	1
	GPCR	1
	Secreted protein	1
	miRNA	1
Lipase	1	
Anti-oncogene	1	
Apoptosis related protein	1	
Transporter	1	

の検討を行なった。低分化胞巣を有する癌先進部において発現が亢進している遺伝子群 (4 遺伝子)、発現が低下している遺伝子群 (6 遺伝子) を選出した。(Table 3)

Table3 低分化胞巣を有する癌先進部で変化のある遺伝子群 (t 検定による抽出)

Table4 低分化胞巣を有する癌先進部で変化のある遺伝子群 (クラスター検定による抽出)

Expression at front	Categories	Difference (log2 <sup>2</sup> )	P value × 10 <sup>-1</sup>
Up	Chemokine	2.59	5.07
	Ubiquitin-like protein	1.95	4.53
	Transcriptional factor	0.77	6.65
	Actin-related protein	0.33	9.36
Down	Oxidase	-0.85	7.71
	Histamine-related enzyme	-0.49	3.46
	Ribosomal protein	-0.44	3.90
	Transcriptional factor	-0.34	3.70
	Helicase	-0.32	3.70
	Serine/threonine kinase	-0.26	7.43

による抽出)

また、同様にクラスター解析による抽出を行い、低分化胞巣を有する先進部で特異的な変

Expression at front	Categories	No
Up 13 genes	Protease	4
	Secreted protein	4
	Extracellular matrix	3
	Chemokine	2
Down 18 genes	Secreted protein	2
	Neuropeptide receptor	1
	HMG-CoA related protein	1
	Aldo/keto reductase	1
	Carbonic anhydrase	1
	Chemokine	1
	Anion exchanger	1
	Chemokine	1
	Virus receptor	1
	Fatty acid related protein	1
	CEA	1
	Mucin	1
	Defensin	1
	Unknown	4

化を有する遺伝子群を抽出した。クラスター解析では、先進部で発現が亢進している遺伝子群 13 遺伝子、発現が低下している遺伝子群 18 遺伝子であった。(Table 4)

現在は、抽出された遺伝子群に関して、

RT-PCR による発現の確認を行っている。

以上の検討により既に報告があるプロテアーゼや細胞外基質以外の多くの分子が抽出された。これらの分子の同定や機能解析を行うことで、癌浸潤や低分化傾向の機序解明、新規治療薬の開発に繋がると考えられる。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① Takaaki Kobayashi, Tadahiko Masaki et al. Gene expression profiling at the invasive front of colon cancer. 25th ISUCRS, June 25, 2012, Bologna, Italy.

② 小林 敬明、正木 忠彦ら. Gene expression profiling at the poorly differentiated cluster of colon cancer. 第 71 回日本癌学会, 9 月 21 日, 2012, 札幌.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 敬明 (KOBAYASHI TAKAAKI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 10439169

### (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:

(4) 研究協力者

正木 忠彦 (MASAKI TADAHIKO)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：30238894