

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591483

研究課題名（和文）

 大腸癌microscopic abscessにおける免疫誘導の解明とその臨床応用  
 研究課題名（英文） Analysis of immunity induction in rectal cancer in association with  
 microscopic abscess formation.

研究代表者

上原 圭介 (UEHARA KEISUKE)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50467320

研究成果の概要（和文）：

microscopic abscessを有する大腸癌4症例と有しない大腸癌5症例の遺伝子解析ではToll-like receptor 7 (TLR7) を含む11の遺伝子の発現がmicroscopic abscessを有する症例で亢進していた。TLR7の下流にあるMyeloid differentiation factor 88 (MyD88)の発現は、microscopic abscessを有する症例で有意に低下しており、microscopic abscessを有する症例の予後とMyD88の関連性が考えられた。一方でTLR7とMyD88の発現は一致していず、TLR7以外のMyD88にシグナルを伝達するTLRの関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated gene profile between MAF positive and negative cancer. Eleven genes including Toll-like receptor 7 (TLR7) were overexpressed in MAF positive cancer. We focused on myeloid differentiation factor 88 (MyD88), the downstream component of TLR7. RT-PCR demonstrated that MyD88 was downregulated in MAF positive cancer, compared with MAF negative cancer. Our data indicated that lower expression of MyD88 is related with their better prognosis in MAF positive cancer. Interestingly, nevertheless MyD88 expression is mediated by TLR7, the discrepancy exists between expression of TLR7 and MyD88 in MAF positive cancer. We estimate that other genes except TLR7 regulate MyD88 expression in MAF positive cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：microscopic abscess, 免疫誘導阻止関連遺伝子、TLR7

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌に関する基礎研究の急速な進展により、癌は周囲の細胞、免疫細胞や細胞間基質、chemical mediatorなどの様々な因子と密接な関係を有しており、癌自体だけではなく、

癌組織周囲の環境である微小環境も重要であることが分かってきた(Bhowmick NA, Nature. 2004)。微小環境の1つである血管新生を制御する遺伝子VEGF (vascular endothelial growth factor) の機能を阻害する抗癌剤アバ

スチン (Bevacizumab) を用いることにより大腸癌化学療法の治療成績も改善されている

(Hurwitz H, N Eng J Med. 2004)。しかし、膵癌のように血管新生が乏しいhypovascularな癌においては、血管新生の阻害のみでは十分な効果をあげることは困難であり、さらに効果的な治療法の開発のためには血管新生以外の微小環境を制御することが必要である。これまで微小環境は、癌の生存を支持、サポートする部位として注目されてきた。しかし、宿主である癌患者にとって微小環境は免疫反応により異物である癌を排除し防御する部位でもある。実際、通常免疫のマウスに癌を移植した場合、免疫能の低下させたヌードマウスと比較して癌細胞の生着率が悪く、生着した場合でも時間経過による消退がしばしば経験され、癌の進展と免疫は密接に関係している。われわれは血管新生以外の微小環境の1つであるmicroscopic abscessに注目して研究を行ってきた。microscopic abscessは臨床的な膿瘍とは異なる大腸癌周囲に組織学的に認められる微小な膿瘍のことである(図1)。microscopic abscessは、癌に対する免疫細胞による攻撃の結果、癌が壊死し、壊死した部分が膿瘍となり生じると考えられる。われわれはmicroscopic abscessを有する大腸癌症例は、根治術後の転移、再発が少なく予後の良いことを報告しており (Uehara K. Br J Surg. 2006)、microscopic abscessの有無は、大腸癌に対する免疫誘導の有無を反映しているのではないかと考えている。癌はその進展過程で免疫誘導を阻止するメカニズムを獲得し、さらに進展していくと考えられ、microscopic abscessを有しない大腸癌には免疫誘導を阻止するメカニズムの存在が予想される。

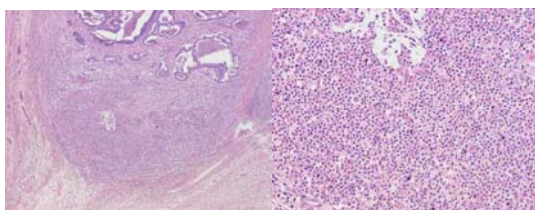


図 1. 大腸癌における microscopic abscess

## 2. 研究の目的

本研究では大腸癌症例において microscopic abscessを同定し、microscopic abscessを有する大腸癌と有しない大腸癌において網羅的遺伝子解析を行う。免疫誘導の阻止に関連する遺伝子を同定し、微小環境における免疫誘導のメカニズムを解明する。また免疫誘導阻止関連遺伝子の抑制により免疫誘導を増強する方法を開発し、微小環境の制御による新たな治療法を開発することを目的

とする。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸癌 microscopic abscess の臨床病理学的検討

大腸癌切除標本のヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織学的検査により microscopic abscess の有無を検討する。microscopic abscess を有する症例と有しない症例での再発、生存期間などとの臨床病理学的検討を行う。

(2) 大腸癌 microscopic abscess 症例の網羅的遺伝子解析

microscopic abscess を有する症例と有しない症例に対して網羅的遺伝子解析をおこない、免疫誘導阻止関連遺伝子を同定する。

(3) 免疫誘導阻止関連遺伝子を標的とした siRNA の開発  
免疫誘導阻止関連遺伝子を標的とした siRNA を作成する。この siRNA を大腸癌細胞株に導入し、その発現抑制効果を real time PCR 法、ウェスタンブローディング法にて検討する。

(4) 大腸癌細胞株による siRNA の機能解析  
免疫誘導阻止関連遺伝子を標的とした siRNA を大腸癌細胞株に導入し、MTT アッセイによる増殖能、インベーションアッセイによる浸潤能、トリパンブルー色素排出試験による細胞死の検討を行なった。正常由来細胞、造血幹細胞、骨髄細胞に免疫誘導阻止関連遺伝子を標的とした siRNA を導入し、免疫誘導能を検討する。

(5) 免疫誘導阻止関連遺伝子の基礎的研究  
免疫誘導阻止関連遺伝子に関するシグナル伝達系を検討する。

## 4. 研究成果

(1) 大腸癌 microscopic abscess の臨床病理学的検討

2009年から2010年に名古屋大学腫瘍外科において手術施行された大腸癌症例 72 例の内 pT2 以上かつ遺伝解析可能であった 9 例について microscopic abscess の有無について検討した。microscopic abscess は 9 例中 4 例に認めた(図 2)。microscopic abscess の有しない症例に 2 例の再発症例を認めたが、Microscopic abscess の有無と生存期間には有意差を認めなかった。

No.	MAF	Age/Sex	Tumor location	Surgical Procedure	pT	pN	H, P, M	ly/v	pStage	Recurrence	Survival (day)	Prognosis	Normal sample
1	-	58M	Rb	LAR	A	0	0	1/1	II	-	1371	Alive	○
2	-	78F	Rb	LAR	mp	0	0	0/0	I	-	1366	Alive	
3	-	80M	Rab	Hartmann	ss	2	0	1/1	IIIb	+(liver, lung)	588	Dead (Recurrence)	
4	-	48F	Rab	Lap-LAR	ss	0	0	1/0	II	+(lung)	1151	Alive	○
5	-	59M	Rab	ISR	A	0	0	0/3	II	-	1002	Alive	○
6	+	64M	Rb	APR	mp	1	0	1/0	IIIa	-	1286	Dead (pneumonia)	
7	+	60M	Rb	VLAR	mp	0	0	0/0	I	-	1105	Alive	
8	+	77F	Rb	Lap-VLAR	A	1	0	0/0	IIIa	-	915	Alive	
9	+	89F	Rb	Hartmann	mp	0	0	1/1	I	-	734	Alive	

図 2. pT2 以上、遺伝解析可能であった症例

(2) 大腸癌 microscopic abscess 症例の網羅的遺伝子解析

microscopic abscess を有する 4 症例と有しない 5 症例のパラフィン包埋ホルマリン固定標本より RNA の抽出を行った。これらの cDNA を用いて免疫能に関連する遺伝子について PCR アレイ法による解析を行った。正常部と癌部における遺伝子発現は異なっており、84 遺伝子のうち 52 遺伝子が癌部で発現亢進していた (data not shown)。microscopic abscess を有する 4 症例と microscopic abscess を有しない 5 症例の解析では microscopic abscess を有する症例では全体的に遺伝子発現が亢進傾向にあった (図 3)。microscopic abscess を有する症例で有意に発現亢進していた遺伝子は Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4), Interleukin 6 receptor (IL6R), Integrin, beta 2 (ITGB2), Toll-like receptor 7 (TLR7) を含む 11 の遺伝子がであった (図 4)。

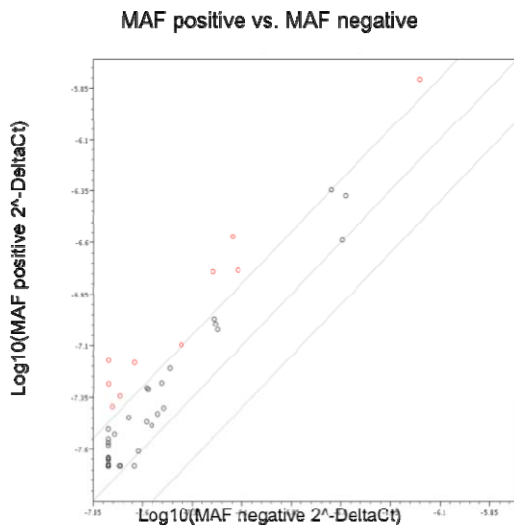


図 3. Microscopic abscess と遺伝子発現の相関

Gene Symbol	Fold Change MAF(+)/MAF(-)	p-value
CCL11	2.86	0.254
CCL2	2.6	0.319
CCL24	2.47	0.097
CCL5	2.87	0.188
CCR1	3.76	0.228
IL6R	2.29	0.275
IL8	2.09	0.437
ITGB2	2.04	0.297
LY96	3.19	0.182
TLR7	2.36	0.043

図 4. Microscopic abscess を有する症例で発現亢進していた遺伝子

(3) 免疫誘導阻止関連遺伝子を標的とした siRNA の開発

免疫誘導阻止関連遺伝子として Toll-like receptor 7 (TLR7) に注目し、TLR7 を標的とした siRNA を作成した。TLR7 siRNA の大腸癌細胞株 DLD1 への導入により、TLR7 の発現抑制効果を real time PCR 法、ウェスタンブローディング法にて確認した。また大腸癌以外の胆管癌細胞株 HuCCT1、膵癌細胞株 KLM1 においても TLR7 siRNA による TLR7 の発現抑制効果を real time PCR 法、ウェスタンブローディング法にて確認した。

(4) 大腸癌細胞株による siRNA の機能解析

TLR7 を標的とした siRNA を大腸癌細胞株 DLD1 に導入し、MTT アッセイによる増殖能を検討した。TLR7 siRNA 導入群と Control siRNA 導入群では増殖能に有意差は認めなかった。膵癌細胞株 KLM1 においても TLR7 siRNA 導入群と Control siRNA 導入群では増殖能に有意差は認めなかった。トリパンプルー色素排出試験による細胞死の検討では大腸癌細胞株 DLD1、膵癌細胞株 KLM1 のいずれにおいても TLR7 siRNA 導入群と Control siRNA 導入群で細胞死に有意差は認めなかった。大腸癌細胞株 DLD1 によるインベーシオンアッセイによる浸潤能の検討により Control siRNA 導入群と比較して TLR7 siRNA 導入群において有意な浸潤の抑制を認めた。

ヒト正常膵臓由来細胞株 RI515 を用いた検討では増殖能、浸潤能、細胞死誘導能のいずれにおいても TLR7 siRNA 導入群と Control siRNA 導入群に有意差を認めなかった。

5: 免疫誘導阻止関連遺伝子の基礎的研究

われわれは TLR7 のシグナルの下流にある Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) に注目した。pT2 以上かつ遺伝解析可能であった大腸癌 9 例の正常部と癌部の RT-qPCR による MyD88 の発現の比較検討では、MyD88 は癌部で有意に発現亢進していた。microscopic

abscessを有する4症例とmicroscopic abscessを有しない5症例でのMyD88の比較検討では、MyD88はmicroscopic abscessを有する症例で有意に低下していた（図5）。MyD88は大腸癌の予後との関連が報告されており、microscopic abscessを有する症例において予後が良好である原因の1つとしてMyD88との関連性が考えられた。一方でTLR7とMyD88の発現は一致していなかった。Toll-like receptorsファミリーにはTLR7以外にもMyD88にシグナルを伝達するTLRが存在している。他のTLRの関与が示唆され、現在MyD88に関する機能解析およびTLR3、4、9に関する発現についても検討を行っている。microscopic abscessに関する分子機構および免疫誘導阻止関連遺伝子の制御についてさらなる研究が必要である。

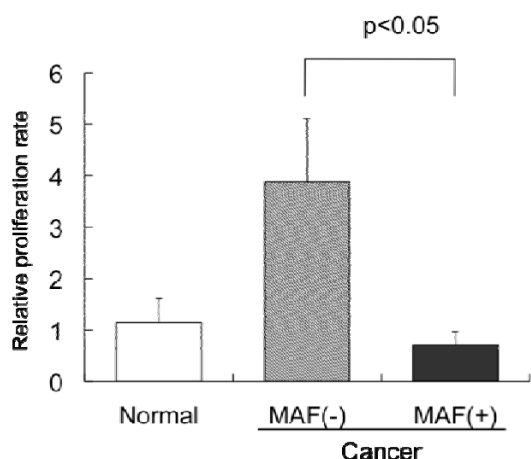


図5. Microscopic abscess と MyD88 の発現  
5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1.Ninth AACR Japanese Cancer Association  
Joint Conference  
(2013年02月21日～2013年02月25日 Maui,  
USA)

Masanori Uno, Toshio Kokuryo, Yukihiro  
Yokoyama, Keisuke Uehara, Yuichiro Yoshioka,  
Masato Nagino  
The expression pattern of MyD88 in rectal cancer  
in association with microscopic abscess  
formation.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原圭介 (UEHARA KEISUKE )

名古屋大学 医学部附属病院 病院講師  
研究者番号：50467320

(2) 研究分担者

榑野正人 (NAGINO MASATO )  
名古屋大学 大学院医学系研究科 教授  
研究者番号：20237564

横山幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO )  
名古屋大学 医学部附属病院 講師  
研究者番号：80378091

國料俊男 (KOKURYO TOSHIO )  
名古屋大学 大学院医学系研究科  
特任講師  
研究者番号：60378023

石黒 成治 (ISHIGURO SEIJI)  
名古屋大学 医学部附属病院 病院助教  
研究者番号：50571345  
(H22 年度)

(3) 連携研究者  
なし