

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591966

研究課題名(和文)大腸癌におけるp53およびオートファジー機能解明と治療への応用

研究課題名(英文)p53 and autophagy in colorectal cancer : function mechanism and Therapeutic applications

研究代表者

宮本 裕士 (MIYAMOTO, Yuji)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80551259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は p53 status 及びオートファジーの活性が大腸癌における抗癌剤感受性に与える影響について検証することを目的とした。

1.大腸癌細胞株において、p53Knockdown(KD)細胞及びcontrol細胞にDNA障害を加えた所、オートファジーの誘導が認められ、p53KD細胞においてLC3IIの集積が強かった。また、siATG5で処理したのちに5-FUによるDNA障害を加えた所、p53KD細胞はアポトーシスの程度が低い傾向が認められた。

2.化学療法後の大腸癌肝転移切除サンプルを用いてオートファジー関連蛋白の免疫組織染色を行った。ある分子は高発現群においてリンパ管浸潤が有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a cellular response to adverse environment and stress. Recent evidence suggests that tumor cells induce autophagy during treatment of anticancer drugs. However, the effect of these events on cancer is not known. The aim was to evaluate the effect of p53 status and autophagy activity on the chemosensitivity of colorectal cancer.

1. Autophagy was induced in response to DNA damage in p53 wild-type and p53 knockdown(p53-KD) colorectal cancer cells. The accumulation of LC-III was more intense in p53-KD cell than that in p53-cont cell. Furthermore, we confirmed that apoptosis was induced in response to DNA damage in p53-cont and p53-KD cells after treating with siATG5. Apoptosis in p53-KD cell was less than that in p53-cont cell.

2. Immunohistochemical staining of resected liver tumor revealed that the expression of some autophagic related protein(Protein A) was markedly decreased. Patients in high Protein A expression group was associated with lymphatic invasion.

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 オートファジー p53 colorectal cancer

### 1. 研究開始当初の背景

わが国における大腸癌の死亡者数は一貫して増加傾向にあり、2008 年部位別がん死亡率では第 3 位であり、今後も大腸癌への対策が重要である。大腸癌肝転移症例では外科的切除が最も治療効果が高いが、切除可能症例は肝転移症例全体の 30%にも満たず、切除不能例に対する化学療法が奏功し、ダウンスレージングさせて手術を行えるかが重要な要素となっている。

このため、抗癌剤感受性に対する新たなバイオマーカーの開発が期待されている。

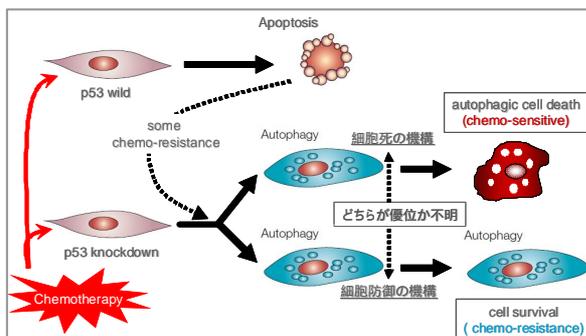
### 2. 研究の目的

オートファジーとはすべての体細胞に備わる主要な細胞質内の分解機構である。今回我々は p53 status およびオートファジーの活性程度と大腸癌における抗癌剤感受性の関連を明らかにし、オートファジー活性化の有無が大腸癌化学療法の治療効果に対する新規バイオマーカーとして機能するかを in vivo 実験および臨床サンプルを用いて検証する。

(1) 大腸癌細胞株を用いた in vitro 実験において、p53 status とオートファジー活性が抗癌剤(oxaliplatin, irinotecan, 5-FU)の感受性と関連があるかを検証する。

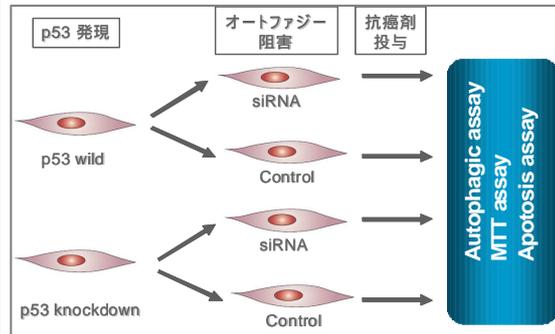
(2) 大腸癌細胞株では抗癌剤投与によって起こるオートファジーは細胞死の機構または細胞防御の機構のどちらが優位なのかを確認する。

(3) 実際に化学療法後の大腸癌肝転移サンプルにおいて p53 status とオートファジー活性が抗癌剤感受性および臨床的予後と関連があるかを明らかにし、オートファジー関連分子が新たな抗癌剤感受性のバイオマーカーとなることを期待する。



### 3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞株を用いた実験では、siRNAにて p53 およびオートファジー関連遺伝子の発現を knockdown させた後に抗癌剤処理(5-FU, oxaliplatin, irinotecan)を行うことで、p53 発現とオートファジー活性化が抗癌剤処理後の細胞死に与える影響を検証する。



(2) 化学療法後の大腸癌肝転移切除サンプルを用いて、オートファジー関連蛋白と p53 蛋白の免疫組織染色を行い、in vivo 実験で示された抗癌剤感受性の要素が実際のヒト癌切除サンプルで認められるかを確認する。

### 4. 研究成果

(1) LS174T 大腸癌細胞株(p53wt)における p53 knockdown(KD)細胞株と control 細胞株を用いて飢餓状態及び 5-FU による DNA 障害時のオートファジー誘導確認ならびにアポトーシスの誘導確認を行った。

(2) p53KD 細胞及び control 細胞をオートファジーのコントロールとしてまず飢餓状態に置いた後、オートファジーの誘導を LC3 及び p63 の蛋白発現にて確認した。p53wt 及び p53 KD いずれの状態においてもオートファジーの誘導が認められたが、p53KD 細胞において LC3II の accumulation が強い傾向にあった。

(3) p53KD 細胞及び control 細胞を 5-FU による DNA 障害を加えた後、オートファジーの誘導を LC3 及び p63 の蛋白発現にて確認した。飢餓状態と同様に p53wt 及び p53KD 細胞いずれの状態においてもオートファジーの誘導が認められたが、p53KD 細胞において LC3II の accumulation が特に後期において強い傾向にあった。

(4) p53KD 細胞及び control 細胞に 5-FU による DNA 障害を加えアポトーシスの誘導を確認した。p53KD 細胞ではアポトーシスの誘導は起きなかった。

(5) p53KD 細胞及び control 細胞を siATG5 で処理したのちに 5-FU による DNA 障害を加え、アポトーシスの誘導を確認した所、p53KD 細胞は control 細胞と比較してアポトーシスの程度が低い傾向が認められた。

以上の結果より、大腸癌細胞株においてオートファジーは DNA 障害時にアポトーシスを促進する働きを持っていることが示唆された。

化学療法後の大腸癌肝転移切除サンプルを用いてオートファジー関連蛋白の免疫組織染色を行った所、ある分子は大腸癌での発現が著しく低下していた。この分子を発現レベルによって高発現群と低発現群に分けた所、高発現群においてリンパ管浸潤が有意に高いことが判明した。

#### 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 13 件)

Miyamoto Y, Beppu T, Sakamoto Y, Imai K, Hayashi H, Nitta H, Ishiko T, Watanabe M, Baba H. Simultaneous laparoscopic resection of primary tumor and liver metastases for colorectal cancer: Surgical technique and short-term outcome. *Hepatogastroenterology*. 査読有(accept)

Miyamoto Y, Watanabe M, Sakamoto Y, Shigaki H, Murata A, Sugihara H, Etoh K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Iwagami S, Yoshida N, Baba H. Evaluation of the necessity of primary tumor resection for synchronous metastatic colorectal cancer. *Surg Today*. 2014 Mar 14. 査読有[Epub ahead of print]

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24623012>

Miyamoto Y, Watanabe M, Ishimoto T, Baba Y, Iwagami S, Sakamoto Y, Yoshida N, Masuguchi S, Ihn H, Baba H. Fascia lata onlay patch for repairing infected incisional hernias. *Surg Today*. 2014 Jun 3. 査読有[Epub ahead of print]

DOI: 10.1007/s00595-014-0936-y

Beppu T, Miyamoto Y(equal contributor), Sakamoto Y, Imai K, Nitta H, Hayashi H, Chikamoto A, Watanabe M, Ishiko T, Baba H. Chemotherapy and targeted therapy for patients with initially unresectable colorectal liver metastases, focusing on conversion hepatectomy and long-term survival. *Ann Surg Oncol*. 2014 Jun;21 Suppl 3:405-13. 査読有

DOI: 10.1245/s10434-014-3577-x.

Saito S, Okabe H, Watanabe M, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Tanaka Y, Kurashige J, Miyamoto Y, Baba H. CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2013 Apr;29(4):1570-8. 査読有

DOI: 10.3892/or.2013.2273.

Mima K, Beppu T, Chikamoto A, Miyamoto Y, Nakagawa S, Kuroki H, Okabe H, Hayashi H, Sakamoto Y, Watanabe M, Kikuchi K, Baba H. Hepatic resection combined with

radiofrequency ablation for initially unresectable colorectal liver metastases after effective chemotherapy is a safe procedure with a low incidence of local recurrence. *Int J Clin Oncol*. 2013 Oct;18(5):847-55. 査読有

DOI: 10.1007/s10147-012-0471-z.

宮本裕土、坂本快郎、尾崎宣之、石本崇胤、岩槻政晃、馬場祥史、岩上志朗、吉田直矢、渡邊雅之、馬場秀夫、「【抗がん剤または分子標的薬治療の効果判定と変更のタイミング-私はこうしている-(その1)】大腸癌における抗がん剤治療の効果判定と変更のタイミング」、*癌と化学療法* 39(9):1326-1329, 2012 査読有

URL:<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ab8gkrc/2012/003909/005&name=1326-1329j&UserID=133.95.84.91>

Sato N, Hayashi N, Imamura Y, Tanaka Y, Kinoshita K, Kurashige J, Saito S, Karashima R, Hirashima K, Nagai Y, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Baba Y, Watanabe M, Baba H. Usefulness of transcription-reverse transcription concerted reaction method for detecting circulating tumor cells in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jun;19(6):2060-5. 査読有

DOI: 10.1245/s10434-011-1889-7.

岩槻政晃、林尚子、渡邊雅之、石本崇胤、馬場祥史、宮本裕土、馬場秀夫、「大腸癌のリンパ節中微量癌細胞検出の意義2 ~MASA法~」、*大腸癌 FRONTIER*、5:41-44、2012. 査読無

URL:[http://med.m-review.co.jp/magazine/detail1/J46\\_5\\_1\\_41-44.html](http://med.m-review.co.jp/magazine/detail1/J46_5_1_41-44.html)

Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Futamura M, Miyamoto T, Yoshida M, Ono M, Ichinose S, Arakawa H. Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria and its role in mitochondrial quality control. *PLoS One*. 2011 Jan 17;6(1):e16054. 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0016054.

Kitamura N, Nakamura Y, Miyamoto Y, Miyamoto T, Kabu K, Yoshida M, Futamura M, Ichinose S, Arakawa H. MIEAP, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. *PLoS One*. 2011 Jan 17;6(1):e16060. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0016060.

美馬浩介、別府 透、林尚子、増田稔郎、宮本裕土、近本 亮、石河隆敏、渡邊雅之、高森啓史、馬場秀夫、「大腸癌における分子標的治療 Convention therapy を念頭においた切除不能大腸癌肝転移に対する分子標的治療」、*外科*、73:257-261. 2011 査読無  
井田智、宮本裕土、坂本快郎、渡邊雅之、

馬場秀夫、「大腸癌発癌におけるSPINK1の発現と意義」、消化器内科、53：627-631、2011  
査読無

〔学会発表〕(計7件)

宮本裕土、坂本快郎、井田智、長井洋平、石本崇胤、岩槻政晃、馬場祥史、岩上志朗、渡邊雅之、馬場秀夫、「当院における bevacizumab を使用した切除不能大腸癌症例の検討」、第45回制癌剤適応研究会、2012年3月2日、東京都・国際ファッションセンター(両国)

Miyamoto Y, Sakamoto Y, Ida S, Watanabe M, Baba H. 「Evaluation of the necessity of primary tumor resection for synchronous metastatic colorectal cancer.」、ASCO 2012 Gastrointestinal Cancers Symposium、2012年1月21日、San Francisco, USA.

宮本裕土、坂本快郎、井田智、齋藤誠哉、土居浩一、渡邊雅之、馬場秀夫、「大腸癌肝転移切除後の術後補助療法としての FOLFOX 療法の検討」、第66回日本大腸肛門病学会学術集会、2011年11月26日、東京都・ホテルニューオータニ

Miyamoto Y, Baba H, Yamaguchi S, 「Effects of obesity in laparoscopic surgery for colorectal cancer」、INTERNATIONAL SURGICAL WEEK 2011、2011年8月29日、神奈川県・パシフィコ横浜

宮本裕土、林尚子、齋藤誠哉、平島浩太郎、辛島龍一、長井洋平、岩槻政晃、馬場祥史、渡邊雅之、馬場秀夫、「高齢者大腸癌症例の検討」、第66回日本消化器外科学会総会、2011年7月13日、名古屋国際会議場(愛知県)

Miyamoto Y, Ishii S, Tashiro J, Satoh T, Baba H, Yamaguchi S. 「Laparoscopic palliative resection of primary tumor for stage iv colorectal cancer.」、EAES、2011年6月18日、Turin, Italy.

宮本裕土、林尚子、今村裕、長井洋平、岩上志朗、増田稔郎、近本亮、石河隆俊、渡邊雅之、別府透、馬場秀夫、「同時性肝転移を有する大腸癌患者に対する腹腔鏡補助下大腸・肝同時切除術の検討 / Simultaneous laparoscopic resection of primary colorectal cancer and synchronous liver metastases」、第111回日本外科学会定期学術集会、2011年5月27日(誌上開催)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 裕土 (MIYAMOTO, Yuji)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80551259

(2) 研究分担者

馬場 秀夫 (BABA, Hideo)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：20240905

林 尚子 (HAYASHI, Naoko)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：20452899

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師  
研究者番号：20599708

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：