

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590458

研究課題名(和文)大腸癌漿膜浸潤部の微小環境が転移を促進する機構の解明

研究課題名(英文) Cancer Microenvironment formed by peritoneal invasion enhance tumor progression through the activation of subperitoneal fibroblast.

研究代表者

小嶋 基寛 (Motohiro, Kojima)

独立行政法人国立がん研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：30338470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：漿膜弾性板を越えた大腸癌の浸潤は予後と強く関連し、この所見を病理学的に判定する重要性を報告した。この報告は国際的なコンセンサスを得つつあり、T分類の変更が提案されている。さらに我々は漿膜弾性板を越えた大腸癌の浸潤により、線維化、腫瘍の budding、マクロファージの浸潤を伴う特殊な微小環境 (Cancer microenvironment formed by peritoneal invasion: CMPI) が形成されることに加えて、ヒト漿膜由来の線維芽細胞を用いてCMPIの形成と腫瘍の進展に漿膜由来の線維芽細胞が能動的に関わることを報告した。

研究成果の概要(英文)：We reported firstly that peritoneal elastic laminal invasion (ELI) in colon cancer is the strong prognostic factor. This report is going to get world-wide consensus, and upstaging of pT3 colon cancer with ELI is proposed. Furthermore, we found morphologically distinct tumor microenvironment was formed in tumor area with peritoneal invasion, and defined it as cancer microenvironment formed by peritoneal invasion (CMPI). We propagated subperitoneal fibroblast (SPF) from human peritoneum, and found that SPF is characterized by the robust gene overexpression by cancer medium stimulation. Using in vivo mouse model co-injected with subperitoneal fibroblast and cancer cells, we found that SPF actively promote tumor progression and metastasis. Together with these findings, SPF plays crucial role in cancer progression and metastasis in tumor area of CMPI.

研究分野：人体病理学

キーワード：人体病理学 大腸がん 癌微小環境

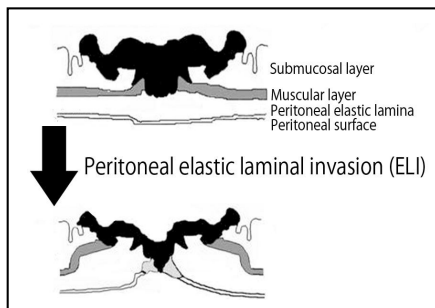
科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

1. 研究開始当初の背景

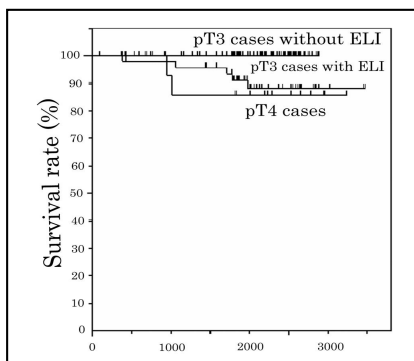
漿膜は心膜、胸膜及び腹膜を形成し心臓、肺や腹腔臓器を覆う 50 μm 程の薄い膜で、その最外層より中皮細胞、基底膜、線維組織と弾性染色で青く染色される腹膜弾性板の順で、その内側には漿膜内層があり、漿膜下脂肪組織に連続する。我々は大腸癌 564 例の検討から漿膜弾性板を越えた浸潤 (Peritoneal elastic-laminal invasion: ELI) を有する症例が、有さない pT3 症例と比較して、深い潰瘍形成や漿膜や筋層の拳上、漿膜面の線維化が生じることを証明し、大腸癌の進行過程において予測される形態変化を提唱した (Figure-1)。

Figure-1: 大腸癌の漿膜弾性板浸潤による形態変化



さらに我々は大腸癌の予後は現在の WHO 分類における pT4 の定義である漿膜面への露出ではなく、ELI の有無に左右されることを示した (Figure-2)。

Figure-2: pT4 でなく、ELI の有無で大腸癌の予後が分別される



ELI 陽性症例における同時性肝転移は ELI 陰性症例の 3 倍、腹膜転移は 20 倍に上る。これらの研究は我々が先駆けて報告した。上記の所見から我々は“ELI という場が腫瘍の進展や転移を促進している”という仮

説を立てた。

2. 研究の目的

I. ELI の臨床病理学的検討: ELI の病理診断の有用性をさらに示し、より適切な WHO 分類の改訂に貢献する。

II. 転移を促進する腫瘍微小環境としての ELI の検討: 漿膜弾性板を越えた腫瘍微小環境で特異的に生じ転移と相関する細胞成分を抽出し、転移に関わる分子機構の解明を行う。

3. 研究の方法

I. ELI の臨床病理学的検討:

ELI の臨床病理学的特徴をより詳細に検討し、国内外に発信する。

II. 転移を促進する腫瘍微小環境としての ELI の検討:

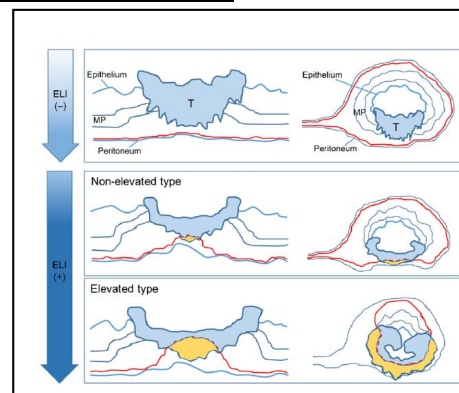
ELI により生じる微小環境を定義してその病理学的特徴を検討することで、注目すべき形態的現象を検討し、生物学的な検討を加えることで、分子機構を解明する。

4. 研究成果

I. ELI の病理診断的有用性の検討

さらなる臨床病理学的検討から、一般的に術後補助化学治療が施行されていない ELI 陽性 Stage II 大腸癌は、術後補助化学療法が施行される Stage III 大腸癌と同等の予後であったことから、将来的に治療対象となる可能性を示した。また、形態的検討から、大腸癌は ELI を生じたあとに、弾性板が腫瘍側に引き寄せられ、腫瘍径が拡大し、消化管閉塞などの臨床症状が生じることが判明した (Figure-3)。これらの報告を国内外において行い、複数の同様の報告がなされた。本年度の米国、カナダ病理学会において ELI 陽性大腸癌を別の T カテゴリーに分類するべきとの提案がなされた。

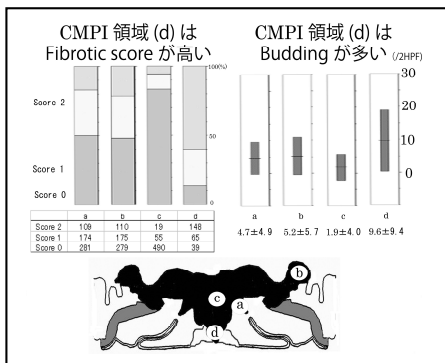
Figure-3: pT3 から pT4 大腸癌に進展する過程における形態変化



11. 転移を促進する腫瘍微小環境としての ELI の検討

漿膜弾性板を越えた腫瘍微小環境で特異的に生じ転移と相関する細胞成分を抽出した。漿膜弾性板を越えた腫瘍微小環境は SMA 陽性の線維化、腫瘍の budding、マクロファージの浸潤で特徴づけられ、線維化巣として形態的に認識できることから Cancer microenvironment formed by peritoneal invasion (CMPI) と定義し、正常の漿膜弾性板を越えた腹膜(腹腔内に存在する漿膜)の直下の部分に存在する線維芽細胞と腫瘍の相互作用に注目することとした (Figure-4)。

Figure-4 : CMPI 領域では線維化と腫瘍の Budding が生じる



ヒト大腸腹膜組織はピンセットでつまむと薄く剥離することができる。その組織から腹膜直下線維芽細胞 (Subperitoneal fibroblast: SPF)を採取、培養した。コントロールとしては粘膜下層由来の線維芽細胞を採取、培養した (Submucosal fibroblast: SMF)。

培養した際、SPF は SMF と比較して増殖が遅く、Confluent になった際の細胞数が少ない。我々は同じ腸管由来の線維細胞でも両者は性質が異なると考え、cDNA microarray を施行し、両者を比較検討した。さらに、両者を癌培養上清で刺激した際の反応性の違いについても検討した。その結果、SPF と SMF はコラーゲンや細胞外マトリックスなど、線維芽細胞の基本的な機能に関わる分子発現が異なることが判明した。また、SPF は癌細胞培養上清で刺激した際により多くの分子発現の上昇が生じ、それらの分子には ACTA2(α -SMA)など線維芽細胞の活性化に関わる分子が含まれていた (Figure-5)。SPF とヒト大腸癌細胞株をマウスに共移植すると SMF と大腸癌細胞を共移植する場合と比較して、腫瘍増殖が早く、リンパ節転移が多く生じることが判明した。これらの結果から CMPI において SPF と大腸癌細胞の相互作用が腫瘍進展を促進することが示された。

SPF を癌培養上清で刺激した際に特異的に上昇する分子 (SPF signature gene) 発現の特徴で GEO に公開されているヒト大腸組織の網羅解析情報を分類したところ、SPF signature gene 発現の高い症例 (high SPF gene signature group: HSGS group) と低い症例 (low SPF gene signature group: LSGS) に分けることが可能で、HSGS group は予後が悪いことが判明した (Figure-6)。現在 SPF signature gene から予後予測因子を抽出し、当院の大腸癌症例で RNA レベルで validation することによって複数の予後予測バイオマーカーが検出されている。現在、蛋白レベルでの validation を行っている。それらの多くは間質の線維芽細胞に発現しており、生物学的な役割を有することが期待される。将来的にはそれらの分子発現が癌細胞に与える生物学的検討を行うことで、治療標的を探索する予定である。

Figure-5 : SPF と SMF は異なる遺伝子発現プロファイルを有し、癌培養上清に対する反応性も異なる

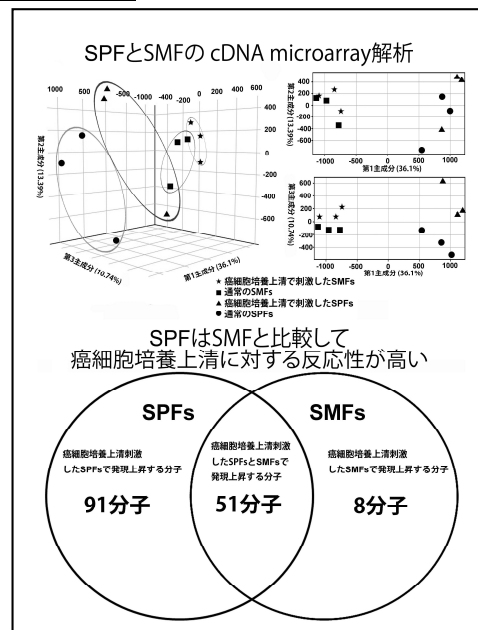
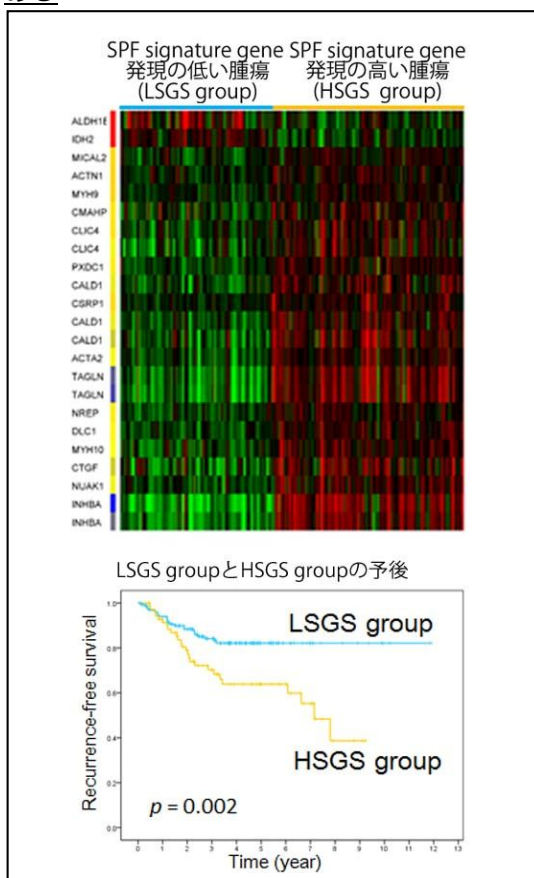


Figure-6 : SPF を癌培養上清刺激した際に上昇する分子発現で腫瘍を分類することができ、それら分子発現の高い症例は予後不良である



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 25 件)

1. Kojima M, et al. MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary-tract cancers. *PLoS One*.2015 ;10(2):e0118220. 査読有. doi:10.1371/journal.pone.0118220.
2. Kitaguchi K, Kato Y, Kojima M, et al. A resected case of intraductal tubulopapillary neoplasm of the pancreas: report of a case. *Int Surg*.2015;100(2):281-6.doi:10.9738/INTSURG-D-14-00172.1. 査読有.
3. Yokota M, Kojima M, et al, Spread of tumor microenvironment contributes to colonic obstruction through subperitoneal fibroblast activation in colon cancer. *Cancer Sci*.2015 Jan 23. in press, doi: 10.1111/cas.12615. 査読有.
4. Sugimoto M, Takahashi S, Kobayashi T, Kojima M, et al, Pancreatic perfusion data and post-pancreaticoduodenectomy outcomes. *J Surg Res*.2015;94(2):441-9. doi: 10.1016/j.jss.2014.11.046. 査読有.
5. Sugimoto M, Takahashi S, Kojima M, et al. What is the nature of pancreatic consistency? Assessment of the elastic modulus of the pancreas and comparison with tactile sensation, histology, and occurrence of postoperative pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. *Surgery*.2014;156(5):1204-11.doi:10.1016/j.surg.2014.05.015. 査読有.
6. Yamada E, Ishii G, Aramaki N, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Kojima M, et al. Tumor-size-based morphological features of metastatic lymph node tumors from primary lung adenocarcinoma. *Pathol Int*. 2014;64(12):591-600.doi:10.1111/pin.12213. 査読有.
7. Saito N, Ito M, Kobayashi A, Nishizawa Y, Kojima M, et al. Long-term outcomes after intersphincteric resection for low-lying rectal cancer. *Ann Surg Oncol*.2014;21(11):3608-15.doi:10.1245/s10434-014-3762-y. 査読有.
8. Kaneko K, Yamaguchi H, Saito T, Yano T, Oono Y, Ikematsu H, Nomura S, Sato A, Kojima M, et al. Hypoxia imaging endoscopy equipped with laser light source from preclinical live animal study to first-in-human subject research. *PLoS One*. 2014;9(6):e99055. doi:10.1371/journal.pone.0099055. 査読有.
9. Yokota M, Kojima M, et al. Clinical impact of elastic laminal invasion in colon cancer: elastic laminal invasion-positive stage II colon cancer is a high-risk equivalent to stage III. *Dis Colon Rectum*. 2014; 57(7):830-8.doi:10.1097/DCR.000000000000124. 査読有.
10. Sato M, Kojima M, et al. Optimal fixation for total preanalytic phase evaluation in pathology laboratories: a comprehensive study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays. *Pathol Int*.2014;64(5):209-16. doi:10.1111/pin.12164. 査読有.
11. Sugimoto M, Mitsunaga S, Yoshikawa K, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Konishi M, Ikeda M, Kojima M, et al. Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer*. 2014;50(11):1900-8. doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.010. 査読有.
12. Kojima M, Ochiai A. [Mechanism of

- invasion and metastasis in colorectal cancer]. *Nihon Rinsho*. 2014 ;72(1):2-6. Japanese. 査読無.
13. Kojima M, et al. Human subperitoneal fibroblast and cancer cell interaction creates microenvironment that enhances tumor progression and metastasis. *PLoS One*. 2014;9(2):e88018.doi:10.1371/journal.pone.0088018. 査読有.
 14. Suyama K, Ikeda M, Suzuki E, Kojima M, et al. Early relapse of unresectable gallbladder cancer after discontinuation of gemcitabine monotherapy administered for 5 years in a patient who had complete response to the treatment. *Case Rep Oncol*. 2013;6(3):531-7.doi:10.1159/000356080. 査読有.
 15. Kojima M, et al. Practical utility and objectivity: does evaluation of peritoneal elastic laminal invasion in colorectal cancer overcome these contrary problems? *Am J Surg Pathol*. 2014;38(1):144-5.doi:10.1097/PAS.000000000000121. 査読有.
 16. Ueno H, Shirouzu K, Eishi Y, Yamada K, Kusumi T, Kushima R, Ikegami M, Murata A, Okuno K, Sato T, Ajioka Y, Ochiai A, Shimazaki H, Nakamura T, Kawachi H, Kojima M, et al. Characterization of perineural invasion as a component of colorectal cancer staging. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(10):1542-9.doi:10.1097/PAS.0b013e318297ef6e. 査読有.
 17. Nakayama Y, Ikeda M, Kojima M, et al. Successful everolimus treatment in a patient with advanced pancreatic neuroendocrine tumor who developed everolimus-induced interstitial lung disease on two occasions: a case report. *Chemotherapy*. 2013;59(1):74-8. doi:10.1159/000351103. 査読有.
 18. Ueno H, Shirouzu K, Shimazaki H, Kawachi H, Eishi Y, Ajioka Y, Okuno K, Yamada K, Sato T, Kusumi T, Kushima R, Ikegami M, Kojima M, et al. Histogenesis and prognostic value of myenteric spread in colorectal cancer: a Japanese multi-institutional study. *J Gastroenterol*. 2014;49(3):400-7. doi:10.1007/s00535-013-0822-1. 査読有.
 19. Kojima M, et al. Pathological diagnostic criterion of blood and lymphatic vessel invasion in colorectal cancer: a framework for developing an objective pathological diagnostic system using the Delphi method, from the Pathology Working Group of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. *J Clin Pathol*. 2013;66(7):551-8.doi:10.1136/jclinpath-2012-201076. 査読有.
 20. Sugimoto M, Gotohda N, Kato Y, Takahashi S, Kinoshita T, Shibasaki H, Kojima M, et al. Pancreatic resection for metastatic melanoma originating from the nasal cavity: a case report and literature review. *Anticancer Res*. 2013;33(2):567-73. 査読有.
 21. Kojima M, et al. Elastic laminal invasion in colon cancer: diagnostic utility and histological features. *Front Oncol*. 2012;2:179.doi:10.3389/fonc.2012.00179. 査読有.
 22. Makinoshima H, Ishii G, Kojima M, et al. PTPRZ1 regulates calmodulin phosphorylation and tumor progression in small-cell lung carcinoma. *BMC Cancer*. 2012;12:537.doi:10.1186/1471-2407-12-537. 査読有.
 23. 佐藤正明、小嶋基寛ら. パラフィンブロックの長期保存と採取試料の固定までの時間が与える Ki-67 免疫染色、DNA と RNA への影響. *診断病理*. 2015;32(1):12-17. 査読有.
 24. 小嶋基寛ら. 脈管侵襲の評価法と分類、どうあるべきか. *大腸癌 Frontier*. 2012;5(3):44-49. 査読なし.
 25. Kojima M, et al. Blood and lymphatic vessel invasion in pT1 colorectal cancer. An international concordance study. *J Clin Pathol*. 2015 in press. 査読有り.
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. Kawano S, Kojima M, et al. Correlation between the elastic modules of colorectal cancer tissue and clinicopathological and histological findings. 104th Annual Meeting of USCAP 2015. 2015/3/21-27 Boston. アメリカ.
 2. Kojima M, et al. Construction of an objective pathological diagnostic system of blood and lymphatic vessel invasion. 104th Annual Meeting of USCAP 2015. 2015/3/21-27 Boston. アメリカ.
 3. 小嶋基寛 落合淳志. 膵臓における腫瘍類似病変 腫瘍と鑑別を要する膵病変 overview. 第 103 回日本病理学会総会. 2014/4/24-26 広島.
 4. 小嶋基寛. 漿膜弾性板を越えて浸潤する大腸癌に生じる形態変化と形成される微小環境の解明. 第 60 回日本病理学会秋季特別総会. 2014/11/20-21 沖縄.
 5. Kojima M, et al. Pathological

diagnostic criterion of blood and lymphatic vessel invasion in colorectal cancer: a framework for developing an objective pathological diagnostic system using Delphi method, from the Pathology Working Group of the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. 26th European Congress of Pathology. 2014/8/30-9/3 London. 英国.

6. Kojima M, et al. MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and bile duct cancers. 第73回日本癌学会学術総会. 2014/9/25-27 横浜.
7. 小嶋基寛ら. Consensus development method を用いた脈管侵襲病理判定基準作成の試み 大腸がん研究会プロジェクトより. 第102回日本病理学会総会. 2013/6/6-8 札幌.
8. 小嶋基寛ら. 大腸壁内における線維芽細胞の多様性により大腸癌は漿膜浸潤部に特殊な微小環境を形成する. 第72回日本癌学会総会. 2013/10/3-5 横浜.
9. 小嶋基寛ら. 大腸漿膜弾性板を越えた微小環境の検討. 第101回日本病理学会総会. 2012/4/26-28 東京.
10. Kojima M, et al. Characteristics of subserosal microenvironment which accelerate metastasis of colon cancer. 第71回日本癌学会学術総会. 2012/9/19-21 札幌.
11. Yokota M, Kojima M, et al. The magnitude of poor prognosis for node-negative colon cancer patients with elastic laminal invasion. DDW 2013. 2013/5/18-21 Orland. アメリカ.

〔図書〕(計 2 件)

1. 小嶋基寛. 癌診療指針のための病理診断プラクティス 肝・胆・膵腫瘍 287-293. 2014. 中山書店.
2. 小嶋基寛. 癌診療指針のための病理診断プラクティス 大腸癌 22-31. 2012. 中山書店.

〔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

<http://www.ncc.go.jp/jp/ncce/rcio/research/clip/mokojima.html>

6. 研究組織

国立がん研究センター東病院、臨床開発センター、臨床腫瘍病理分野、ユニット長

(1)研究代表者

小嶋 基寛 (Kojima, Motohiro)

研究者番号: 24590458

(2)研究分担者

該当なし

()

(3)連携研究者

該当なし

()