

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591982

研究課題名(和文) 大腸癌分子標的フォスファターゼとラス遺伝子の治療可能性についての検討

研究課題名(英文) Therapeutic potential of the molecular targeting of PRL-3 and K-ras gene in colorectal cancer.

研究代表者

渡辺 昌彦 (Watanabe, Masahiko)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：80146604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：(1) K-ras遺伝子変異は原発癌ではステージング因子などと相関はなく、原発癌あるいは転移癌において、約40%の遺伝子変異を認めた。異時性転移において原発癌では遺伝子変異がなく、転移癌で遺伝子変異を認めたものはいずれもcodon13の遺伝子変異であった。

(2) 大腸癌遠隔転移に関わるPRL-3遺伝子増幅について原発癌100例と転移癌44例の遺伝子増幅程度に関して臨床病理学的検討を行った。原発癌において遺伝子増幅を高頻度に認め未分化大腸癌で頻度が高く予後不良であった。

(3) 大腸癌肝臓転移癌において遺伝子増幅は原発癌に比較して有意に高くPRL-3遺伝子増幅は転移癌で濃縮されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：(1) K-ras gene mutation was not correlated with staging factors in primary colorectal cancer, and it was recognized in about 40% of either primary or metastatic tumors.

(2) Clinicopathological analysis was performed for PRL-3 genomic amplification in 100 primary tumors of colorectal cancer, and 44 metastatic liver tumors of colorectal cancer. PRL-3 genomic amplification is more frequently recognized in poorly differentiated colorectal cancer, and cases with PRL-3 genomic amplification showed poorer prognosis than those without it.

(3) PRL-3 genomic amplification was significantly more frequently found in liver tumor of colorectal cancer than in the corresponding primary colorectal cancer.

研究分野：大腸外科

キーワード：PRL-3 K-ras 大腸癌 予後 リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は日本において死亡原因の2位を占める頻度の高い癌腫であり社会性が高いと考えられている。大腸癌の治療は手術による根治切除が基本であるが、近年有効な化学療法レジメンの開発により予後が延長している。現在の治療進歩にもかかわらず、進行大腸癌の予後は依然として不良であり新規治療の開発が求められている。大腸癌は癌関連遺伝子の変化により前癌病変のポリープから adenoma carcinoma sequence を経て形成され、分子変化と表現型についての関連が最もよく知られている癌腫でもある。APC, K-ras, p53, DPC-4, PRL-3 遺伝子の変異や発現変化は adenoma-carcinoma sequence に一致した変化を示す。われわれは、癌の遺伝子異常に注目し、手術検体における遺伝子変化が大腸癌の進展と相関することを明らかにしてきた。K-ras 遺伝子変異については、年齢と腫瘍の発生部位の両者に相関し、若年結腸癌において強い独立予後因子となること、特に stage III 大腸癌においてその傾向が強いことを明らかにし K-ras 経路の異常を抑制することが大腸癌の治療に特に重要である可能性を提唱してきた。(Onozato W et al. J Surg Oncol 2011)一方、大腸癌において PRL-3 の発現はリンパ節転移と相関し悪性予後に関わること、またその機序としては腫瘍マーカーである CEA, CA19-9 上昇を介している可能性があることも免疫染色を用いた臨床病理学的検討で明らかにしてきた。(Hatate K et al., Oncol Rep 2008) 両者の原発癌についての報告としては、前者は高度異形成ポリープ形成時に、後者はリンパ節転移に関連しているといわれているが、われわれの検討ではそれらに一致する結果も含まれていた。しかし、これらの研究はいずれも原発癌を用いた研究であり、治療の最も強い障壁となっている転移巣についての検討がこれまでにほとんど施行されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は K-ras 変異と PRL-3 遺伝子増幅について原発癌のみならず、転移癌におけるプロファイルを明らかにし詳細な臨床病理学的検討を行うことにより大腸癌の予後と遺伝子異常の間にどのような関係があるのかを明らかにし大腸癌の治療標的を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 原発癌約 100 例と大腸癌肝臓転移 44 例のホルマリン切片から薄切を行い、DNA, RNA を抽出する。分子プロファイルとしては K-ras 変異、PRL-3 遺伝子増幅について調べる。前者は、直接シーケンス法を行い exon1 (codon 12/13), exon (codon 61) の変異を同定した。一方、後者については TaqMan Probe を用いた Real time PCR による遺伝子増幅程度の定量を行った。原発巣および転移巣の遺伝子量をベータアクチンで補正し、非癌大腸粘膜の DNA 量で割ることでコピーナンバーを算出した。PRL-3 遺伝子ゲインに関しては2倍以上を陽性と定義して比較した。

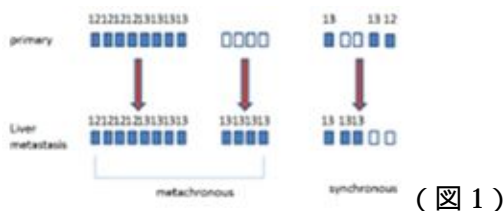
(2) K-ras 遺伝子変異については、転移巣と原発巣の比較を行い、原発癌の手術時の臨床病理学的因子や、初回手術からの予後について予後解析を行った。一方、PRL-3 遺伝子 gain については、原発巣における遺伝子ゲインと臨床病理学的因子との関連、予後については多変量予後解析を行った。一方、転移巣に関しては相当する原発巣との比較を行い、原発巣と転移巣の変化について明らかにした。

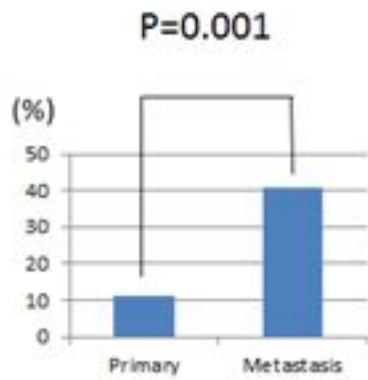
(3) PCR-3 遺伝子発現について原発巣・転移巣のホルマリン切片から mRNA を抽出し TaqMan probe を用いた遺伝子発現の定量を行い、PRL-3 ゲイン症例との比較を行った。また、一部の症例では PRL-3 分子の免疫染色を行い、非癌大腸粘膜、原発大腸癌病変、肝臓転移病変の染色性について比較検討した。

4. 研究成果

(1) K-ras 遺伝子変異の原発大腸癌における臨床病理学的関連を調べた研究では 60 歳以下の結腸癌でのみ予後的意義があることをかつて明らかにしていた。一方、原発癌においてはステージング因子などと明らかな相関は認めていなかった。この結果は、大腸癌の K-ras 変異が早期変化であり、adenoma carcinoma sequence の早い段階での変化であることと一致していた。

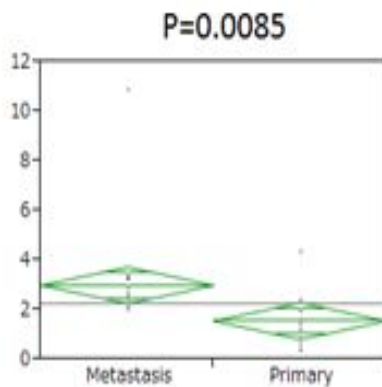
(2) K-ras 遺伝子変異は原発癌あるいは転移癌において、約 40% の遺伝子変異を認めた。しかし、これらは完全一致するものではなかった。(図 1)





(図 3)

特に肝転移で遺伝子ゲインが認められた症例では、原発巣とのゲインの程度に強い有意差を認めたが ($p=0.0085$)、遺伝子ゲインを認めなかった症例では有意差を認めなかった。(図 4)



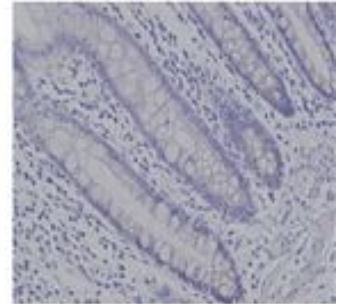
(図 4)

このことは、PRL-3 遺伝子ゲインが直接大腸癌の肝転移に関わっていることを示唆するものであり大腸癌の肝転移制御に極めて重要な働きをしていることを意味するものである。

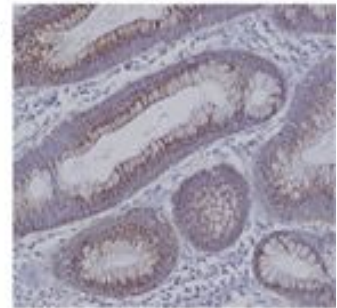
遺伝子ゲインをその高さと同発巣の stage で比較検討した。Stage I から肝臓転移した症例はわずか 3 例しかなかったが、そのうち 2 例が遺伝子ゲインを認めた。その 2 例のうち 1 例は遺伝子増幅のレベルが 10 倍を超えていた。このことは、激しい遺伝子増幅が起これば、stage I の段階で肝臓転移を起こす可能性を示唆する。このような症例では原発癌ではゲインは探知できないことも明らか

になった。免疫染色でも転移巣では細胞質に強く染色していたが、原発巣では弱い極性をもった染色が確認された。非癌粘膜ではまったく発現が確認されなかった。(図 5)

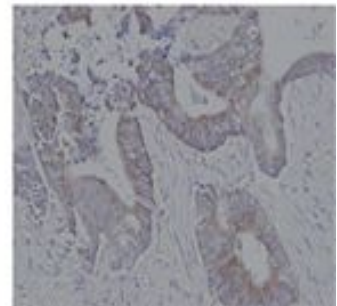
(a) Normal colon mucosa



(b) Center of primary tumor



(c) Liver metastasis



(図 5)

ホルマリン切片から mRNA を抽出して発現を調べてみると stage I 症例では全例発現を確認できた。つまり、遺伝子増幅のみが PRL-3 発現を決定しているわけではなく、他の要因で PRL-3 が過剰発現する場合肝臓転移が早い段階から形成されうることを示唆する。遺伝子ゲインと遺伝子発現が原発巣および転移巣でしっかりと認めるこの傾向は stage II でも見られるが、stage III/IV 症例になっていくと、崩れた傾向になっていった。このことは、stage III/IV 症例においてはより複雑な遺伝子異常のため、様々な

PRL-3 異常が生じており PRL-3 経路以外の異常でも癌が進展する機序が存在する可能性を示唆するものである。最近 PRL-3 遺伝子発現の亢進している症例では その下流の EGFR 経路の過活性が生じていることが報告されているが、したがって EGFR 経路の抑制が著効することが報告された。単独の変化が PRL-3 抑制薬や遺伝子ノックダウンの実験から大腸癌の肝転移においては PRL-3 を遺伝子標的とすることが有用である可能性を示唆される。われわれは本結果について Nakayama K et al, Clin Exp Metastasis, 2015 に publication した。

現在 PRL-3 抑制剤は臨床で使用できる段階になく、一方で大腸癌においては EGFR AB は臨床で使用可能である。よって、PRL-3 遺伝子の発現を指標にした新たな大腸癌治療が可能であると考え今後の臨床研究を展開したい。

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1件)

Nakayama N, Yamashita K, Tanaka T, Kawamata H, Ooki A, Sato T, Nakamura T, Watanabe M. Genomic gain of the PRL-3 gene may represent poor prognosis of primary colorectal cancer, and associate with liver metastasis. Clin Exp Metastasis 査読あり (in press)

Kawamata H, Yamahsita K, Kojo K, Ushiku H, Ooki A, Watanabe M. Discrepancies between the K-ras mutational status of primary colorectal cancers and corresponding liver metastases are found in codon 13. Genomics. 2015 May 28.査読有

doi: 10.1016/j.ygeno.2015.05.007. [Epub ahead of print]

[学会発表](計0件)

[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:

出願年月日:

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

渡辺 昌彦 (WATANABE , Masahiko)

北里大学・医学部・教授

研究者番号: 80146604