

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460423

研究課題名(和文)大腸がん先進部における脈管侵襲に及ぼす微小環境の分子病理機構

研究課題名(英文) Analysis of microenvironment for vascular and lymphatic invasion at invasive front of colorectal carcinoma

研究代表者

深澤 由里 (FUKASAWA, Yuri)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：90392331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト培養線維芽細胞および臍帯静脈内皮細胞にMMP7およびTGF-beta1を添加したところ、線維芽細胞、内皮細胞に共に変化がみられた。特に内皮細胞では、MMP7添加により内皮細胞の結合性低下が観察され、MMP7産生癌細胞周囲では癌細胞が脈管内に侵入しやすい可能性が示唆された。進行大腸癌のうち、早期に血行性転移をきたした症例についてMMP7と関連するマクロファージのマーカーであるMSR1の免疫染色を施行したところ、浸潤先進部、つまりMMP7の発現の高い部分において、MSR1が様々な様式で浸潤しており、MMP7陽性細胞が周囲間質の特にマクロファージと関連して脈管侵襲をきたすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In cell culture, by adding MMP7 and TGF-beta1, human cultured fibroblasts and umbilical vein endothelial cells were altered. In particular, the endothelial-endothelial junction decreased by MMP7. Therefore, it was suggested that cancer stroma around MMP7-producing tumor cells influenced the infiltration of tumor cell into vessels and promotes vascular invasion. We performed immunohistochemical staining of MSR1, a marker of macrophages associated with MMP7-related angiogenesis, for colorectal carcinoma with early hematogenous metastasis. The expression of MSR1 was observed in macrophages around cancer cells at invasive front of carcinoma. MMP7 expression of cancer cells was observed mainly in invasive front. Therefore, it was suggested that MMP7-positive cancer cells invade in vessels in association with the presence of macrophages.

研究分野：人体病理

キーワード：大腸癌

1. 研究開始当初の背景

がんの微小環境、すなわち、がん細胞とがん周囲の間質細胞との相互作用が、がん細胞の生存・増殖のみではなく、がんの浸潤・転移機構にも重要な因子である事が明らかにされてきた。実際、がん細胞だけでなく、がん間質も多彩であり、線維芽細胞の形態や分布、腫瘍血管の異常性や数の増加、炎症細胞浸潤の程度・分布の差異が観察される。そのため、がん・間質相互作用とは、in vivo でのみ出現する複雑な環境にある。

がんの微小環境において、がんの増大ならびに遠隔転移に重要な腫瘍血管とリンパ節転移の経路となるリンパ管は、がん治療における重要な標的である。腫瘍血管には、腫瘍病変特有の異常があり、新生血管の一部は、壁細胞の不連続性や欠損、不規則な分岐などがみられ、実際に、血管内皮細胞の遺伝子発現特異性が存在する。既存のリンパ管は、血管に比べ構造的にがん細胞が管内に侵入しやすいことが示唆されるが、実際の侵入機構は不明である。さらに、腫瘍辺縁には幼弱な新生血管・リンパ管も存在し、かような脈管は、正常の脈管に比べ、がん細胞の侵入を許しやすいことが示唆されるが、がん細胞の脈管への侵入・転移巢の形成機構は未だ不明である。

このような背景から、大腸がん浸潤先進部において、がん微小環境が強く影響していると考えられる tumor budding を示す浸潤性増殖部の間質と明瞭な腺管構造を示す圧排性増殖部の間質の発現解析を行ってきた。その結果、複数のケモカインや MMPs(matrix metalloproteinase)などの有力な候補分子が選出され、特に SDF-1 / CXCL12 の浸潤先進部での発現が、大腸がんの再発予測および生存に有意に関与することを明らかにした [Akishima-Fukasawa Y., Am J Clin Pathol., 2009]。これらの知見から、がん細胞が脈管内に侵入する過程において、がん細胞の細胞生物学的特徴だけでなく、脈管およびそれを支持する線維芽細胞や細胞外基質の存在が、がん細胞の脈管への侵入機構に大きく関わると考えている。また、早期大腸がんにおいて、がん細胞と間質細胞における形態学的所見 18 項目について観察し、その結果、浸潤先進部のがん細胞における MMP7 の発現程度と腫瘍胞巣内好中球浸潤、リンパ管侵襲像の有無が、独立したリンパ節転移予測因子であることを見出している

[Akishima-Fukasawa Y., Histopathology, 2011] 加えて、大腸がんの肝転移に関して、浸潤先進部におけるがん細胞の MMP7、E-cadherin、Dysadherin の発現が肝転移予測因子であるという結果も共同実験で明らかとし [Ochiai H.Fukasawa Y., Oncology , 2008]。がん細胞の脈管内への侵入機構を解明するためには、浸潤先進部の MMP7 発現がん細胞とその周囲の間質構成細胞の詳細な検討が必要であると考えている。MMP7

は、がん細胞の浸潤を促すプロテアーゼとしての働きだけでなく、間質細胞が分泌する VEGF の活性化や、線維増生にも関わるとの報告もある。MMP7 を発現するがん細胞が、がん間質の分子機構にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることは、がんの微小環境のリモデリング機構の解明に直結し、がん細胞の脈管内侵入機構・転移成立機構の理解に連なることが期待される。

2. 研究の目的

がん細胞の脈管内侵入機構を明確にすることは、がんの遠隔転移の予測及び治療に直結する。浸潤・転移には、がん細胞だけでなくがんの微小環境も大きく関与することが知られているが、実際のがん組織において、脈管及び支持組織がどのようにがん細胞の侵入に関与しているかは不明である。本研究では、大腸がんにおける浸潤・転移のホットスポットと考えられる浸潤先進部の MMP7 陽性 tumor budding 部周囲のがん間質の発現を、脈管構築、血漿浸透圧調節にかかわる分子を中心に検討することにより、がん細胞の脈管侵入機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) ヒト大腸癌組織の凍結標本、パラフィン包埋標本および初代線維芽細胞培養細胞の作製

ヒト大腸癌の手術検体より、診断に支障のない残余部分から癌の浸潤先進部が含まれる様にサンプリングを行い、凍結ブロック、中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック、メタノール固定パラフィン包埋ブロックを作製した。

2) ヒト大腸癌組織の凍結切片からの RNA 抽出

凍結標本から HE 染色および MMP7、Desmin の免疫染色標本作製し観察した後、その染色結果と形態学的な所見を合わせて、癌間質を以下の 2 種に分けて組織を回収した。浸潤先進部において、個細胞性に脱分化傾向を伴い間質内に浸潤し、かつ MMP7 発現を呈する癌細胞周囲の癌間質と、腺管構造を保持しつつ、圧排性に増殖し、MMP7 陰性を示す癌細胞周囲の癌間質を laser microdissection (LMD) 法で回収した RNA の回収は、微量な検体量のため、PicoPure RNA Isolation Kit (Takara 社) を用いて行った。

3) サンプル症例の病理診断および臨床病理学的因子のデータ回収

サンプル採取を行った全症例については、申請者あるいは研究分担者が「切り出し」および病理診断を行い、病理学的因子(腫瘍型、深達度、組織型、脈管侵襲の有無、リンパ節転移の有無など)の情報を収集した。脈管侵襲の判定は、最深部を含む代表切片において、

EVG 染色、Podoplanin や CD31、CD34 の免疫組織化学染色を加えて判定した。

4) 培養細胞（大腸癌細胞、線維芽細胞および内皮細胞）による MMP7 の影響の検討
Laser Microdissection による回収率が上がらず、凍結切片からの解析可能な RNA 回収量を得られなかった。そのため、RNA での解析が不可能であり、培養細胞を用いた検討に切り替えた。

大腸癌細胞である DLD-1、Colo320DM、Colo201、LoVo、WiDr を購入し、それぞれの MMP7 の発現を検討した。

ヒト大腸癌の手術検体より樹立した初代培養線維芽細胞およびヒト胎児線維芽細胞（WI-38）に MMP7 および TGF-beta1 を添加し、線維芽細胞の変化を検討した。また内皮細胞として、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用い、MMP7 と TGF-beta1 (Transforming Growth Factor beta-1) の影響を検討した。それぞれの細胞株に MMP7、TGF beta-1 を添加し、48 時間後、96 時間後の形態的な変化と蛋白抽出による蛋白発現の変化を調べた。

5) ヒト癌組織検体を用いた、血管およびリンパ管の数と血管新生因子の免疫組織化学的検討

大腸癌においては、血管新生や血流の増加を局所的に証明できる手法が確立していないが、乳房 Paget 病では超音波ドップラー法を用いた病変部の血流の増加が証明されていることから、乳房 Paget 病における血管数、リンパ管数と血管新生因子の発現を検討した。

6) 血行性転移をきたした大腸癌症例の組織検体を用いた免疫組織化学的解析

早期に血行性転移の代表である肝転移、肺転移をきたした大腸癌 15 例を用いて、MMP7、MMP7 を介した VEGF (vascular endothelial growth factor) の活性化に関わるとされる STAT3 およびマクロファージスカベンジャー受容体である MSR1 (macrophage scavenger receptor 1) の発現を検討した。

4. 研究成果

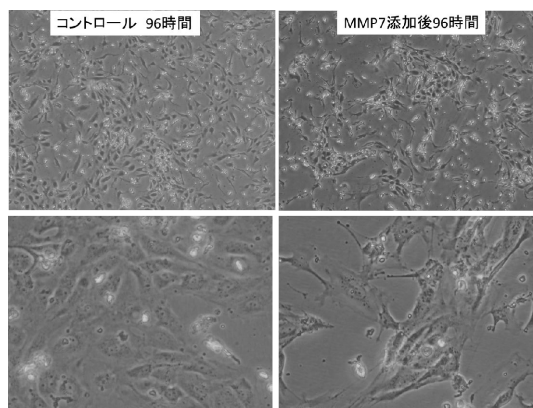
1) ヒト大腸癌組織の凍結切片からの RNA 抽出
ヒト大腸癌の手術検体 20 症例より浸潤部を切り出し、凍結切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色、MMP7 および Desmin の免疫染色を施行した。形態学的観察に加え、癌細胞における MMP7 の発現分布を観察し、MMP7 陽性癌細胞周囲の間質および MMP7 陰性癌細胞周囲の間質をそれぞれ選出した。Laser Microdissection 法により、目的の組織のみを回収し、RNA を抽出した。凍結切片において炎症が強くがん間質検体として除外しなければいけない検体や、脂肪組織が多く上手く凍結切片の作製できない症例が半数近く存在した。凍結切片が作製できた症例

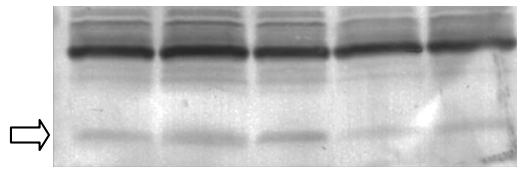
に関しても 20 枚以上の凍結切片から癌間質を切り出して回収したが、量的に微量であり定量的 RT-PCR 解析ができなかった。

2) 培養細胞を用いた線維芽細胞および内皮細胞に対する MMP7 の影響

ヒト大腸癌手術検体より、初代培養線維芽細胞を 4 種樹立した。その一つである初代線維芽細胞株 F17 とヒト胎児線維芽細胞（WI-38）に、それぞれ MMP7 および TGF-beta1 を添加し、48 時間後、96 時間後の形態学的変化および蛋白発現の差を検討した。形態学的には明らかな差はなかったが、Western blotting 法において、TGF-beta1 添加後の alpha-SMA (alpha-smooth muscle actin) の発現が、WI-38 では増加したが、初代培養株である F17 においては添加による変化がみられなかった。以上より、通常の線維芽細胞においては TGF-beta1 により活性化するが、癌間質から得られた活性化した線維芽細胞に関しては、それ以上の活性化はなかった。癌周囲にある線維芽細胞はすでに高度の活性化状態であることが示唆された。

MMP7 の内皮細胞への影響を観察するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に MMP7 および TGF-beta 1 を添加し、48 時間後、96 時間後の形態学的変化および蛋白発現の差を検討した。形態学的に MMP7、TGF-beta 1 添加後は内皮細胞のシート状増殖において間隙が目立ち、内皮細胞の結合性の減弱をみとめた。Western Blotting 法において、MMP7 添加細胞においては明らかな低下は証明できなかったが、TGF-beta1 添加により、内皮細胞間の結合に関わる分子である claudin-5 の発現低下が示された。以上より MMP7 および、TGF-beta1 による血管内皮細胞間の結合性低下が示された。それは癌間質において、これらの因子が存在することにより、癌周囲にある血管内皮細胞の結合性が低下する可能性が示唆され、さらには、それが血管内に癌細胞が侵入しやすい環境を作り出す可能性が示唆された。





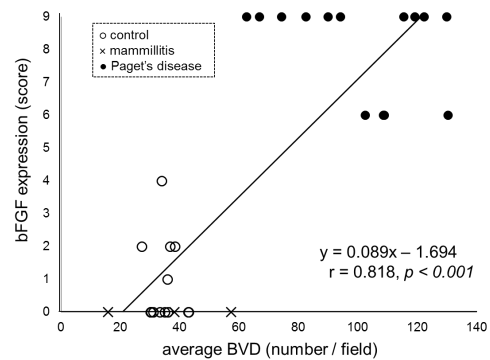
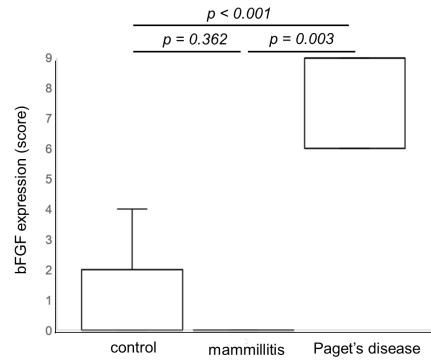
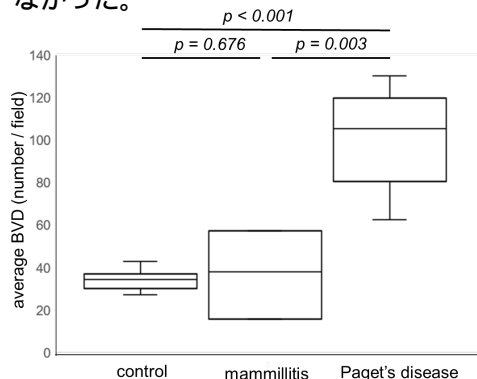
Cont MMP7 MMP7 TGFb1 MMP1
100ng 500ng
(claudin-5 →)

大腸癌細胞株である DLD-1、Colo320DM、Colo201、LoVo、WiDr を購入し、MMP7 の発現および MMP7 添加による検討を試みたが、Western Blotting 法や Cell Block による免疫組織化学的手法で検討を重ねたが、MMP7 の発現の評価が出来なかった。

3) ヒト癌組織における血管、リンパ管と血管新生因子の病理組織学的検討

大腸癌においては明らかな病変分布と血流における比較が困難であるため、超音波ドップラー法で血流の評価ができる乳房 Paget 病における血管新生について病理組織学的に解析した。乳房 Paget 病 14 例、コントロールとなる病変のない乳頭組織 14 例、乳頭炎として生検された組織 3 例を用い、血管新生因子として basic FGF (fibroblast growth factor), VEGF-A, MMP7, COX2 (Cyclooxygenase-2)、血管内皮細胞のマーカとして CD34、リンパ管マーカーとして Podoplanin、血管の構造を確認するため alpha-SMA の免疫染色を行った。

乳房 Paget 病においては、病変部で有意に血管数、リンパ管数の増加をみとめた。一方、コントロール群と乳頭炎の間には有意な結果はなかった。また血流の指標として、乳頭の面積における血管内腔面積の総和の割合を算出したところ、乳房 Paget 病においては、血管内腔面積の総和の乳頭面積当たりの割合はコントロール乳頭組織に比して有意に高かった。血管新生因子との関連においては、血管数および血管内腔面積の総和いずれも腫瘍細胞における basic FGF の発現との間に正の相関をみとめた。一方 VEGFA の腫瘍細胞における発現程度と血管数の増加は相関する傾向はあったが有意な差はなかった。MMP7、COX2 と血管数の増加との関連は統計学的には示されなかった。MMP7 陽性細胞は Paget 細胞には少数しか確認されなかった。



乳房 Paget 病における解析から、進行大腸癌においても同様の手法で検討を試みた。早期に肝臓、肺に転移した 15 例について MMP7、bFGF の免疫染色を施行した。bFGF は腫瘍細胞に広く陽性像をみとめ、比較的表層に近い腫瘍の方が発現が高い症例が多かったが、表層から深部まで一様に強陽性の腫瘍も存在した。脈管侵襲部、浸潤先進部の腫瘍細胞に発現が高いということはなかった。

4) 大腸癌浸潤先進部におけるマクロファージスカベンジャーレセプター陽性細胞の分布についての解析

MMP7 と血管新生の関係を調べる上で文献的に検索に挙げた STAT3 (signal transducers and activator of transcription 3) およびマクロファージスカベンジャーレセプターである MSR1 を免疫組織化学的染色にてその発現細胞の分布について観察した。STAT3 に関しては、数種類の抗体を購入し、免疫組織化学染色を試みたが、有意な染色と判定される像は得られなかった。MSR1 は腫瘍巣周囲に多く陽性細胞をみとめた。発現分布として、浸潤先進部に陽性細胞が多く分布するタイプ、腫瘍の中にも陽性細胞が入り込み表層から浸潤先進部まで一様に分布するタイプ、拡張した腺管の破綻部周囲の肉芽形成領域に集簇するタイプ、全体として発現細胞が少ないタイプと 4 タイプに分かれた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1件)

(1)深澤 由里、本間 尚子、緒方 秀昭、赤坂 喜清、三上 哲夫.乳房 Paget 病における血管新生メカニズムの分子病理学的解析. 第105回日本病理学会総会.2016年5月14日. 仙台国際センター(宮城県仙台市).

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

深澤 由里 (FUKASAWA, Yuri)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：90392331

(2)研究分担者

石川 由起雄 (ISHIKAWA, Yukio)
東邦大学・医学部・客員教授
研究者番号：30276894

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし