

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462044

研究課題名(和文) 大腸癌浸潤・転移におけるhCG の機能解析とその臨床応用

研究課題名(英文) Chorionic gonadotropin beta modulates epithelial-mesenchymal transition in human colorectal carcinoma metastasis

研究代表者

本間 重紀 (Homma, Shigenori)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：30533674

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)：癌細胞の転移能獲得には上皮間葉系移行(EMT)が重要であり、その代表的な分子にTGF β がある。我々はTGF β と発生学的に共通の塩基配列を有するChorionic gonadotropin(hCG)に注目した。大腸癌の切除標本におけるhCG高発現群は臨床病理学的悪性度と相関し、予後不良であった。また、大腸癌のhCG高発現株による検討では、hCG高発現により浸潤能が増加し、EMT PCR Arrayを用いた解析では、Twist1、Snail2が過剰発現していた。さらに、マウスの腹膜播腫モデルにおいても、hCG過剰発現大腸癌細胞株は、有意に腫瘍形成能が高く、EMTへの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine the biological role of hCG associated with EMT and its clinical significance in colorectal cancer(CRC).

Immunohistochemically, hCG was positively identified in 13 of 80 tumors (16.3%), and was correlated with histological grade ($p = 0.031$), lymph node metastasis ($p = 0.021$) and lymphatic invasion ($p = 0.011$) and unfavorable patients outcome ($p = 0.021$) compared to the group of hCG negative expression. Stably overexpressing hCG demonstrated significantly increased invasion ($p < 0.05$), and microarray and subsequent PCR analysis identified upregulation of Snail 2 and Twist 1 genes associated with hCG overexpression. Furthermore, Stably overexpressing hCG demonstrated significantly increased tumor growth in mouse peritoneal metastasis model ($p < 0.005$). hCG plays an important role in mediating EMT and metastatic behavior in CRC.

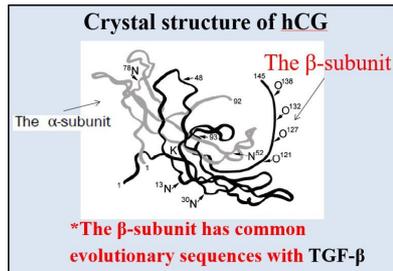
研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 EMT 浸潤・転移 hCG

1. 研究開始当初の背景

細胞の転移能獲得には上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) が重要であり、EMT を誘導する代表的な分子に TGFβ がある。当研究チームは TGFβ と発生学的に共通の塩基配列を有する Chorionic gonadotropinβ (HCGβ) に注目した (図 1)。

図 1



HCGβ は本来絨毛性組織で産生されるが、低分化の消化器癌における産生も報告され、その発現は病理学的悪性度が高く、その予後も不良とされている。

2. 研究の目的

HCGβ の切除組織での発現は、大腸癌においても予後不良とされている。また、術前および術後の血中 HCGβ の濃度の上昇も大腸癌において、予後不良マーカーとして、以前より注目されてきた。しかしながら、どの世界の研究室も TGFβ と発生学的に共通の塩基配列を有する HCGβ と EMT への分子生物学的機序を現在、明らかにできていない。そこで、当研究グループは、大腸癌における HCGβ 発現の生物学的意義および EMT、TGFβ への関与につき、検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞株に HCGβ を過剰発現することで癌細胞悪性度 (増殖能、浸潤能、遊走能、抗癌剤感受性) の変化、浸潤や EMT に関連する遺伝子変化 (Twist1, Snail2, TGFβ, fibronectin 1, E-cadherin 等) を網羅的に PCR array にて解析し、癌細胞における HCG 発現の意義と遺伝子変化を明らかにする。

HCGβ の過剰発現大腸癌細胞株は、大腸癌細胞株 (WIDR, CaCo2) から HCGβ の遺伝子を取り出し、レンチウイルスベクターを使用したサブクローニングにて、樹立する。コントロール大腸癌細胞株については、GFP の遺伝子を導入する。

(2) HCGβ を標的とした cancer immunotherapy に向け、癌移植モデル (皮下、腹膜播種モデル) において、腫瘍形成能を比較する。具体的には、HCGβ の過剰発現細胞株での癌移植モデルとコントロール大腸癌細胞株での癌移植モデルでの腫瘍形成能および、組織学的検討を比較する。

(3) 大腸癌切除検体における抗 HCGβ 抗体による免疫組織学的検討および、臨床病理学的検討を行う。具体的には、臨床病理学的因子や術後の予後と切除組織での HCGβ 高発現との比較検討を行う。

本知見より、どのような症例が HCGβ の分子標的治療が実際に有効であるかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

当研究グループは HCGβ 過剰発現大腸癌細胞株 (LoVo-HCGβ, HCA7-HCGβ) をレンチウイルスベクターを用いて樹立することに成功し (図 2)、HCGβ 遺伝子導入により、大腸癌細胞の形態が membrane ruffling を引き起こすことを明らかにした (図 3)。

図 2

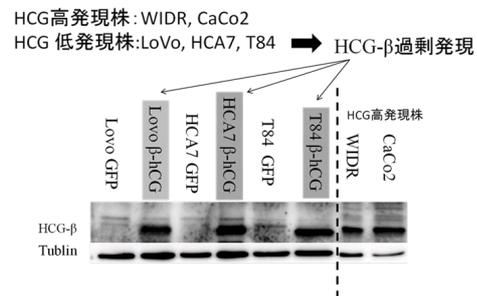
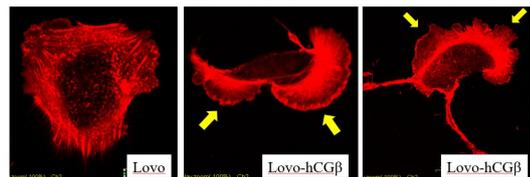
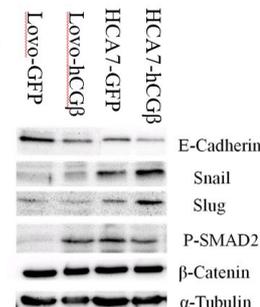


図 3



HCGβ 過剰発現大腸癌細胞株とコントロール大腸癌細胞株 (LoVo-GFP, HCA7-GFP) の増殖能、浸潤 (invasion assay) の比較検討では、増殖能には有意差を認めなかったが、HCGβ 過剰発現大腸癌細胞株はコントロール群と比較し、有意に浸潤能が高く (P < 0.005)、Western Blot 法にて E-cadherin の減少、Snail 2 の増加、Smad 2 のリン酸化を認めた (図 4)。

図 4



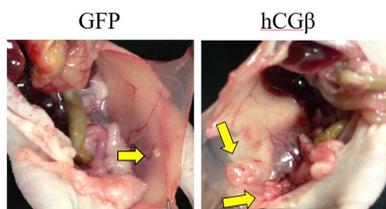
また、HCGβ 過剰発現により誘導された EMT 遺伝子の網羅的解析 (EMT PCR Array) では、HCGβ 過剰発現大腸癌細胞株は、Twist1 (3.6 倍)、Snail 2 (2.1 倍)が過剰発現しており、HCGβ 過剰による EMT への関与が示唆された。

図 5

Gene Symbol	Description (gene name)	Fold Regulation
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	2.14
COL3A1	Collagen, type III, alpha 1	3.03
FN1	Fibronectin 1	4.38
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	2.02
SNAI2	Snail homolog 2	2.11
TWIST1	Twist homolog 1	3.60
GSC	Goosecoid homeobox	-3.10
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	-2.42
KRT7	Keratin 7	-2.67
MMP7	Matrix metalloproteinase 2	-3.00
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	-2.72

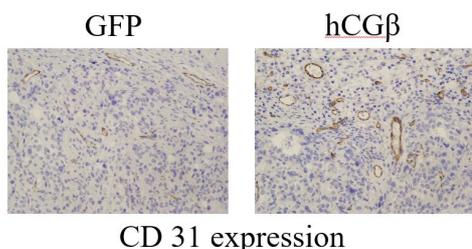
また、動物実験として、ヌードマウスに HCGβ 過剰発現大腸癌細胞株を腹腔内注射 (腹膜播種モデル) し、コントロール大腸癌細胞株との腫瘍形成能の比較では、HCGβ 過剰発現大腸癌細胞株は、コントロール大腸癌細胞株と比較し、有意に腫瘍形成能が高かった (図 6 P<0.005)。

図 6



また、その腫瘍組織は低分化の腫瘍から形成され、TGFβ の血管新生を示す血管内皮細胞 CD31 の高発現を認め、HCGβ 過剰発現と EMT への関与が示された (図 7)。

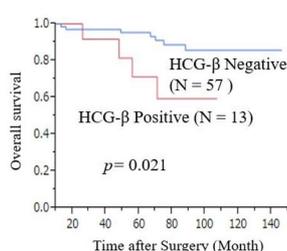
図 7



CD 31 expression

さらに、大腸癌切除検体においても、免疫組織学染色にて、HCGβ が高発現群は予後不良であった (図 8)。

図 8



これらの結果により、免疫組織化学染色にて、HCGβ が陽性となる低分化大腸癌は、EMT による転移から予後不良となる可能性があり、HCGβ を分子標的とした新たな治療の発展が期待されることを報告した (論文投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

川俣太 本間重紀 小丹枝裕二 西原広史 吉田雅 高橋典彦 神山俊哉 武富紹信: 大腸癌浸潤・転移における Chorionic gonadotropin-β の機能解析とその臨床応用: 第 25 回日本消化器癌発生学会総会 研究奨励賞発表セッション、ホテル日航福岡(福岡市)、2014 年 11 月 13 日

小丹枝裕二 本間重紀 西原広史 川俣太 皆川のぞみ 川村秀樹 高橋典彦 武富紹信: 大腸癌における tumor budding と chorionic gonadotropin-β 発現の検討: 第 114 回日本外科学会定期学術集会 ポスター、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都市)、2014 年 4 月 4 日

川俣太 本間重紀 西原広史 吉田雅 高橋典彦 神山俊哉 武富紹信: 大腸癌浸潤・転移における Chorionic gonadotropin-β の機能解析とその臨床応用: 第 68 回日本消化器外科学会総会 ワークショップ、シーガイアコンベンションセンター(宮崎市)、2013 年 7 月 18 日

Kawamata F, Homma S, Nishihara H, Takahashi N, Kamiyama T, Taketomi A.: Chorionic gonadotropin-β modulates epithelial-mesenchymal transition in human colorectal carcinoma metastasis. The American Society of Colon and Rectal Surgeons, ASCRS Annual Meeting, Phoenix Convention Center (Phoenix USA), 2013.4.28

〔その他〕

当研究結果は、北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 のホームページにて掲載予定である。

<http://www.surg1-hokudai.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

本間 重紀 (HOMMA SHIGENORI)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 30533674

(2)研究分担者

西原 広史 (NISHIHARA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任准教授
研究者番号： 50322805

高橋 典彦 (TAKAHASHI NORIHIKO)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号： 30399894

蒲池 浩文 (KAMACHI HIROFUMI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号： 60374237

(3)連携研究者

武富 紹信 (TAKETOMI AKINOBU)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 70363364

川村 秀樹 (KAWAMURA HIDEKI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任研究
講師
研究者番号： 70645960

(4)研究協力者

川俣 太 (KAWAMATA FUTOSHI)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号： なし