

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860289

研究課題名(和文)大腸がんリンパ節転移決定因子であるbuddingの分子機構解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of budding formation in colon cancer metastasis.

## 研究代表者

国田 朱子(Kunita, Akiko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50608768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんリンパ節転移に関するbuddingの浸潤機構解明を目的としてbuddingを形成した大腸がん検体の選定を行った。budding部位においてpodoplaninの発現亢進と間質のactive fibroblastにおけるpodoplanin亢進が認められた。一方in vitroおよびin vivoのbuddingモデルの構築に取り組んだ。構築したモデル系を使用しがん細胞におけるpodoplaninの発現と間質のfibroblastのmicroRNAの発現により浸潤能が亢進することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the mechanisms of budding formation in colon cancer lymph node metastasis, colon cancer specimens which shows budding were collected, and examined the metastasis-related molecule; podoplanin expression by immunohistochemistry. Podoplanin was expressed at the budding site and active fibroblast.

研究分野：実験病理学

キーワード：大腸がん 浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

大腸がんの罹患率は本邦では近年急激に増加し、大腸がんの発癌および悪性化の機構を解明することは大腸がん征圧のための重要な課題である。中でもリンパ節転移は大腸がん患者の予後を大きく決定することからリンパ節転移機構の解明が急務である。本研究では近年新たに大腸がんのリンパ節転移決定因子であると報告された budding (簇出) の浸潤機構と我々ががん転移関連因子として報告した podoplanin との関連について検討した。budding とは腫瘍先進部において低分化な癌細胞が個々に散在性に、あるいは5個未満の癌細胞が小塊状、索状細胞群を形成して間質へ散布するように認められる浸潤病巣であり、治療方針決定のための指標を渴望していた本邦の臨床医により報告された (Morodomi et al 1989)。その後 budding と臨床的因子との関連を示す報告が多くなされ、大腸がんの新たな悪性度指標として注目を集めている。一方我々は podoplanin がマウス実験的転移モデル系において有意に癌転移を誘導することを見出した。(Kunita et al Am J Pathol 2007)。また podoplanin による癌転移は抗 podoplanin 中和抗体投与により顕著に抑制され、転移阻害剤のターゲットとして podoplanin が有用である可能性が示された。

## 2. 研究の目的

本研究では近年新たに大腸がんのリンパ節転移決定因子であると報告された budding (簇出) の浸潤機構を解明することを第一の目的とした。budding の分子機構を解明することにより大腸がんの病態解明、治療法の開発へと展開していけるものと考えられる。具体的には以下の3点を目的とした。

(1)budding 領域における podoplanin の発現及び局在の検討

(2)budding モデルの構築

(3)(2)のモデルを用いた podoplanin を標的とした budding 形成大腸がんの治療への応用

## 3. 研究の方法

(1) 大腸がん budding 領域における podoplanin の発現

大腸癌生検及び手術検体より得られた大腸癌組織約 100 検体を用い budding の検索を行った。次に抗 podoplanin 抗体である D2-40、NZ-1、または LpMab-7 を用いて budding 陽性大腸癌組織の免疫組織染色を行った。D2-40 は病理で汎用されている抗体であり、リンパ管を特異的に検出できるが、腫瘍における感度は NZ-1 クローンの方が高い (Kunita et al Am J Pathol 2011)。さらに、本研究課題進行中に新たに樹立された LpMab-7 クローンをを用いて自動免疫染色装置 (ペンタナ XT ベンチマーク、ロシュ) を使用し免疫組織染色を

行った。

(2)budding モデルの構築

in vivo モデル

大腸癌細胞株をヌードマウスへ皮下移植し、形成された腫瘍のパラフィンブロックを作製し、HE 染色を行い形態観察により budding と似た構造を持つ組織を検索した。

ex vivo モデル

線維芽細胞株 (MRC-5) をコラーゲン及びマトリゲルで包埋したゲルの上に癌細胞株を播種し 5-10 日後にゲルをホルマリン固定しパラフィンブロックを作製し、HE 染色を行った。

(3)podoplanin ノックアウト細胞の樹立と浸潤能検討:

CRISPR-Cas9 システムを用いて podoplanin を内在性に発現する癌細胞株の podoplanin をノックアウトした細胞株 (PDPN-KO) を樹立した。樹立した細胞株を用いて (2) で構築したモデルで親株との浸潤能の比較検討を行った。

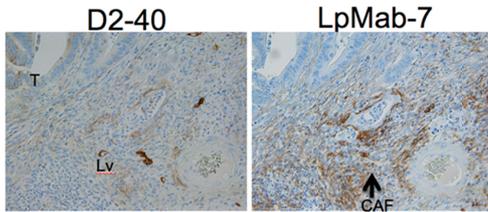
## 4. 研究成果

(1) 大腸がん budding 領域における podoplanin の発現

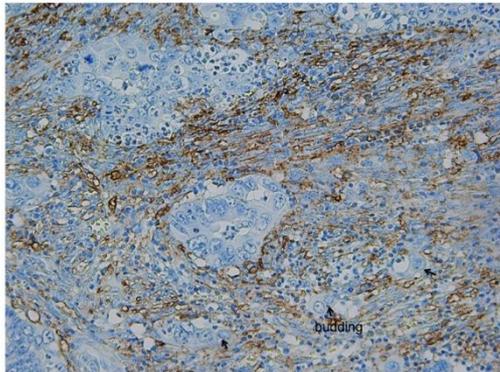
まず始めに大腸癌組織における podoplanin の発現を 3 種の抗体 (D2-40、NZ-1、LpMab-7) を用いて行った。D2-40 はリンパ管 (Lv) で強陽性、CAF (Cancer-associated fibroblast) 及び腫瘍部 (T) で弱陽性であった (図 1, T)。一方 LpMab-7 は腫瘍部では陰性であり CAF 及びリンパ管では強陽性でありバックが D2-40 よりも低く NZ-1 と LpMab-7 の比較では LpMab-7 の染色性がより高かった。LpMab-7 は 3 種類の中で最も感度、特異度が高かったことから本研究課題では以後 LpMab-7 を用いた検討を行った。

本研究課題申請時では抗 podoplanin 抗体として汎用されていた D2-40 を用いた免疫組織染色を行い大腸癌の budding 部位では D2-40 陽性であったことから budding 部位の癌細胞における podoplanin の発現に着目した検討を行う計画であったが、本研究課題ではより感度、特異度の高い新規抗体 LpMab-7 を用いた検討を行った結果、大腸癌の癌細胞においては budding 部位も含め陰性であることが確認された。一方で、budding 周囲の CAF では podoplanin の高い発現が認められたことから budding 形成における podoplanin 陽性 CAF の機能に着目した検討を行うことにした。

budding を形成した大腸癌 18 例において podoplanin の発現を検討したところ budding 領域ではいずれも陰性であった (図 2、矢印) が budding 周囲の CAF においてはいずれも強陽性像が認められた。



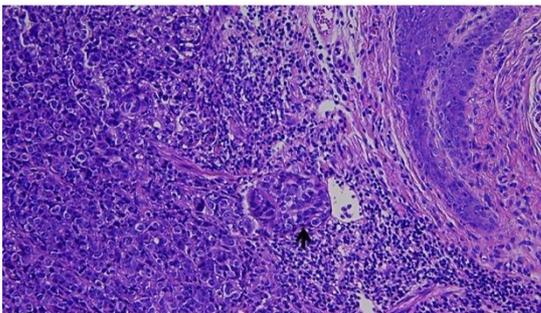
(図1) 抗 podoplanin 抗体 D2-40 と LpMab-7 の染色性の比較



(図2) 大腸癌の budding 周囲の CAF における podoplanin の発現

#### (2) budding モデルの構築 in vivo モデル

大腸癌細胞株を皮下へ移植する事により xenograft を作製し HE 染色を行い budding 様の形態を検索したところ 10 種類の細胞株の検討で 1 種類の細胞株で budding 様の形態が認められた (図3、矢印)。腫瘍部から離れた部位に少数の癌細胞からなる細胞塊が認められた。今後本モデルを用い、抗 podoplanin 抗体や低分子化合物を用いたスクリーニングを行い budding 形成を抑制する薬剤への展開を行う。



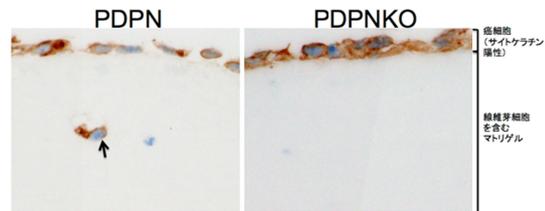
(図3) budding モデル

#### ex vivo モデル

癌細胞が三次元的に散在性にゲル (コラーゲン+マトリゲル) の中へと浸潤するモデルを構築した。ゲル中には線維芽細胞株である MRC-5 を包埋した。

#### (3) podoplanin ノックアウト細胞の樹立と浸潤能検討

CRISPR-Cas9 システムにより podoplanin 発現癌細胞の podoplanin ノックアウト細胞 (PDPNKO) を樹立した。これまで shRNA ベクターを導入した検討を行ってきたが、本システムにより、高率に podoplanin の発現を抑制することに成功した。(2) で構築したモデルを用いて PDPNKO の浸潤能の検討を行ったところ、親株 (PDPN) に比較し PDPNKO 細胞は浸潤能の低下が認められた (図4)。



(図4) PDPNKO 細胞の樹立と浸潤能の検討

#### (4) まとめ

大腸癌の budding 部位の癌細胞においては podoplanin の発現は認められないが budding 周囲の CAF において高い podoplanin の発現が認められ、podoplanin が budding 形成を支持する可能性が示唆された。今後 CAF における podoplanin 発現誘導機構と budding 形成における機能について検討を進める必要がある。

#### 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13件)

Yasuda T, et al. (員数 27:9 番目), Oncogenic DUX4 fusions in B-cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults., Nat Genet. 2016, May; 48(5):569-74, doi: 10.1038/ng.3535. 査読あり

Matsusaka K, et al. (員数 13:8 番目), Tumor Content Chart-Assisted HER2/CEP17 Digital PCR Analysis of Gastric Cancer Biopsy Specimens., PLoS One. 2016, Apr 27;11(4):e0154430.doi:

10.1371/journal.pone.0154430. eCollection 2016. 査読あり  
Saju P, *et al.* (員数 14:9 番目), Host SHP1 phosphatase antagonizes Helicobacter pylori CagA and can be downregulated by EBV., *Nat Microbiol.* 2016, doi:10.1038/nmicrobiol.2016.26, 査読あり  
Ikemura M, Kunita A, Miwa Y, Jimbo K, Mori K, Seto Y, Fukayama M. Gut wall replacing type of gastrointestinal stromal tumor presenting as a perforation of the ileal diverticulum. *Pathol Res Pract* 2015, Nov;211(11):892-5. doi: 10.1016/j.prp.2015.05.001. 査読あり  
Kato Y\*, Kunita A\*, *et al.* (員数 9:2 番目、\*; equal contributor), The chimeric antibody chLpMab-7 targeting human podoplanin suppresses pulmonary metastasis via ADCC and CDC rather than via its neutralizing activity. *Oncotarget.* 2015 Nov 3;6(34):36003-18. doi: 10.18632/oncotarget.5339. 査読あり  
Abe H, Hayashi A, Kunita A, Sakamoto Y, Hasegawa K, Shibahara J, Kokudo N, Fukayama M. Altered expression of AT-rich interactive domain 1A in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015, 8:2763-2770. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440091/> 査読あり  
Maeda D, *et al.* (員数 13:4 番目), Hunner-Type (Classic) Interstitial Cystitis: A distinct inflammatory disorder characterized by pancystitis, with frequent clonal B cells and epithelial denudation., *PLoS One.* 2015, Nov 10 (11) doi: 10.1371/journal.pone.0143316. 査読あり  
Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Isogai M, Hibiya T, Ushiku T, Takada K, Fukayama M. Profiling of Virus-encoded MicroRNAs in Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma and their Roles in Gastric Carcinogenesis. *J Virol* 2015, 89(10):5581-91. doi:10.1128/JVI.03639-14. 査読あり  
Tanaka M, Suzuki H. I, Shibahara J, Kunita A, Isagawa T, Yoshimi A, Kurokawa M, Miyazono K, Aburatani H, Ishikawa S, Fukayama M. EVI1 oncogene promotes KRAS pathway through suppression of microRNA-96 in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene* 2014. May 8;33(19):2454-63. doi:10.1038/onc.2013.204. 査読あり  
Fantozzi A, *et al.* (員数 11:5 番目), VEGF-Mediated Angiogenesis Links EMT-Induced Cancer Stemness to Tumor Initiation. *Cancer Res* 2014 Mar 1;74(5):1566-75. doi:

10.1158/0008-5472.CAN-13-1641. 査読あり  
Kikuchi, Y\*, Kunita, A\*, *et al.* (員数 16:2 番目、\*; equal contributor), The Niche Component Periostin Is Produced by Cancer-Associated Fibroblasts, Supporting Growth of Gastric Cancer through ERK Activation. *Am J Pathol* 2014, 184 (3), 859-870. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.012. 査読あり  
Sasaki, Y, Sasaki, T, Kawai, T, Morikawa, T, Matsusaka, K, Kunita, A., Kume, H, Aoki, I, Homma, Y, and Fukayama, M. HER2 protein overexpression and gene amplification in upper urinary tract urothelial carcinoma-an analysis of 171 patients, *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7 (2), 699-708 . <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925916/> 査読あり  
Nakaya T, Kikuchi Y, Kunita A, Ishikawa S, Matsusaka K, Hino R, Aburatani H, Fukayama M. Enrichment of stem-like cell population comprises transformation ability of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A for non-transformed cells. *Virus Res* 2013, 174 (1-2), 108-115 . doi: 10.1016/j.virusres.2013.03.009. 査読あり

〔学会発表〕(計 17 件)

国田朱子、新規抗ポドプラニンキメラ抗体による抗腫瘍効果の検討、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 1 日-12 月 4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

国田朱子、マウス胃癌モデルを用いた LMP2A の機能解析、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日-10 月 10 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

国田朱子、新規抗ポドプラニンキメラ抗体による転移抑制効果の検討、第 24 回日本がん転移学会学術集会総会、2015 年 7 月 23 日-7 月 24 日、シティプラザ大阪(大阪府大阪市)

阿部浩幸、EBV 関連胃癌における miRNA 発現と exosome を介した細胞外分泌、第 12 回 EB ウイルス研究会、2015 年 7 月 20 日-7 月 21 日、ビッグハート出雲(島根県・出雲市)

小林敦、分化型早期胃癌における microRNA 発現とリンパ節転移リスク、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

国田朱子、Epstein-Barr Virus-encoded MicroRNAs in Gastric Carcinoma, 第 5 回新学術領域発がんスパイラル国際シンポジウム、2015 年 2 月 26-27 日 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

Komai M, Identification of Interleukin

13 Receptor alpha 2 (IL13R 2) as a novel marker of human melanoma、Joint International Symposium on TGF-B Family and Cancer、2015年1月12-13日 筑波大学(茨城県・つくば市)

国田朱子、Leptin receptor expression and loss of SOCS3 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma (EBVaGC)、第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25-27日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

国田朱子、肺腺癌腫瘍間質におけるmiR-21の発現、第33回分子病理学研究会宮城蔵王シンポジウム、2014年7月25-26日 宮城蔵王ロイヤルホテル(宮城県・蔵王町)

Kunita A, Expression of miR-21 in cancer associated fibroblasts in lung adenocarcinoma, AACR Annual Meeting 2014 2014年4月5日-9日 San Diego Convention Center, San Diego(米国)

国田朱子、Epstein-Barr Virus-encoded MicroRNAs in Gastric Carcinoma、2014年2月10-11日 京王プラザホテル札幌(北海道・札幌市)

Abe H, ARID1A expression loss is a late stage event in tumor progression of hepatocellular carcinoma、2014年3月1日-7日 San Diego Convention Center, San Diego(米国)

Kikuchi Y, Periostin, A Niche Component, Is Produced By Cancer-Associated Fibroblasts, Supporting Growth Of Gastric Cancer Through ERK Activation, The 4<sup>th</sup> ICA-AACR Special Joint Conference、2013年12月16-18日、Tokyo Bay Maihama Hotel Club & Resorts(千葉県・浦安市)

国田朱子、腫瘍浸潤先端部におけるpodoplaninの発現、第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3-5日 パシフィコ横浜 神奈川県・横浜市)

Kunita A, Podoplanin expression at the tumor invasive front、AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research、2013年9月18日-22日、National Harbor、(米国)

国田朱子、腫瘍浸潤先端部におけるポドプラニンの発現解析、がん若手ワークショップ 2013年9月4-7日 蓼科グランドホテル滝の湯(長野県茅野市)

森田茂樹、肺腺癌の腫瘍間質におけるmiR-21の発現に関する検討、第102回日本病理学会総会 2013年6月8日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

阿部浩幸、肝細胞癌におけるARID1A発現消失は癌進展過程の後期の変化である、第102回日本病理学会総会 2013年6月8日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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  
<http://pathol.umin.ac.jp/index.shtml>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

国田 朱子(KUNITA, Akiko)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50608768

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

森川 鉄平(MORIKAWA, Teppei)  
東京大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80451772

##### (4) 研究協力者

竹下 貴三子(TAKESHITA, Kimiko)  
東京大学・医学部・学術支援職員  
研究者番号：未取得

佐久間 慶(SAKUMA, Kei)  
東京大学・医学部・技術専門職員  
研究者番号：未取得