

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861220

研究課題名(和文)形態形成シグナル活性はstage II大腸癌予後予測のマーカーとなるか？

研究課題名(英文)Is the activity of morphogenesis-related signaling pathways useful to predict survival in stage II colorectal cancer?

研究代表者

秋吉 高志 (AKIYOSHI, Takashi)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・その他

研究者番号：50625598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Stage II/III大腸癌組織を用いて核内Notch1/3の発現をNotchシグナル活性のマーカーとして免疫染色を行い、核内Notch3発現がStage II大腸癌の再発予測因子であることを明らかにした。また、clinical Stage II/III直腸癌の術前内視鏡採取生検組織よりマイクロアレイ発現解析を行った。Wntシグナルのsingle-sample GSEAスコアを算出した結果、Wntシグナル活性の高い群が低い群より予後良好の傾向が認められた。以上より、形態形成シグナルのうちNotchシグナルとWntシグナル活性はStage II大腸癌の予後予測に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the nuclear Notch1 and Notch3 protein expression by immunohistochemistry as a surrogate marker of activated Notch signaling in stage II and III colorectal cancer, and showed that nuclear Notch3 expression was strongly associated with distant relapse-free survival in stage II colorectal cancer. Biopsy samples were taken from patients with clinical stage II and III rectal cancer during colonoscopic examinations, and we isolated total RNA from cancer cells using laser capture microdissection. Gene expression microarray analysis was performed, and Wnt activity levels were evaluated by single-sample Gene Set Enrichment Analysis. The high Wnt activity levels tended to be inversely associated with recurrence. These findings suggest that the activity of Notch and Wnt signaling are useful in predicting survival in stage II colorectal cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 形態形成シグナル

1. 研究開始当初の背景

Stage II 大腸癌の根治切除後の5年生存率は大腸癌研究会のデータによると81.2%である。Stage IIIと異なり、stage IIにおける術後補助化学療法の有用性は明らかではない。術後補助化学療法を行う患者を選択するために、stage IIにおける予後不良因子(バイオマーカー)の研究が世界中で盛んに行われてきた。しかし、多くの候補バイオマーカーの中で現在臨床に広く応用されているのはmicrosatellite instability (MSI)のみである。

大腸癌のおよそ90%ではAPCやCTNNB1の変異により形態形成シグナルの一つであるWntシグナルが恒常的に活性化している。また、大腸癌における形態形成シグナル(Wnt、Hedgehog、Notch)の間には密接なクロストークが存在することがin vitroのデータで報告されている(Akiyoshi T et al. Gut 2006, Akiyoshi T et al. Gastroenterology 2008)。しかしながら、これら形態形成シグナルの活性がstage II大腸癌の予後予測のマーカーとなるかは明らかではない。

2. 研究の目的

大腸癌組織における形態形成シグナル活性を標的遺伝子の発現によって解析し、大腸癌組織における各形態形成シグナル活性の相関関係と予後との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌におけるNotchシグナル活性と予後の相関を明らかにするため、pathological Stage II/III大腸癌根治切除305症例において、核内Notch1および核内Notch3発現をNotchシグナル活性のsurrogate markerとして、免疫染色を行う。

(2) clinical Stage II/III直腸癌106症例(test set62症例、validation set 44症例)において、術前に内視鏡で採取した癌部の新鮮凍結切片より、laser capture microdissectionにより癌細胞のみを抽出し、GeneChip PrimeView™ Human Gene Expression Arrayを用いて網羅的なmRNA発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) 核内Notch1と核内Notch3は大腸癌のそれぞれ37%、38%に強発現していた(図1、図2)。核内Notch1と核内Notch3発現はともに再発と有意に相関していた(各 $p=0.0311$ 、 $p=0.0053$)。多変量解析により、核内Notch3発現($p=0.027$)、リンパ節転移($p=0.004$)、静脈侵襲($p=0.002$)が遠隔無再発生存(distant relapse-free survival)の有意な予測因子として抽出された。サブグループ解析により、核内Notch3発現はstage IIの強力な予後予測因子であった($p=0.006$)が、stage IIIでは有意な予測因子として抽出されなかった(図3、図4)。

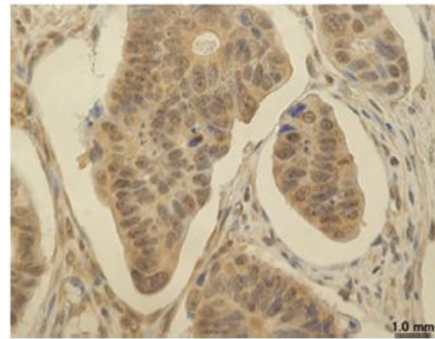


図1. 核内 Notch3 陽性症例

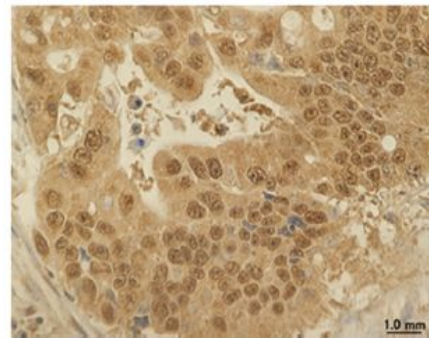


図2. 核内 Notch1 陽性症例

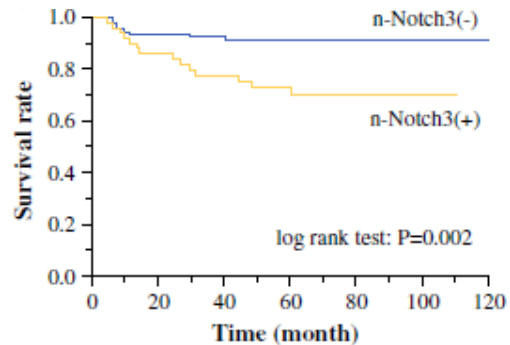


図3. Stage IIにおける核内 Notch3 発現別の遠隔無再発生存曲線

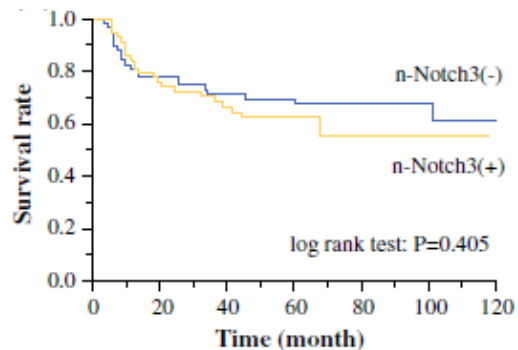


図4. Stage IIIにおける核内 Notch3 発現別の遠隔無再発生存曲線

(2) 十分な予後観察期間(中央値5年3か月)のある test set のサンプルを用いて、Wnt シグナル 特異的 遺伝子セット (Cell 111,241-250,2002) および 腸 幹 細胞 (intestinal stem cell:ISC)特異的遺伝子セット (Cell Stem Cell 8,511-524,2011) の single sample GSEA スコアを各症例ごとに計算し、Wnt シグナル活性の高い群(Wnt-high group: n=31)と Wnt シグナル活性の低い群 (Wnt-low group: n=31)、および stem cell 活性の高い群(ISC-high group: n=31)と低い群(ISC-low group: n=31)に分類して予後を解析した(図 5、図 6)。結果、無再発生存期間(relapse-free survival)は Wnt-low group 及び ISC-high group で不良な傾向があったが、統計学的な有意差はなかった(各 p=0.0674、p=0.1013)。

pN(+)を除く 39 例で解析した結果、Wnt シグナル活性の高い群(Wnt-high group: n=21)は Wnt シグナル活性の低い群(Wnt-low group: n=18)に比べてやはり予後が良好な傾向が見られた(p=0.0552)。また、ISC-high group(n=17)で ISC-low group(n=22)に比べ予後不良な傾向が見られた(p=0.1736)。

validation set については現時点では観察期間が短く、今後予後解析を行う予定である。

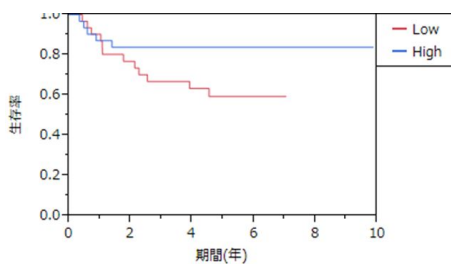


図 5.Wnt シグナル活性による無再発生存曲線

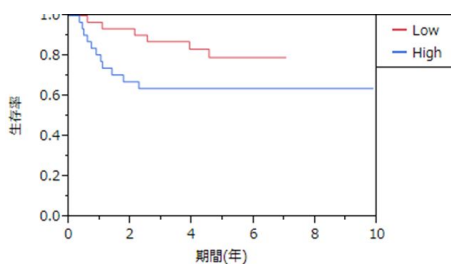


図 6.stem cell 活性による無再発生存曲線

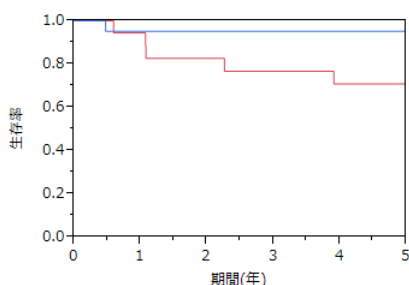


図 7.pN(-)症例における Wnt シグナル活性による無再発生存曲線

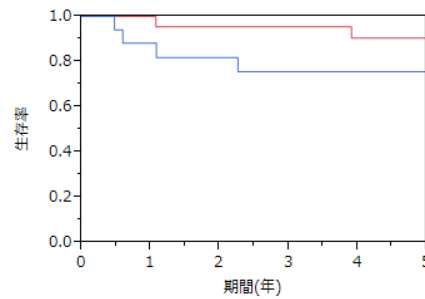


図 8.pN(-)症例における Stem cell 活性による無再発生存曲線

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 3 件)

(1) Ozawa T, Kazama S, Akiyoshi T, Murono K, Yoneyama S, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Kanazawa T, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Morikawa T, Fukayama M, Watanabe T. Nuclear Notch3 expression is associated with tumor recurrence in patients with stage II and III colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 21(8):2650-8, 2014. doi: 10.1245/s10434-014-3659-9. 査読有

(2) Watanabe T, Kobunai T, Akiyoshi T, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K. Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer by using reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of four genes. *Dis Colon Rectum*. 57(1):23-31, 2014. doi: 10.1097/01.dcr.0000437688. 査読有

(3) Akiyoshi T, Ueno M, Matsueda K, Konishi T, Fujimoto Y, Nagayama S, Fukunaga Y, Unno T, Kano A, Kuroyanagi H, Oya M, Yamaguchi T, Watanabe T, Muto T. Selective lateral pelvic lymph node dissection in patients with advanced low rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy based on pretreatment imaging. *Ann Surg Oncol* 21(1):189-96,2014. doi: 10.1245/s10434-013-3216-y. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋吉 高志 (AKIYOSHI TAKASHI)
公益財団法人がん研究会・有明病院 消化
器外科・副医長
研究者番号：50625598

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし