

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893169

研究課題名(和文)大腸癌におけるTROYおよびLGR5の予後予測マーカーとしての臨床的有用性

研究課題名(英文)Prognostic biomarker of the combination of TROY and LGR5 in patients with colorectal cancer

研究代表者

西岡 光昭(NISHIOKA, Mitsuaki)

山口大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：70738963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナル経路は大腸癌の発生・進展に關与する重要なシグナルである。近年、本シグナルに關連した新規分子LGR5とTROYと大腸癌の關連性を示した報告があるが、その詳細は明らかとなっていない。本研究では、大腸癌組織から抽出したRNAを用い、LGR5とTROYが予後予測マーカーとなりえるか検討した。LGR5とTROYは非腫瘍部に比べ腫瘍部で有意に高発現していることが確認できた。また、LGR5とTROYの同時高発現群はそれ以外の群に比べ、有意に術後の再発期間が短かった。LGR5とTROYの組合せは、大腸癌患者の術後の再発率の予測に有用なマーカーの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling plays an important role not only in the regeneration of colon mucosa but also in the development of colorectal cancer (CRC). Recent studies have shown an association of two Wnt target molecules with CRC in vitro. One is LGR5 and the other is a TROY. Although LGR5 and TROY may be involved in the development and progression of CRC, such relationships have not been investigated. To clarify these matters, we performed this study using surgical specimens. The expression levels of LGR5 and TROY were significantly higher in the CRC specimens of stages I to IV than in the non-tumor tissues ( $p < 0.01$ ). In addition, the duration of disease-free survival was shorter in the patients with high levels of both LGR5 and TROY than in those without these molecules ( $p = 0.0376$ ). This study suggests that co-overexpression of LGR5 and TROY may play an important role in CRC progression, and these two genes may be possible biomarkers for the prediction of CRC prognosis.

研究分野：腫瘍検査学

キーワード：LGR5 TROY 大腸癌

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル経路は胎児期の発達過程において細胞の増殖・移動・分化に関するシグナル分子である一方、異常な発現をした場合は腫瘍形成にも関与する重要な経路である。大腸癌の発生及び進展においても Wnt シグナル経路は重要な役割を果たしており、この経路に関する様々な研究が報告されている。

近年、この Wnt シグナル経路の標的遺伝子として LGR5 及び TROY が報告され、LGR5 は正常腸管幹細胞マーカーだけでなく腸管の癌幹細胞マーカーとしての有用性が示された。また、TROY は胎児期の発達過程、特に皮膚や毛根、神経系の発達において重要な役割を果たしている報告が以前よりあったが、近年の報告により、皮膚の腫瘍である悪性黒色腫(メラノーマ)や脳腫瘍の一つである膠芽腫(グリオブラストーマ)の進展と TROY の関連性が示された。また、*in vitro* 実験において TROY と大腸癌の関連性を示した報告がある。更には LGR5 と TROY は Wnt シグナルのレセプターと複合体を形成する報告があり、これら 2 つの分子と Wnt シグナル経路の大腸癌における重要性は高まってきている。

しかしながら、LGR5 と大腸癌の臨床検体を用いた報告は多数あるものの、その大半は腫瘍組織を用いた免疫染色による報告がほとんどであり、LGR5 の発現量の定量性には疑問が残る。また、TROY に関しては、大腸癌の臨床検体を用いた悪性度や生命予後、再発率等の関連性を示した報告はまだない。

## 2. 研究の目的

本研究では、大腸癌腫瘍組織から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて LGR5 と TROY の発現量を定量的に測定し、大腸癌の悪性度や予後との関連性を検討した。また、これら 2 つの分子が *in vitro* においてどのような相互作用を示しているかを確認するために、大腸癌細胞株を用いてこれら 2 つの分子の過剰発現細胞を作製し、その細胞の各遺伝子の発

現量を観察した。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究対象

大腸癌と診断され外科的手術を施行された、106 名を対象とした。検体は、手術中に切除された大腸腫瘍組織及び非腫瘍部の一部から RNA の抽出を行い、cDNA を作成し、これを以後の検討に用いた。

### (2) リアルタイム PCR

機器は Applied Biosystems 社の ABI Prism 7900HT Sequence Detection System を使用し、試薬は Applied Biosystems 社の TaqMan® Gene Expression Master Mix を用いリアルタイム PCR を行った。内部コントロールは  $\beta$ -actin を用いた。各遺伝子のプライマー・プローブセットの catalog number は以下の通りである。

$\beta$ -actin; 4326315E

LGR5; Hs00969422\_m1

TROY; Hs00218634\_m1

発現量の計算には Ct 法を用いて行った。

### (3) 大腸癌細胞株から過剰発現細胞の作成

ヒト大腸癌細胞由来の RK0 細胞を用いて LGR5 及び TROY の過剰発現細胞を作製し、その発現量を(2)のリアルタイム PCR にて確認した。過剰発現細胞の作成のために LGR5 の遺伝子配列をプラスミド(zeocin 耐性)に組み込んだ。また、TROY の遺伝子配列を別のプラスミド(G418 耐性)に組み込み、これら 2 つのプラスミドを Effectene Transfection Reagent(QIAGEN)を用いて RK0 細胞にトランスフェクションし、過剰発現細胞を作製した。

### (4) 統計解析

統計解析には株式会社アーテックの StatFlex Ver.6 を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大腸癌の病期ステージと LGR5・TROY の関連性

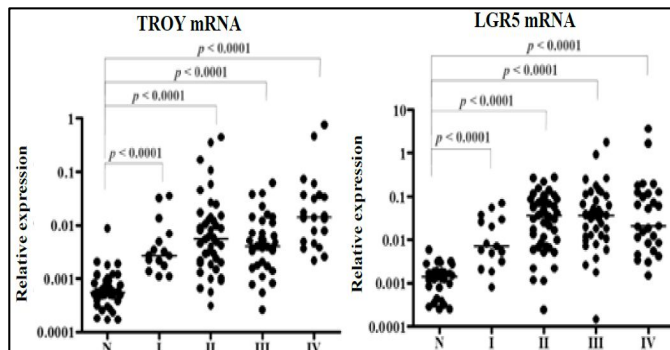


図 1：病期ステージ別に分けた大腸癌患者の腫瘍部及び非腫瘍部における TROY および LGR5 発現量の比較

大腸癌の病期ステージ(Ⅰ: n = 15, Ⅱ: n = 39, Ⅲ: n = 31, Ⅳ: n = 21) と LGR5・TROY の発現量を比較したところ、図 1 のように両遺伝子とも非腫瘍部(N: n = 30)に比較し、各ステージで有意に発現量が高いことが確認できた。

##### (2) LGR5 と TROY を組合せた大腸癌再発率との関連性

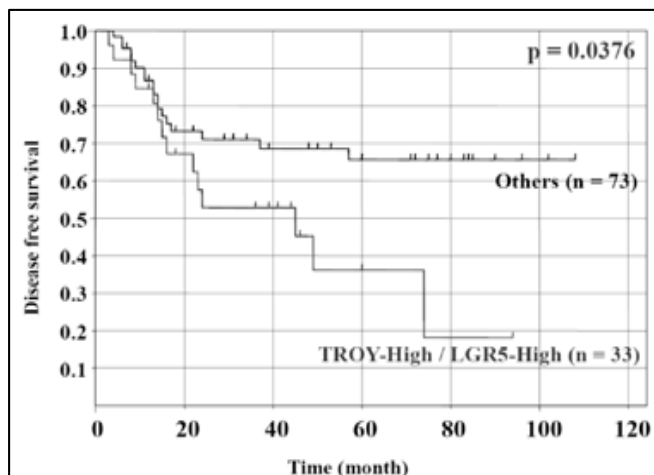


図 2：LGR5/TROY の過剰発現群はその他の群に比べ無病生存期間が有意に短い

LGR5 と TROY が共に過剰発現の群 (TROY-High/LGR5-High: n = 33) はその他の群 (Others: n = 73) に比べ手術後の無病生存期間が有意に短かった (図 2: p = 0.0376)。

(1) と (2) の結果から TROY と LGR5 は大腸癌発生・進展に関与している可能性が考えられ、特に TROY が大腸癌臨床検体で高発現している報告や予後と関連している報告はこれま

で無く、新たな知見である。

##### (3) LGR5 と TROY の過剰発現細胞による LGR5 と TROY の関連性

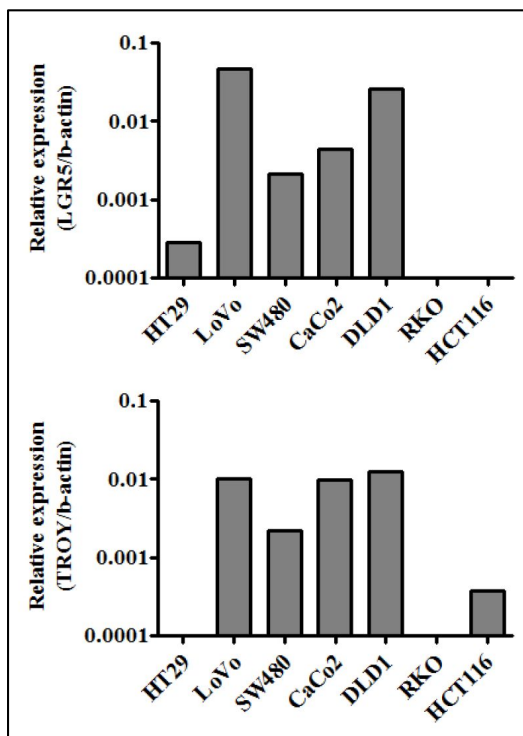


図 3：ヒト大腸癌細胞株 7 種類の LGR5 及び TROY の発現量

7 種類の大腸癌細胞株 (HT-29, LoVo, SW-480, Caco-2, DLD-1, RKO, HCT-116) の LGR5 と TROY の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で確認したところ、RKO 細胞のみで両遺伝子の発現量が低値であった (図 3)。このため RKO 細胞を用いて LGR5 と TROY の過剰発現細胞を作成した。作成した細胞の LGR5 と TROY の発現量をリアルタイム PCR にて測定したところ、LGR5 を過剰発現させた細胞の TROY の発現量は wild type の細胞と変わらなかった。また、TROY を過剰発現させた細胞の LGR5 の発現量を測定したところ、wild type の細胞と変わらなかった。これらのことより LGR5 と TROY の相互作用はなく、独立した遺伝子であることが確認できた。

(1) ~ (3) の研究成果より LGR5 と TROY は非腫瘍部に比べ大腸癌組織において発現量が有意に高値であることが確認できた。また、これら 2 つの遺伝子を同時高発現群においては、

有意に外科的手術後の再発率が高いことから、LGR5 と TROY は予後予測因子として有用であると推測できる。また、*in vitro*の実験より両遺伝子は相互作用をせず独立した因子と考えられる。このことはLGR5 と TROY の組合せの妥当性が示唆され、また、予後予測因子としての有用性は高まると考えられる。今後は過剰発現細胞を用いた大腸癌中の TROY と LGR5 がどのように関与しているか解明するとともに新たな大腸癌関連分子の検索を行う予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Nishioka M, Suehiro Y, Sakai K, Okayama N, Mizuno H, Yamasaki T. Prognostic biomarker of the combination of TROY and LGR5 in patients with colorectal cancer. American Association for Clinical Chemistry (AACC) Annual Meeting; 2015 July 26-30, Atlanta, Georgia. (U.S.A.) Poster presentation.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(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

西岡 光昭 (NISHIOKA, Mitsuaki)

山口大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：70738963