

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10106

研究課題名(和文) 消化管がんの増殖・進展・転移におけるリンパ管侵襲の役割

研究課題名(英文) Significance of lymphatic invasion in the progression of gastrointestinal carcinoma

研究代表者

白石 憲男 (Shiraishi, Norio)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：20271132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：早期からリンパ節転移を来たしやすい食道癌に着目し生検検体から抽出したmRNAを用いてDNAマイクロアレイを行った。現在リンパ管侵襲、リンパ節転移と相関する遺伝子の解析を行なっている。その内、術前DCF(Docetaxel/CDDP/5-FU)療法施行例では病理学的完全奏効(pCR)予測因子の同定を行なった。結果、17分子(E2F, TCF, Src, IRF-1, TSase, cyclin B, CDK4, CDKs, caspase-1, VDR, HDAC, MEK, Bax, RUNX1, BLIMP-1, PDGFR, IL-1)がpCR予測因子として抽出され、国際誌(PLoS One, 2017)に報告した。

研究成果の概要(英文)：We performed DNA microarray using mRNA collected from biopsy specimens in esophageal cancer. Gene expression of correlation with lymphatic invasion and lymph node metastasis is now being analyzed. Additionally, the predictor of pathological complete response(pCR) was investigated in the cases treated with neoadjuvant chemotherapy involved Docetaxel/Cisplatin/5-fluorouracil (NAC-DCF). Consequently, seventeen molecules including transcription factor E2F, T-cell-specific transcription factor, Src (known as "proto-oncogene tyrosine-protein kinase of sarcoma"), interferon regulatory factor 1, thymidylate synthase, cyclin B, cyclin-dependent kinase(CDK) 4, CDK, caspase-1, vitamin D receptor, histone deacetylase, MAPK/ERK kinase, bcl-2-associated X protein, runt-related transcription factor 1, PR domain zinc finger protein 1, platelet-derived growth factor receptor, and interleukin 1, were identified as candidate molecules. These were published in a journal with peer review (PLoS One 2017).

研究分野：消化器外科、胃外科、食道外科

キーワード：リンパ節転移 リンパ管侵襲 分子生物学的解析 ヒト食道癌 治療効果予測因子

## 1. 研究開始当初の背景

消化管がん、特に胃がんや大腸がんは、頻度の高い固形腫瘍であり、そのがん進行に関する病態解明と新しい治療戦略が現在なお期待されている。しばしば臨床で胃がん・大腸がんにおいて、病理学的にリンパ節転移はないものの、リンパ管侵襲陽性である症例を経験する。リンパ節転移は成立していないが、リンパ管侵襲は発生しているこの局面は、上皮間質転換(EMT: epithelial mesenchymal transition)のファーストステップの病態と考えられる。現在まで、がん組織においてリンパ管侵襲とリンパ節転移、さらには全身への波及というがん細胞のリンパ管内動態に関する研究はあるものの病態解明にまでいたっていない。その大きな理由は、リンパ管侵襲因子の同定やその遺伝子の単離が行われてこなかったこと、さらには有用なリンパ節転移に関する動物モデルが開発されていないことによる。一方、anti-Prox-1抗体、anti-D2-40抗体などリンパ管内皮細胞を特異的に同定する方法、VEGF-C、VEGF-3/fit-4などのリンパ管増殖因子を同定する方法が報告され、その遺伝子の単離がなされてきた。それらを用いた解析により、比較的早期のがん組織においてリンパ管侵襲が、がんの増殖・進展に重要な働きをしていることが示されている(Annals of Surgical Oncology 2010; 17(1):73-80, Pigment Cell Melanoma Res 2013; 26(3):326-37)。

これまで教室では、大腸がん手術摘出標本の凍結切片を用いて、リンパ節転移関連する transcriptome 解析を行い、その臨床的意義を明らかにしてきた(Int J Cancer 2012:1307-1317)。この研究においては、リンパ節転移成立後(pN+)の原発巣と(pN-)の原発巣の sorting による解析を行った。これらの同定した遺伝子群のうちリンパ管侵襲にかかわる key genes が存在する可能性があることを示した。本研究では、この研究をさらに発展させ、pN0かつリンパ節の micrometastasis (分子生物学的解析)陰性の進行大腸癌(stagell)を用いて、リンパ管侵襲の有無で sorting する transcriptome 解析を行う。純粹にリンパ節転移成立の前段階でのリンパ管侵襲に関連する遺伝子群の同定が可能となり、上皮間質転換(EMT: epithelial mesenchymal transition)のファーストステップの病態解明のキーとなると考えている。同時に教室では micrometastasis の検討として胃がんにおける pN0 でありながらリンパ節の micrometastasis 陽性の臨床的意義を報告しており(Ann Surg Oncol 2001:771-4)、胃がん・大腸がんのリンパ節転移の分子生物学的評価は積極的に行っている。

## 2. 研究の目的

研究の目的は、消化管癌のリンパ節転移やリンパ管侵襲の発生機序を解明し、その臨床的意義を明らかにすることである。3年の研究期間に、癌の予後因子であるリンパ節転移の機序や遠隔転移の有無とリンパ管新生・リンパ管侵襲との関連を分子生物学的手法、免疫組織学的手法、網羅的遺伝子解析、および電子顕微鏡を用いた形態学的手法を用いて

解明する。今回は消化管癌の中でも早期からリンパ節転移を来たしやすいとされる食道癌に着目し、リンパ節転移や遠隔転移に関連する遺伝子研究を行う

## 3. 研究の方法

食道癌患者の治療前生検標本から癌部組織および非癌部組織を使用する。組織より抽出した mRNA を用いて、DNA マイクロアレイ法(Agilent scanner)による遺伝子プロファイリングを解析する。癌部/非癌部の遺伝子発現比を算出し、臨床病理学的因子との関連を検討し、リンパ節転移やリンパ管侵襲に関わる遺伝子の抽出および機能解析を行う。

## 4. 研究成果

今回は消化管癌の中でも早期からリンパ節転移を来たしやすいとされる食道癌に着目し、リンパ節転移や遠隔転移に関連する遺伝子研究を行った。

また、術前 DCF (Docetaxel/CDD P/5-FU) 療法を行なった症例では治療効果予測因子の同定も行った。以下に研究成果を報告する。

- I. リンパ管侵襲およびリンパ節転移に関わる遺伝子研究では、生検検体から抽出した mRNA を用いて DNA マイクロアレイを行った。現在、リンパ管侵襲およびリンパ節転移に有意に相関する候補遺伝子の発現解析を行ない、分子ネットワーク解析を用いて機能解析をおこなっている。解析が終了し次第、学会発表および国際誌へ投稿する予定である。
- II. 術前 DCF 療法における治療効果予測因子の同定では、治療前生検検体から抽出した mRNA を用いて DNA マイクロアレイを行い、病理学的完全奏効 (pCR) に有意に相関する候補遺伝子の発現解析、および分子ネットワーク解析を行なった(図1)。その結果、17分子: transcription factor E2F, T-cell-specific transcription factor, Src (known as “proto-oncogene tyrosine-protein kinase of sarcoma”), interferon regulatory factor 1, thymidylate synthase, cyclin B, cyclin-dependent kinase (CDK) 4, CDK, caspase-1, vitamin D receptor, histone deacetylase, MAPK/ERK kinase, bcl-2-associated X protein, runt-related transcription factor 1, PR domain zinc finger protein 1, platelet-derived growth factor receptor, and interleukin 1 が pCR 予測因子として抽出され(表1)、国際誌に報告した(A 17-molecule set as a predictor of complete response to neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil in esophageal cancer. PLoS One 12(11), e0188098, 2017)。

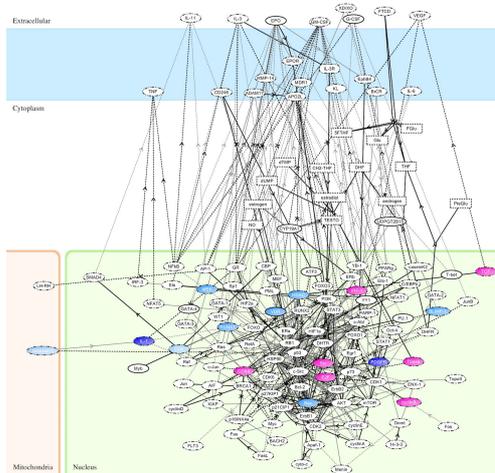


図 1) pCR 予測因子のネットワーク解析

| Molecule  | Putative molecular function                                                                                                              | log <sub>2</sub> FC | P-value |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------|
| E2F       | Transcription activator associated with cell cycle regulation or DNA replication.                                                        | 0.767               | <0.001  |
| TCF       | Transcription activator involved in T-cell lymphocyte differentiation.                                                                   | 0.761               | 0.025   |
| Src       | Non-receptor protein tyrosine kinase that activates many different classes of cellular receptors.                                        | 0.755               | 0.011   |
| IRF-1     | Transcriptional regulator that displays functional diversity in the regulation of cellular responses.                                    | 0.675               | 0.01    |
| TSSse     | Contributes to the de novo mitochondrial thymidylate biosynthesis pathway.                                                               | 0.655               | 0.006   |
| CyclinB   | Essential for the control of the cell cycle at the G2M (mitosis) transition.                                                             | 0.694               | 0.027   |
| CDK4      | Ser/Thr-kinase component that phosphorylates and inhibits members of the RB protein and regulates the cell cycle during G1/S transition. | 0.623               | 0.03    |
| CDK       | Appears to play multiple roles in cell cycle progression, cytokinesis, and apoptosis.                                                    | -0.042              | 0.03    |
| Caspase-1 | Thiol protease involved in a variety of inflammatory processes.                                                                          | -0.231              | 0.019   |
| VDR       | Transcription factor that mediates the action of vitamin D3.                                                                             | -0.529              | 0.031   |
| HDAC      | Responsible for the deacetylation of lysine residues on the N-terminal part of core histones.                                            | -0.565              | 0.007   |
| MEK       | Dual specificity protein kinase of the MAP kinase signal transduction pathway.                                                           | -0.603              | 0.034   |
| Bax       | Accelerates programmed cell death by binding to and antagonizing the apoptosis repressor.                                                | -0.609              | 0.015   |
| RUNX1     | Transcriptional factor associated with the differentiation of the hematopoietic system.                                                  | -0.780              | 0.014   |
| BLIMP-1   | Transcription factor that mediates a transcriptional program in various immune tissue-resident lymphocyte T-cell types.                  | -0.810              | 0.007   |
| PDGFR     | Tyrosine-protein kinase associated with the regulation of embryonic development, cell proliferation, survival, and chemotaxis.           | -1.147              | 0.002   |
| IL-1      | Involved in the inflammatory response and stimulates the release of prostaglandin and collagenase from synovial cells.                   | -1.173              | 0.024   |

表 1) pCR 予測の候補因子

## 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 1 件)

Hajime Fujishima, Shoichi Fumoto, Tomotaka Shibata, Kohei Nishiki, Yoshiyuki Tsukamoto, Tsuyoshi Etoh, Masatsugu Moriyama, Norio Shiraishi and Masafumi Inomata.

**A 17-molecule set as a predictor of complete response to neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil in esophageal cancer.**  
*PLOS ONE*, 査読有. 12(11), 2017.  
 DOI: 10.1371/journal.pone.0188098.

オープンアクセス:  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188098>

[学会発表](計 2 件)

藤島 紀、麓 祥一、錦 耕平、河野 洋平、鈴木 浩輔、赤木 智徳、柴田 智隆、上田 貴威、當寺ヶ盛 学、白下 英史、衛藤 剛、白石 憲男、猪股 雅史。  
**局所進行食道癌に対する術前 DCF 療法の治療効果予測因子の同定。**  
 癌と遺伝子フォーラム, 2017 年。

藤島 紀、麓 祥一、錦 耕平、河野 洋平、鈴木 浩輔、赤木 智徳、柴田 智隆、上田 貴威、當寺ヶ盛 学、白下 英史、衛藤 剛、白石 憲男、猪股 雅史。  
**局所進行食道癌に対する術前 DCF 療法の治療効果予測因子の同定。**  
 第 118 回日本外科学会定期学術集会, 2018.

[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:

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白石 憲男 (SHIRAISHI, Norio)  
 大分大学・総合外科・地域連携学講座・教授  
 研究者番号: 20271132

### (2) 研究分担者

衛藤 剛 (ETOH, Tuyoshi)  
 大分大学・消化器・小児外科・講師  
 研究者番号: 00404369

平塚 孝宏 (HIRATSUKA, Takahiro)  
 大分大学・消化器・小児外科・助教  
 研究者番号: 20600886

猪股 雅史 (INOMATA, Masafumi)  
 大分大学・消化器・小児外科・教授  
 研究者番号: 60315330

赤木 智徳 (AKAGI, Tomonori)  
 大分大学・消化器・小児外科・助教  
 研究者番号: 80572007

北野 正剛 (KITANO, Seigo)  
大分大学・法人本部・学長  
研究者番号：90169871

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )