

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590364
 研究課題名 (和文) 潰瘍性大腸炎関連癌での細胞接着因子の発現と DNA メチル化：
 浸潤能獲得機序の解明
 研究課題名 (英文) Expression of cell adhesion molecule in ulcerative colitis-
 associated carcinoma
 研究代表者
 三上 哲夫 (MIKAMI TETUO)
 北里大学・医学部・准教授
 研究者番号：90286352

研究成果の概要：

潰瘍性大腸炎 (UC) 長期罹患例には癌が高率に発生する。この UC 関連癌では浸潤部で低分化に変化する傾向があり、浸潤部における細胞接着因子、基底膜の分解、糖鎖抗原などについて免疫組織化学的に検討した。その結果、UC 関連癌では通常の大腸癌と比べて、基底膜の分解、悪性を示唆する糖鎖抗原の発現とも低いことが示された。今回の結果からは、UC 関連癌は sporadic 型大腸癌よりも悪性度が高いとは言えず、同程度の浸潤能を示すものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化管の腫瘍の病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：潰瘍性大腸炎、大腸癌、 β -catenin

1. 研究開始当初の背景

発癌機構における重要な経路として、慢性炎症→癌という経路が注目されている。潰瘍性大腸炎 (UC) 長期罹患例には癌が高率に発生するが、筆者はこれまで、細胞接着因子 CD44 の発現、アポトーシス制御、細胞回転制御、MGMT, hMLH1 のプロモータのメチル化の観点から UC 関連大腸癌の性質を調べ、通常の adenoma-carcinoma sequence 経路の発癌と異なることを示してきた (Cancer 89:733, 2000; Am J Clin Pathol 119:723, 2003; Pathol Int 56:10, 2006; Am J Clin Pathol

127:366, 2007)。

また、遺伝子異常については、これまで UC 関連癌では *k-ras*, *APC* の変異の頻度が低いとされてきたが、*p53* の変異頻度が高く、再生粘膜でも *p53* の変異腺管が出現することを示してきた (J Pathol 199:166, 2003)。

この UC 関連癌では浸潤部で低分化に変化する傾向があり、進展機構が通常 sporadic 型大腸癌とは異なる可能性が考えられ、これが大腸癌の予後に関係しているものと考えられてきた。

2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎関連癌と通常の sporadic 型大腸癌において、細胞接着因子である Occludin, Zo-1, β -catenin と、 β -catenin の発現を免疫組織化学的に検索し、その違いを解析する。さらに、浸潤の先端部における、matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), laminin5 γ 2 と細胞表面糖鎖抗原 sialyl LewisX (LeX) の発現を検討し、UC-関連癌と sporadic 型大腸癌との浸潤能獲得機序の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学

UC-関連癌 14 例と、sporadic 型大腸癌 95 例とについて、ホルマリン固定パラフィン切片を用いて免疫染色を行った。一次抗体として、Occludin (santa cruz), Zo-1 (santa cruz), β -catenin (Transduction lab), MMP-7 (Daiichi Fine Chemical), laminin5 γ 2 (DAKO), sialyl LeX (大塚製薬より供与), pan-cytokeratin (DAKO)を用いた。熱処理による抗原の賦活を行い、以降の操作は、Envision kit (DAKO)を用いて行った。それぞれの発現については、組織学的に観察し染色濃度と染色面積を評価しての半定量的解析を行った。

(2) tumor budding の評価

Tumor budding とは、癌が浸潤の先端部において胞巣から葉なれ、個々の細胞単位ないし、細胞 4 個以下の胞巣を形成して浸潤する現象のことを指す。この tumor budding は浸潤の典型的組織像であると共に、リンパ管侵襲、リンパ節転移と関係し、予後因子となるとされている。上記で染色した Pan-cytokeratin を染色した標本を用いて、癌の浸潤の先端部における tumor budding の focus の単位長さ当たりの数を計測した。

(3) β -catenin の exon 3 の変異の解析

ホルマリン固定パラフィン切片から癌部の DNA を QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) により抽出し、PCR プライマー (5'-ATTTGATGGAGTTGGACATGG-3' および 5'-TCTTCCTCAGGATTGCCTT-3') を用いて PCR を行った後、精製し BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) により direct sequence を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①UC 関連癌と sporadic 型大腸癌の間では tumor budding の程度、および occludin, zo-1, β -catenin の発現には差が認められなかった。 β -catenin の発現と tumor budding の間には

明らかな関係は見出すことができなかった (table 1)。

Table 1 Tumor budding in cancer lesion

	N	foci of tumor budding (/cm)
Sporadic cancer right	45	274.0 \pm 287.6
Sporadic cancer left	50	278.8 \pm 299.5
UC cancer	14	227.1 \pm 267.8

② β -catenin exon 3 の変異は sporadic 型大腸癌の 91 例中 3 例のみに認められた。UC 関連癌では変異は認められなかった (0/6 例)。

β -catenin gene exon 3 mutation

Sporadic cancer right	2/42(4.7%)	2 cases, codon 41 ACC to GCC
Sporadic cancer left	1/49(2.0%)	1 case, codon 41 ACC to GCC
UC cancer	0/6 (0.0%)	

③UC 関連癌と sporadic 型大腸癌で、分化度を揃えて MMP-7, laminin5 γ 2, sialyl LeX の浸潤の先端部における発現を比較したところ、中～低分化腺癌においては UC 関連癌が sporadic 型大腸癌よりも、有意に laminin5 γ 2, sialyl LeX の発現が低いことが示された。

Table 2 Expression of MMP-7, laminin5 γ 2, and sialyl LeX in the invasive front of colon cancer

	n	tumor budding (/cm)	MMP-7	laminin5 γ 2	sialyl LeX
Sporadic cancer					
well diff	96	201 \pm 271	1.74 \pm 1.01	4.71 \pm 1.97	2.51 \pm 2.50
mod-poor diff	59	322 \pm 297	1.61 \pm 1.16	4.68 \pm 2.16	2.95 \pm 2.11
UC-cancer					
well diff	4	186 \pm 229	1.00 \pm 0.81	3.25 \pm 0.95	1.50 \pm 2.38
mod-poor diff	10	243 \pm 271	1.67 \pm 1.41	2.56 \pm 2.00	0.78 \pm 0.66

UC, ulcerative colitis; MMP, matrix metalloproteinase; well diff, well differentiated; mod-poor diff, moderately to poorly differentiated
a, p<0.05

④リンパ節転移率を調べたところ、UC 関連癌と sporadic 型大腸癌の間には差は認められなかった。(Table 3)

Table 3 Clinicopathological findings of the cancer lesions

	UC-associated	sporadic
site		
left side	13	50
right side	1	45
histological type		
well differentiated	4	36
moderately to poorly differentiated (including signet-ring cell carcinoma)	10	59
depth of invasion		
up to MP	3	12
SS/A or deeper	11	83
lymph node metastasis		
negative	6	38
positive	8	57
Dukes grade		
A	3	12
B	3	29
C	8	54

UC, ulcerative colitis; MP, muscularis propria; SS, subserosa; A, adventitia;

(2) 得られた成果の位置づけ

以前より組織学的に潰瘍性大腸炎関連癌は浸潤部で低分化になる傾向があることは指摘されてきた。通常、癌は低分化となると生物学的悪性度が高くなることが知られており、このため、これまでは UC 関連癌は通常の sporadic 型大腸癌と比べて生物学的悪性度が高いと考えられてきた。近年この考え方には疑問が呈されてきているが、多症例の解析研究や病理学的解析によりこのことについて検討した研究は、これまで存在していなかった。

今回の検討では、基底膜の破壊を示唆する laminin5 γ 2、細胞表面の糖鎖抗原で悪性の予後を示唆する sialyl LeX とも、組織型を勘案して整理すると、UC 関連癌では通常の sporadic 型大腸癌よりも発現が低いことが示された。さらに、UC 関連癌と sporadic 型大腸癌の間で、tumor budding、細胞接着因子 occludin, Zo-1, β -catenin の発現、リンパ節転移率について、明らかな差を見出すことはできなかった。これらの結果からは、UC 関連癌が sporadic 型大腸癌よりも悪性度が高いとは言えず、その生物学的悪性度は分化度により純粋に規定されるべきと考えられるべきと思われた。

また、 β -catenin は MMP-7 の発現調節に関わる転写因子としての働きも有しているが、この変異は大腸癌の浸潤という減少に関しては、重要な役割を担っていないと考えられた。

現在、臨床的には UC の患者は大腸癌の早期発見のためのサーベイランスとして定期的内視鏡で経過観察を行うのが通常である。通常の大腸癌と比べて悪性度に差がないならば、癌が浸潤して低分化に変化する前の段階で UC 関連腫瘍を早期に発見することが、

UC 関連癌の予後の改善に重要であると考えられ、サーベイランスの重要性が病理学的にも支持されることが示された。

(3) 今後の展望

分化度を揃えた場合、UC 関連癌と sporadic 型大腸癌で悪性度に差はないと考えられるが、UC 関連癌が浸潤に際して胞巣が低分化になる機序についての解析は、今回進められなかった。その一つの理由としては、これまでは β -catenin の変異が浸潤能の獲得に寄与しているとの仮説で研究を進めてきたが、 β -catenin の関与はあまりないことが今回示されたためである。

浸潤能の獲得について、現在 epithelial mesenchymal transition が注目されており、この現象には癌遺伝子の変異は関係せず、周囲のサイトカインの刺激が重要であるとされている。鍵となるタンパク Snail とヒアルロン酸受容体 CD44, Adam17 などの発現、Wnt-signal pathway (β -catenin も関与) と snail の関係、tumor budding との関係などを、UC 関連癌において検討する必要があると考えられる。

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 1 件)

① Ogawa T, Yoshida T, Tsuruta T, Tokuyama W, Adachi S, Kikuchi M, Mikami T, Saigenji K, Okayasu I. Tumor budding is predictive of lymphatic involvement and lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal adenocarcinomas and in non polypoid compared with polypoid growth. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 44:605-614, 2009 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

① 三上哲夫, 沼田賀子, 菊地正臣, 荒木香代, 吉田功, 一戸昌明, 柳沢信之, 徳山宣, 岡安勲 潰瘍性大腸炎関連癌の浸潤と β -catenin, MMP-7 の発現: sporadic 型大腸癌との比較 第 97 回日本病理学会総会 平成 20 年 5 月 16 日 金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 哲夫 (MIKAMI TETUO)

北里大学・医学部・准教授
研究者番号：90286352