

機関番号：24701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591554

研究課題名 (和文) CEACAM1 を分子標的とした大腸癌の新規分化誘導療法の開発

研究課題名 (英文) Novel differentiation induction therapy for colorectal cancer by targeting to CEACAM1

研究代表者 横山 省三 (YOKOYAMA, SHOZO)
和歌山県立医科大学医学部 助教

研究者番号：90398462

研究成果の概要 (和文)：

CEACAM1 は上皮細胞や血球性細胞、血管内皮細胞に発現する I 型膜貫通型糖蛋白であり、Immunoglobulin superfamily や CEA family に属する。これまで、CEACAM1 は大腸癌では発現が低下するという報告と発現が増強するという相反する報告がされてきた。本研究において、癌表層部では発現が低下しており、進行がんの浸潤先進部では発現が増強するということを明らかにし、この矛盾点を解決した。また、大腸癌においては CEACAM1 の発現強度は悪性度と関連しないという点においても、本研究において、発現強度よりも isoform balance が悪性度と関連することを明らかにした。基礎的研究から CEACAM1-L isoform の強い大腸癌は、転移・浸潤に関連することを確認した。CEACAM1 isoform balance をコントロールすることにより大腸癌の浸潤、転移を抑制できる可能性を明らかにした。さらに、CEACAM1 により lumen formation が誘導されることが乳癌細胞で報告されていることから、大腸癌の浸潤先進部における管腔形成と CEACAM1 の発現および isoform balance について検討したところ、管腔を伴う癌細胞巣は CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform を発現していることを確認した。さらに臨床病理学的に統計解析し、管腔を伴う癌細胞巣が転移や予後について有意に相関し、かつ Budding よりも優れた指標であることを証明した。また、大腸癌培養細胞を用いて CEACAM1 の isoform を含めた発現変化を行い、CEACAM1 は lumen formation の調節因子であり、CEACAM1-Long の強発現と経時的な lumen formation との相関について明らかにした。本研究において、大腸癌浸潤先進部の管腔を伴う癌細胞巣は転移および予後不良の独立した因子であることが明らかになったことで、大腸癌における管腔を伴う癌細胞巣形成は腫瘍形成能を示している可能性がある。今後、さらなる大腸癌先進部の管腔を伴う癌細胞巣の意義について検討する必要がある。

研究成果の概要 (英文)：

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1(CEACAM1) is known to be downregulated at the transcriptional level in adenoma and carcinoma. Recent reports have shown that CEACAM1 is overexpressed at protein level in colorectal cancer, and correlated with clinical stage. The reason why colorectal cancer cells re-expressed CEACAM1 remains unclear. The aim of the present study was to clarify the implication of CEACAM1 re-expression in colorectal cancer. Immunohistochemical analyses were conducted with CEACAM1 long (CEACAM1-L) or short (CEACAM1-S) cytoplasmic domain-specific antibodies on clinical samples from 164 patients with colorectal cancer. The risk factors for metastasis and survival were calculated for clinical implication of CEACAM1 re-expression. Invasion chamber and wound healing assays were performed for the effect of CEACAM1 expression on invasion and migration of colorectal cancer cells. CEACAM1-L and CEACAM1-S stained with greater intensity at the invasion front than at the luminal surface of tumors. Differences between the long and short cytoplasmic isoform expression levels were observed at the invasion front. Multivariate analysis showed that CEACAM1-L dominance was an independent risk factor for lymph node metastasis, hematogenous metastasis, and short survival. The Kaplan-Meier evaluation demonstrated that CEACAM1-L dominance was associated with shorter survival time ($p < 0.0001$). In the invasion chamber and wound healing assays, CEACAM1-L promoted invasion and migration. Re-expression of CEACAM1 is observed at the invasion front of colorectal cancer. CEACAM1-L dominance is associated with metastasis and shorter survival of the patients with colorectal cancer.

CEACAM1-L dominance is important for colorectal cancer cells invasion and migration. Tumor budding formed by histological undifferentiated cancer cells beyond the border of tumor margin is associated with lymph node metastasis. However, cancer nests with a hollow, conceivable histological advanced phenotype of tumor budding, has not been discussed. Next we investigate that the appearance “spheroid with a hollow (SWH)” exists beyond the border of the invasive margin, and associates with metastases and prognosis. Moreover, we present that CEACAM1 isoform balance is associated with SWH formation. Immunohistochemical analyses with CEACAM1 and M30 as an apoptosis marker were performed, to address CEACAM1 expression of SWH and central cells apoptosis for SWH formation. The correlations between the SWH beyond the border of the invasive margin and clinicopathological characteristics of 314 patients with colorectal cancer were evaluated. Three dimensional (3D) culture was conducted with colorectal cancer cells transfected with CEACAM1 cDNA or shRNA, to evaluate that CEACAM1 isoform balance controls colorectal SWH formation. The existence of SWH formation accompanying the central cells apoptosis was confirmed by M30 staining and serial section with CEACAM1 staining. Of the 314 patients, 96 (30.4%) were classified as having SWH. SWH is an independent risk factor for metastases and shorter survival. In 3D culture, CEACAM1 isoform balance modulated SWH formation of colorectal cancer cells. The colorectal cancer SWH beyond the border of tumor margin is more important for prediction of malignant potential than tumor budding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学：外科学一般

キーワード：実験外科学

1. 研究開始当初の背景

CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) は上皮細胞や血球系細胞、血管内皮細胞に発現する I 型膜貫通型糖蛋白であり Immunoglobulin super family、CEA family に属する接着分子である。3 個または 4 個の細胞外ドメインと long isoform または short isoform の細胞内ドメインを有する。CEACAM1 の腺管形成に関する報告として、乳癌上皮細胞株 MCF10F の lumen formation に CEACAM1 が関与すること (Huang J et al: *J Cell Sci* 1999)、乳癌細胞株 MCF7 に CEACAM1-4S を遺伝子導入し、3D culture (Matrigel) 中で培養すると、lumen formation を形成し、腺管内腔は apoptosis によって形成されること (Kirshner J et al: *PNAS* 2003.)、CEACAM1-4S による lumen formation は細胞内ドメインの Thr と Ser の phosphorylation によりコントロールされている (Chen CJ et al: *JBC* 2007) こと、乳癌 (MCF7) 培養細胞に CEACAM1 の強制発現させた

乳癌細胞株 MCF7 が、humanized fat pad マウスモデル (*in vivo*) で上皮細胞の極性を誘導し lumen formation (高分化腺管組織) を形成する (Yokoyama S et al: *Oncogene* 2007) ことが報告されてきた。さらに、前立腺癌 (PC-3) 培養細胞に CEACAM1 を強制発現させることで、細胞遊走を抑制し、anoikis を誘導することで、lumen formation を 3 次元培養および humanized fat pad マウスモデルで誘導することを証明した (submitted)。ヒトの大腸癌で CEACAM1 は RNA レベルで発現が低下すると報告されているが、近年の報告ではタンパクレベルでの発現増強が進行癌で報告されており、その矛盾に対し詳細な検索は全く行われておらず、また、大腸癌の lumen formation における CEACAM1 の役割についても検討されていない。

2. 研究の目的

CEACAM1 は上皮細胞や血球系細胞、血管内皮細胞に発現する I 型膜貫通型糖蛋白であ

り, Immunoglobulin super family, CEA family に属する接着分子である。3 個または 4 個の細胞外ドメインと long isoform または short isoform の細胞内ドメインを有する。

悪性黒色腫や肺癌では CEACAM1 は浸潤、転移に関与していることが報告されている。大腸癌においては、大腸腺腫や早期大腸癌では、CEACAM1 の発現は低下すると報告されてきた。しかし、近年、進行大腸癌では CEACAM1 は強発現するという報告も報告されている。また、大腸癌では CEACAM1 の発現の強度は転移とは関連するが、生存率とは相関しない。本研究は、まず最初に大腸癌の臨床病理学的因子と CEACAM1 発現と isoform balance との関連について検討した。

次に、大腸癌浸潤先進部における分化に着目した。大腸癌の転移や予後を予測する臨床病理学的因子の中で先進部の組織形態について、様々に検討されてきた。簇出(Budding)は先進部間質に存在する 5 個未満の癌細胞から成る低分化な癌細胞巣と定義され、転移や予後との関連が報告されている。しかし、癌発育先進部の管腔形成 (lumen formation)、つまり分化・管腔形成の伴う癌細胞巣と臨床病理学的因子に関する検討はない。接着分子である CEACAM1 は現在までに、乳癌培養細胞において上皮細胞の極性と lumen formation を誘導することが報告されている。本研究では癌先進部に存在する管腔を伴う癌細胞巣と CEACAM1 発現との関連について検討し、さらに臨床病理学的因子との関連について検討することで、リンパ節転移や遠隔転移、予後との相関を検討した。さらに基礎的に、大腸癌培養細胞を用いて CEACAM1 の発現変化と管腔形成能の関連について検討した。

3. 研究の方法

①大腸癌の臨床病理学的因子と CEACAM1 発現と isoform balance との関連について検討
【臨床的研究】

<対象>

2002 年 1 月から 2003 年 12 月に和歌山県立医科大学第 2 外科にて手術した大腸癌症例 164 人を対象とした。

<方法>

ホルマリン固定パラフィン包埋保存された標本から薄切切片を作成した。一次抗体に CEACAM1-long cytoplasmic domain(CEACAM1-L) または CEACAM1-short cytoplasmic domain(CEACAM1-S) に特異的な抗体 (Dr. JE. Shively, City of Hope, CA, USA より提供) を用いて免疫組織化学染色を施行した。抗体が他の CEA family と cross reaction がないことを Western blot により確認した。また、市販されている抗 CEACAM1 monoclonal 抗体 (29H2) と同部位を認識することを免疫組織化学染色と proximity

ligation assay (Duolink™ in situ PLA, Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) により確認した。正常粘膜や血管内皮を internal control とし、2 種類の抗体をそれぞれ internal control と癌腺腔との染色強度の差で比較した。

CEACAM1 isoform balance を含めた臨床病理学的因子 (年齢、性別、腫瘍部位、分化度、深達度、リンパ管浸潤、血管浸潤) とリンパ節転移、血行性転移、生存率について検討した。統計学的処理として、リンパ節転移と遠隔転移との相関は χ^2 乗検定、ロジスティック回帰モデルで、生存率との相関は Cox ハザードモデル、および Kaplan-Meier 法で検討した。

【基礎的研究】

CEACAM1 の発現と、その isoform balance が癌の浸潤や転移・遊走に関与するかを検討するために、大腸癌細胞株を用いて基礎的検討を行った。CEACAM1 を中等度発現する大腸癌細胞 HT29 と、CEACAM1-L を特に強く発現する LS174T を使用した。HT29 細胞に CEACAM1-L, CEACAM1-S を強制発現させ、HT29 細胞の CEACAM1 isoform balance を変化させ、invasion assay, wound healing assay を施行した。または CEACAM1-L を強発現する LS174T 細胞に CEACAM1-S を強制発現させ、CEACAM1 isoform balance を変化させた細胞と、shRNA を用いて CEACAM1 をノックダウンさせた細胞を使用して、同様の実験を施行した。遺伝子導入に関しては、RT-PCR と Western blot により、CEACAM1 の発現を確認した。

②大腸癌発育先進部における管腔を伴う癌細胞巣の検討

【臨床的研究】

<対象>

和歌山県立医科大学附属病院第 2 外科にて 2002 年 1 月から 2003 年 12 月までに手術を施行された大腸癌 164 症例を対象として、H.E 染色または下記の免疫染色を行った。その後、2002 年 1 月から 2005 年 8 月までに手術を施行された大腸癌 314 症例を対象として、臨床病理学的因子を検討した。

<方法>

免疫染色：熱処理にて抗原賦活化、その後一次、二次抗体反応を行い、DAB で発色させた。一次抗体として CEACAM1 monoclonal 抗体と CEACAM1 の long または short isoform に特異的な polyclonal 抗体、アポトーシスのマーカーとして M30 抗体を使用した。薄切 serial 切片を作製し、分化型癌細胞巣の立体構造を確認し、同部について 4 種類に免疫染色を行った。統計学的処理：上記の大腸癌臨床検体を用い、臨床病理学的因子についてリンパ節転移と遠隔転移との相関はロジスティック回帰モデルで検討した。予後との相関

はCoxハザードモデル、またはKaplan-Meier法で検討した。

【基礎的研究】

<対象>

大腸癌培養細胞(HT29, LS174T)を用いた。

<方法>

大腸癌培養細胞にCEACAM1-4LまたはCEACAM1-4Sの強制発現、CEACAM1の強制抑制(shRNA)を行った。遺伝子導入はリポフェクション法を用いた。形態的变化を2次元または3次元(Matrigel™)で観察した。経時的にlumen formationの定量を行い、また発現変化はRT-PCR法、western blotting法にて定性・定量確認をした。

4. 研究成果

①大腸癌の臨床病理学的因子とCEACAM1発現とisoform balanceとの関連について検討

【臨床的研究】

1. CEACAM1の発現様式について

CEACAM1-L, Sともに、164例中149例(91%)で癌浸潤先達部において強発現していた。15例は全例、癌の浸潤が粘膜下層までにとどまる早期癌であり、CEACAM1-L, Sともに発現が低下していた。

2. CEACAM1 isoform balance と転移について

癌浸潤先達部における最も発現の強い部分の評価によりCEACAM1-L dominant群(n=94)とその他(n=70)に分類した。リンパ節転移とそれぞれの因子の単変量解析の結果、分化度(mod)、深達度(SS以深)、リンパ管浸潤陽性、血管浸潤陽性、CEACAM1-L isoform dominantがリンパ節転移に関与する有意な因子であった。これらの因子を用いた多変量解析の結果、深達度(SS以深)、リンパ管浸潤、CEACAM1-L isoform dominantが統計学的に有意であった($p=0.02$, $p=0.03$, $p<0.0001$)。血行性転移とそれぞれの因子の単変量解析の結果、分化度(mod)、深達度(SS以深)、リンパ管浸潤陽性、血管浸潤陽性、CEACAM1-L isoform dominantが血行性転移に関与する有意な因子であった。これらの因子を用いた多変量解析の結果、CEACAM1-L isoformのみが有意な因子であった($p=0.0092$)。

3. CEACAM1 isoform balance と生存率について

Cox比例ハザードモデルで、単変量解析で生存率に有意に関連のあったものは、リンパ管浸潤、リンパ節転移、血行性転移のあるものと、CEACAM1-L dominant群であった。多変量解析では生存率に有意に関連のあったものは、血行性転移のあるもの($p=0.0027$)と、CEACAM1-L dominant群($p=0.02$)であった。

Kaplan-Meier法で、CEACAM1の発現強度で生存率を比較したところ、有意差を認めなかつたが($p=0.10$)、CEACAM1 isoform balanceで比較したところ、有意差を認めた($p<0.0001$)。

【基礎的研究】

1. CEACAM1-Lの発現と大腸癌の浸潤・遊走に関する検討

CEACAM1-Lを強く発現するLS174T細胞をshRNAを用いてCEACAM1発現をknockdownしたところ、vector controlと比較してinvasion ($p<0.01$), migration ($p<0.01$)ともに抑制された。

2. CEACAM1 isoform balance と大腸癌の浸潤・遊走に関する検討

CEACAM1を中等度発現するHT29細胞株にCEACAM1-Lを強制発現させ、isoform balanceを変化させたところ、vector controlと比較して、invasion ($p<0.01$), migration ($p<0.05$)ともに増強した。HT29細胞株にCEACAM1-Sを強制発現させたところ、vector controlと比較して、invasion ($p<0.05$), migration ($p<0.05$)ともに抑制された。CEACAM1-Lを強く発現するLS174T細胞株にCEACAM1-Sを強制発現させ、isoform balanceを変化させたところ、vector controlと比較して、invasion ($p<0.01$), migration ($p<0.05$)ともに抑制された。

②大腸癌発育先達部における管腔を伴う癌細胞巣の検討

【臨床的研究】

分化型癌細胞巣が存在している箇所連続切片を作製し、内腔にCEACAM1を発現した中空を伴う球体であると確認した。200倍視野において先達部以深の部分に1個以上の分化型癌細胞巣が存在するものを分化型癌細胞巣陽性と定義し、形態の特徴からSpheroid with a hollow (SWH)と呼称した。164例のうち、40例(24.4%)の腫瘍発育先達部にSWHを認めた。同細胞巣全例に、M30の発現があり、内腔のアポトーシスを認めた。また、CEACAM1-Shortではなく、CEACAM1-Longの強発現を認めた。314例のうち、96例(30.6%)にSWHを認め、131例(41.7%)にBuddingを認めた。リンパ節転移に関する検討では、単変量解析で6つの有意な因子が存在し、多変量解析でリンパ管侵襲陽性($p=0.001$; OR 4.170)とSWH陽性($p<0.001$; OR 5.407)が独立予測因子となった。遠隔転移に関する検討では、単変量解析で5つの有意な因子が存在し、多変量解析でBudding陽性($p=0.005$; OR 2.840)とSWH陽性($p<0.001$; OR 6.334)が独立予測因子となった。全生存に関する検討では、単変量解析で7つの有意な因子が存在し、多変量解析で遠隔転移陽性($p<0.001$; HR 3.799)とSWH陽性($p=0.001$; HR 2.849)が独

立危険因子となった。Kaplan-Meier 法で検討したところ、SWH 陽性群は有意に生存期間が不良であった ($p < 0.0001$, 5 年生存率 44.8%)。

【基礎的研究】

HT29 細胞は CEACAM1 を中等度発現する細胞株であり、isoform バランスを変化させることを目的に実験を行った。HT29 細胞に CEACAM1-4L または -4S を遺伝子導入すると経時的な管腔形成能はそれぞれ有意に増強または減弱した。CEACAM1-Long の発現の強い LS174T 細胞は分化型癌細胞巢と類似した状態であると想定して実験を行った。LS174T 細胞に CEACAM1-shRNA を遺伝子導入し、knock down させると経時的な管腔形成能は有意に減弱した。LS174T 細胞に isoform バランスの変化を促すことを目的として CEACAM1-4S を遺伝子導入すると CEACAM1-Long の発現は減弱し、経時的な管腔形成能は有意に減弱した。

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 Re-expression of CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and migration of colorectal cancer. Ieda J, Yokoyama S, Tamura K, Takifuji K, Hotta T, Matsuda K, Oku Y, Nasu T, Kiriyama S, Yamamoto N, Nakamura Y, Shively JE, Yamaue H. *Int J Cancer*. 2011 Mar 16. doi: 10.1002/ijc.26072. [Epub ahead of print], 査読有

[学会発表] (計 7 件)

① 横山省三、田村耕一、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、奥 善全、那須 亨、橋本忠通、山本直之、岩本博光、山上裕機：大腸癌発育先進部間質に浸潤性に存在する腺管形成—budding との比較— 第 111 回日本外科学会 2011, 5, 6, 東京

② Shozo Yokoyama, Koichi Tamura, Junji Ieda, Shigehisa Kiriyama, Katsunari Takifuji, Tsukasa Hotta, Kenji Matsuda, Yoshimasa Oku, Toru Nasu, Naoyuki Yamamoto, John E. Shively, and Hiroki Yamaue: CEACAM1 expressing spheroid with a hollow beyond the invasive margin indicates the malignant potential of colorectal cancer. AACR 102nd Annual Meeting 2011, 4, 6, Orlando

③ 横山省三、田村耕一、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、奥 善全、那須 亨、橋本忠通、山本直之、岩本博光、山上裕機：新たな治療ターゲットである大腸癌発育先進部の分化型細胞巢 第 44 回制癌剤適応研

究会 2011, 3, 11, 熊本

④ 横山省三、田村耕一、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、奥 善全、那須 亨、橋本忠通、山本直之、岩本博光、山上裕機：大腸癌先進部の CEACAM1 を発現する中空を伴う球体形成の臨床的意義 第 23 回日本バイオセラピー学会 2010, 12, 10, 大阪

⑤ 横山省三、田村耕一、家田淳司、瀧藤克也、堀田 司、松田健司、奥 善全、渡邊高士、那須 亨、桐山茂久、山本直之、John E. Shively、山上裕機：大腸癌先進部における中空を伴う球体形成の臨床的意義 第 69 回日本癌学会総会 2010, 9, 22, 大阪

⑥ Shozo Yokoyama, Koichi Tamura, Junji Ieda, Shigehisa Kiriyama, Katsunari Takifuji, Tsukasa Hotta, Kenji Matsuda, Yoshimasa Oku, Takashi Watanabe, Toru Nasu, Naoyuki Yamamoto, John E. Shively, and Hiroki Yamaue: CEACAM1 and CD133 expressing Spheroid with hollow at the invasion front of colorectal cancer -Novel metastatic and tumor initiating phenotype-. 9th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society 2010, 8, 25, Gifu.

⑦ Shozo Yokoyama, Koichi Tamura, Junji Ieda, Shigehisa Kiriyama, Katsunari Takifuji, Tsukasa Hotta, Kenji Matsuda, Yoshimasa Oku, Takashi Watanabe, Toru Nasu, Naoyuki Yamamoto, John E. Shively, and Hiroki Yamaue: Spheroid with hollow induced by CEACAM1 at the invasion front of colorectal cancer indicates tumor initiating growth and malignant potential. 20th Annual International CEA Symposium 2010, 8, 11, Montreal, Canada.

[その他]

ホームページ等

和歌山県立医科大学第 2 外科のホームページ (<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/2nd-surgery/>)にて発表論文を公表している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 省三 (YOKOYAMA, SHOZO)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号：90398462

(2) 研究分担者

堀田 司 (HOTTA, TSUKASA)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号：50244744

瀧藤 克也 (TAKIFUJI, KATSUNARI)
和歌山県立医科大学 医学部 講師
研究者番号 : 00254540

松田 健司 (MATSUDA, KENJI)
和歌山県立医科大学 医学部 助教
研究者番号 : 30398458

山上 裕機 (YAMAUE, HIROKI)
和歌山県立医科大学 医学部 教授
研究者番号 : 20191190