

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591708

研究課題名（和文） 間質細胞を介した新しい大腸癌治療法の開発

研究課題名（英文） A novel therapeutic strategy for colorectal cancer using stromal cells

研究代表者

古畑 智久 (FURUHATA TOMOHISA)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80359992

研究成果の概要（和文）：大腸癌間質組織における VEGF-A の発現は予後良好因子である。間質組織で発現している VEGF-A は、血管新生抑制能をもつスプライスバリエントである VEGF165b である。

研究成果の概要（英文）：VEGF-A expression in stromal tissue is thought to be a better prognostic factor and VEGF165b, which is mainly expressed in stromal tissue, inhibits the angiogenesis in colorectal cancer

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌、VEGF-A、マクロファージ、線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

一般に VEGF-A の発現は、癌の予後不良因子として認識されており、癌治療の臨床においては、分子標的のひとつとなっている。Khorana AA らは、大腸癌間質組織における VEGF-A 発現が予後良好因子であることを報告した (Cancer. 2003 Feb 15;97(4):960-8)。しかし、なぜ大腸癌の予後不良因子とされていた VEGF-A が間質で発現すると予後良好因子となるかについては、全く検討されておらず、今後の研究課題とされていた。

## 2. 研究の目的

大腸癌間質に発現する VEGF-A の解析を

行い、予後良好因子となる機序について検討を行う。さらに大腸癌間質において VEGF-A を発現している細胞の同定を行い新しい治療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

- ① 間質 VEGF-A 発現と臨床病理学的因子との関連を解析する。
- ② 大腸癌手術検体を用い、大腸癌間質における VEGF-A 陽性群、陰性群での生存率解析を行う。
- ③ Laser Capture Micro-dissection(LCM)法にて腫瘍組織と間質組織から検体を採取し、RNA の抽出を行う。

- ④ VEGF-A スプライスバリエント特異的なプライマーを作成し、RT-PCRにて発現解析を行う。
- ⑤ 間質組織で発現する VEGF-A スプライスバリエントと臨床病理学的因子との関連を解析する。
- ⑥ 間質組織で VEGF-A を発現する細胞の同定を行う。
- ⑦ 大腸癌細胞と間質細胞の相互関係を *in vitro* で解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### ① 間質 VEGF-A 発現と臨床病理学的因子との関連

間質 VEGF-A 発現は、臨床病期 ( $p=0.004$ )、腫瘍深達 ( $p=0.01$ )、血管侵襲 ( $p=0.015$ )、リンパ管侵襲 ( $p=0.04$ ) と逆相関を認めた。組織型との関連はなかった (表 1)。

表 1 VEGF-A 発現と臨床病理学的因子

	<i>n</i>	Tumor VEGF positive cases	Stromal VEGF positive cases
<b>TNM stage</b>			
0	9	1 (11.1)	7 (77.8)
I	16	2 (12.5)	6 (37.5)
II	55	32 (58.2)	33 (60.0)
III	66	38 (57.6)	22 (33.3)
IV	19	16 (84.2)	5 (26.3)
Total	165	89 (53.9)	73 (44.2)
		$P < 0.0001$	$P = 0.004$
<b>T factor</b>			
Tis	9	1 (11.1)	7 (77.8)
T1	7	0 (0.0)	6 (85.7)
T2	25	9 (36.0)	11 (44.0)
T3	111	70 (63.1)	45 (40.5)
T4	13	9 (69.2)	4 (30.8)
Total	165	89 (53.9)	73 (44.2)
		$P = 0.0002$	$P = 0.01$
<b>Histological differentiation</b>			
Well	47	15 (31.9)	23 (48.9)
Moderate	95	63 (66.3)	41 (43.2)
Poor	8	3 (37.5)	4 (50.0)
Mucinous	10	5 (50.0)	2 (20.0)
Other	5	1 (20.0)	3 (60.0)
		NS	NS
<b>Venous invasion</b>			
v0	46	14 (30.4)	27 (58.7)
v1	73	43 (58.9)	29 (39.7)
v2	32	23 (71.9)	15 (46.9)
v3	14	9 (64.3)	2 (14.3)
		$P = 0.001$	$P = 0.015$
<b>Lymphatic invasion</b>			
ly0	53	16 (30.1)	26 (49.1)
ly1	79	48 (60.8)	39 (49.4)
ly2	28	20 (71.4)	7 (25.0)
ly3	5	5 (100.0)	1 (20.0)
		$P < 0.0001$	$P = 0.04$

##### ② Stage II, III 大腸癌における生存率解析

腫瘍組織の VEGF-A 発現による解析では、5 年無再発生存率は、陽性群 51.4%、陰性群 62.9% で有意差を認めなかった ( $p=0.24$ ) (図 1A)。間質組織の VEGF-A 発現による解析では、5 年無再発生存率は、陽性群 73.8%、陰性群 39.9% で有意差を認めた ( $p=0.0005$ ) (図 1B)。

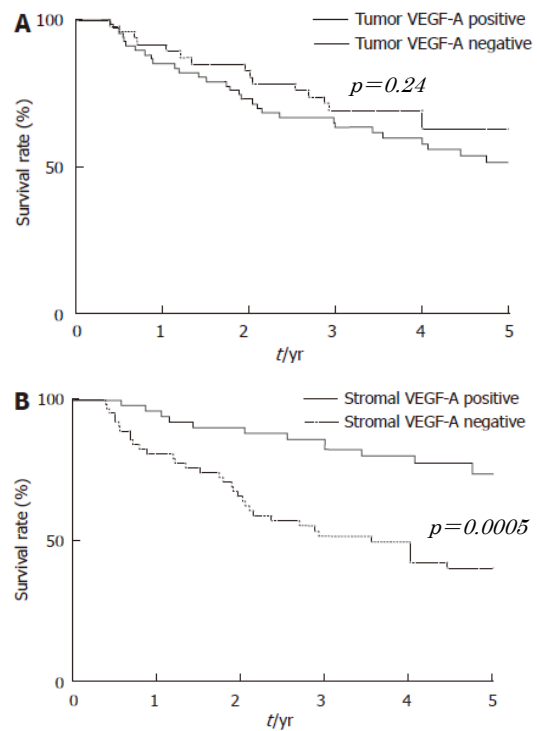


図 2 VEGF-A 発現と無再発生存率

大腸癌再発に関わる因子についての単変量解析では、臨床病期、脈管侵襲、リンパ管侵襲、間質部・腫瘍部 VEGF-A の全てが有意な危険因子であったが、多変量解析では、間質部 VEGF-A 発現のみが、有意な危険因子 ( $p=0.0033$ ) であった。

表 2 再発危険因子の解析

Factor	<i>n</i> (Recurrence)	Univariate analysis		
		Relative risk	95% CI	<i>P</i> value
<b>Clinical stage</b>				
0	9 (1)	2.120	1.302-3.451	0.0250
I	16 (3)			
II	55 (15)			
III	66 (32)			
<b>Venous invasion</b>				
v0	46 (12)	1.500	1.050-2.143	0.0260
v1	63 (27)			
v2	27 (6)			
v3	10 (6)			
<b>Lymphatic invasion</b>				
ly0	52 (13)	2.094	1.354-3.238	0.0010
ly1	68 (24)			
ly2	23 (12)			
ly3	3 (2)			
s-VEGF-A positive	68 (14)	0.269	0.135-0.535	0.0002
t-VEGF-A positive	73 (31)	2.340	1.218-4.495	0.0110
Total	146 (51)			
<b>Multivariate analysis</b>				
Factor	<i>n</i> (Recurrence)	Relative risk	95% CI	<i>P</i> value
<b>Clinical stage</b>				
0	9 (1)	1.718	0.980-3.010	0.0586
I	16 (3)			
II	55 (15)			
III	66 (32)			
<b>Venous invasion</b>				
v0	46 (12)	0.812	0.504-1.307	0.3907
v1	63 (27)			
v2	27 (6)			
v3	10 (6)			
<b>Lymphatic invasion</b>				
ly0	52 (13)	1.27	0.714-2.261	0.4155
ly1	68 (24)			
ly2	23 (12)			
ly3	3 (2)			
s-VEGF-A positive	68 (14)	0.309	0.141-0.676	0.0033
t-VEGF-A positive	73 (31)	1.918	0.768-3.718	0.1918
Total	146 (51)			

③LCM 法による腫瘍部、間質部の組織採取  
大腸癌 20 症例から組織を用い、LCM 法にて腫瘍部および間質部の組織を選択的に採取した。

④VEGF-A スプライスバリエント発現解析  
LCM 法で採取した組織から RNA を抽出し、cDNA を合成した。VEGF-A はスプライスバリエント (図 2) が存在することが知られているので、それぞれを特異的に増幅する PCR プライマーを作成した。

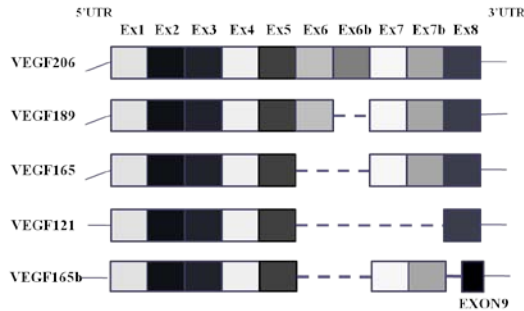


図 2 VEGF-A のスプライスバリエント

その結果、腫瘍部では、血管新生能を有する VEGF165 の発現を認め(A)、間質部では、VEGF165 の他に、血管新生抑制能を有する VEGF165b の発現を認めた(B)。

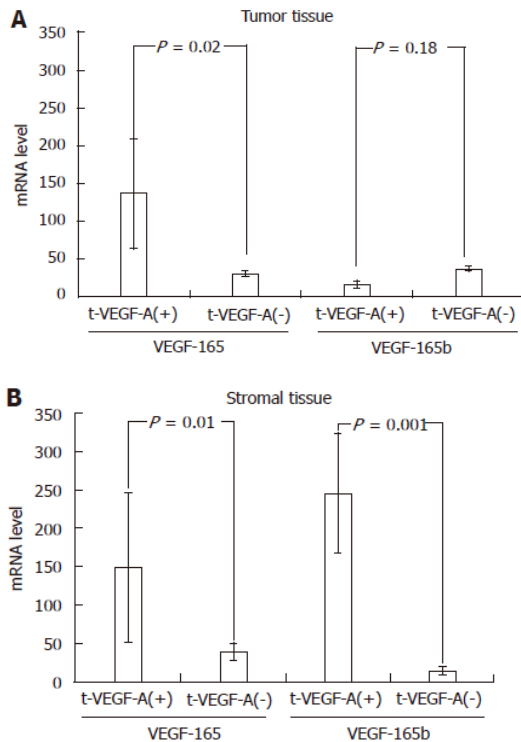


図 3 VEGF165, VEGF165b の発現解析

⑤VEGF165b 発現と臨床病理学的因子との関係

脈管侵襲を認めない症例で有意に VEGF165b の発現量の上昇を認めた ( $p=0.03$ )

(A)。リンパ管侵襲と VEGF165b の発現量は特に相関を認めなかった(B)。

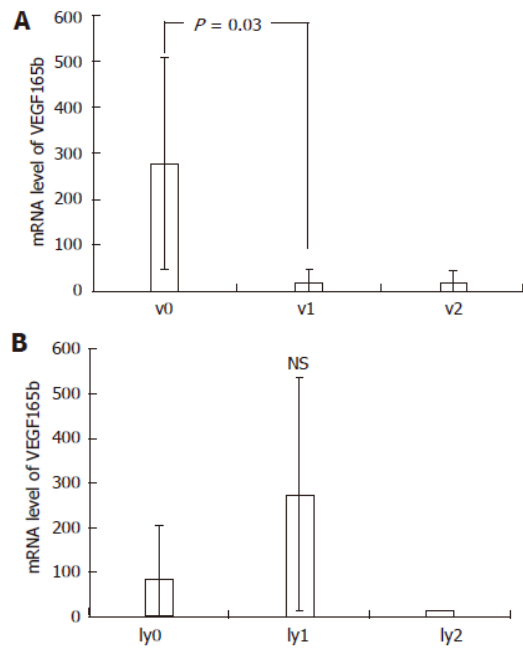


図 4 VEGF165b 発現と脈管侵襲、リンパ管侵襲の関連

⑥間質組織で VEGF-A を発現する細胞の同定

間質組織で VEGF-A を発現する細胞を同定するために、VEGF-A と各種細胞マーカー ( $\alpha$  SMA, CD68, CD34, CD11b, CD31 など) の 2 重免疫染色を行った。その結果、間質での VEGF-A を産生する細胞は、マクロファージと線維芽細胞が主体であることが判明した。

⑦大腸癌細胞と間質細胞の相互関係 (in vitro) での解析

大腸癌細胞株と間質細胞の相互関係を調べるためにマクロファージのサロゲートとして THP-1、繊維芽細胞のそれとして F9 細胞を用いた。大腸癌細胞、THP-1、F9 の単独培養、大腸癌細胞と間質細胞の共培養を行い、それぞれの細胞を採取、RNA を抽出し、間質細胞の VEGF-A の発現解析を行ったところ、THP-1 および F9 の両方で VEGF-A の発現を認めたが、THP-1 のほうが共培養による発現誘導効果が高く、さらに強発現していることが確認された。

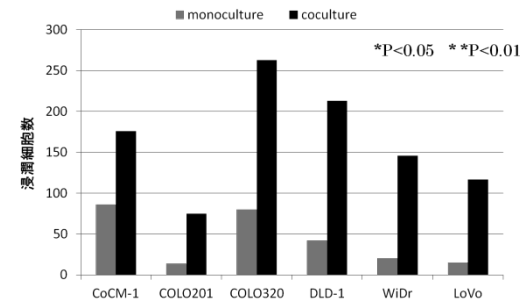


図 5 大腸癌細胞株の単独培養、大腸癌細胞株と THP-1 の共培養における大腸癌細胞株浸潤能の解析

大腸癌細胞株と THP-1 の共培養で、癌細胞の性質の変化を検討するために、Invasion assay を行った。その結果、使用した 6 種類の大腸癌細胞株において浸潤能更新を認め (図 5)、さらに共培養した THP-1 細胞の MMP-2 の発現誘導が示された (図 6)。したがって、この実験系は、大腸癌細胞の進展促進に関わるモデルの可能性が高いものと判断された。したがって、新たな実験系の考案が必要と考えられた。

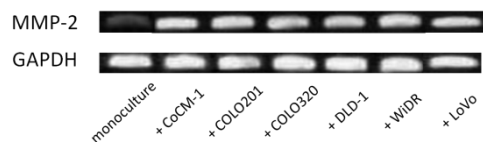


図 6 大腸癌細胞株と THP-1 の共培養における THP-1 の MMP-2 発現解析

#### 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 5 件)

- ① Tayama M, Furuhata T, Inafuku Y, Okita K, Nishidate T, Mizuguchi T, Kimura Y, Hirata K. Vascular endothelial growth factor 165b expression in stromal cells and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2011 Nov 28;17(44):4867-74. 査読有
- ② Koizumi W, Boku N, Yamaguchi K, Miyata Y, Sawaki A, Kato T, Toh Y, Hyodo I, Nishina T, Furuhata T, Miyashita K, Okada Y. Phase II study of S-1 plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2010 Apr;21(4):766-71. 査読有
- ③ Furuhata T, Meguro M, Nishidate T, Okita K, Ishiyama G, Iwayama Y, Hosokawa Y, Tsuruma T, Kimura Y, Mizuguchi T, Sasaki K. Effects of a low-fat meal on the oral bioavailability of UFT and leucovorin in patients with colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2009 Dec;14(6):529-33. 査読有
- ④ Meguro M, Furuhata T, Okita K, Nishidate T, Ishiyama G, Iwayama Y, Kimura Y, Mizuguchi T, Hirata K. Clinical compliance with an oral uracil/tegafur (UFT) plus leucovorin (LV) regimen as adjuvant chemotherapy in Japanese colorectal cancer patients. *Int J Clin Oncol*. 2009 Oct;14(5):402-7. 査読有
- ⑤ Inafuku Y, Furuhata T, Tayama M, Okita K, Nishidate T, Mizuguchi T, Kimura Y, Hirata K. Matrix metalloproteinase-2 expression in stromal tissues is a consistent prognostic factor in stage II colon cancer. *Cancer Sci*. 2009 May;100(5):852-8. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 田山 誠、古畑智久 MMP-2 発現解析による Stgae2 結腸癌の悪性度診断 第 65 回日本消化器外科学会総会 2010 年 7 月 15 日 下関
- ② 古畑智久 大腸癌における VEGF165b 発現解析の臨床的意義. 第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010 年 4 月 10 日 名古屋
- ③ Furuhata T Matrix metalloproteinase 2 expression in stromal tissues is a consistent prognostic factor in Stage II colon cancer. *International Surgical Week 2009 7<sup>th</sup> Sep 2009 Adelaide, Australia*

[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  
古畑 智久 (FURUHATA TOMOHISA)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80359992
- (2)研究分担者  
西舘 敏彦 (NISHIDATE TOSHIHIKO)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80404606  
木村 康利 (KIMURA YASUTOSHI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80311893  
沖田 憲司 (OKITA KENJI)  
研究者番号：70517911