

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790640

研究課題名（和文） 新規発見コレクチンの大腸癌での機能解析

研究課題名（英文） Analysis of novel collectin, CL-K1 function in colorectal cancer

研究代表者

本村 亘（MOTOMURA WATARU）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70374791

研究成果の概要（日本語）：組織アレイを用い human CL-K1 に対する抗体を使用した免疫組織染色によりマウスの組織分布と同様に各組織での上皮での発現が多く認められた。また、組織での癌部、非癌部を併せた組織アレイを使用した結果、甲状腺癌、胃癌、大腸癌などの癌部で非癌部より発現が上昇していた。旭川医科大学病院よりの胃癌組織 42 例、大腸癌組織 98 例の検討にて癌部で発現上昇が認められ、浸潤部で発現が上昇していること、特に大腸組織においては腺腫、腺癌の順に発現が上昇していることが明らかとなり、発癌、浸潤に関わる可能性が示唆され、また、腫瘍マーカーとしての活用の可能性も見いだされた。

研究成果の概要（英文）：The present study aimed to determine CL-K1 expression in tumorigenesis of human gastrointestinal (GI) malignancies. We examined CL-K1 distribution in normal human and cancer tissues by using tissue arrays. We also examined CL-K1 distribution in stomach and colorectal tissue and performed immunohistochemical analyses to determine its expression in epithelial and connective tissues. Real-time PCR and immunohistochemical analyses demonstrated that CL-K1 expression in humans resembles that in mice, and in human cancer tissues, CL-K1 expression tends to be elevated. Our examination of 42 human gastric tissues showed that CL-K1 protein expression was frequently observed in gastric cancer tissues compared with that in adjacent normal mucosa. In addition, in 98 human colorectal tissues, CL-K1 expression showed a significant gradual increase with progression to malignancy. Moreover, CL-K1 expression tended to be higher in invasive cancer tissues than in non-invasive cancer tissues. CL-K1 was expressed in the proximal tubules in the kidneys, vascular portion of several organs, hepatocytes in the liver, and mucosa in the gastrointestinal tract. It is of interest that the CL-K1 expression profile in humans is similar to that in mice. In a study of 140 specimens of GI tract tissues, CL-K1 up-regulation correlated with malignancy. Together, these histological and pathological findings may be useful in furthering our understanding of biological functions in cancer tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
2010年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 消化器内科学

キーワード：コレクチン、大腸癌、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

大腸癌罹患率が上昇している；近年日本人において西洋的食事、高脂肪食の導入により、大腸癌の罹患率および死亡率は増加し続けています。

コレクチン (Collectin)；コレクチンは自然免疫に関わる C-タイプ (カルシウムイオン依存的) レクチンのサブグループで、コラーゲン様領域と糖認識領域を同じ分子内に持つ特徴的な構造を持つ。ヒトコレ

クチンは mannose binding lectin (MBL) と 2 種類の肺 surfactant protein (SP-A, SP-D) が知られている。MBL は肝臓で合成され血清に分泌されるコレクチンで、MBL 受容体を介した補体活性化経路あるいはオプソニン化を介して殺菌作用を示す (Schweinle JE. et. al, JCI, 1989)。SP-A および SP-D は肺の肺胞 II 型細胞やクララ細胞で産生され、細菌のオプソニン化およびウイルス増殖の不活化を介在する (Madsen J. et. al, JI, 2000)。このようにコレクチンはヒトが生来有する基本的な受動免疫メカニズムと考えられている。

新規コレクチン (CL-K1) の発見；我々は新規の 3 つのコレクチン Collectin liver 1 Collectin placenta 1、そして Collectin kidney 1 (CL-K1) を発見し、新しいタイプのコレクチンとしてその特徴を報告した。その中で CL-K1 についてはシグナル配列を有し分泌タイプであること、またフコースやマンノースなどの糖やリポポリサッカライド (LPS) およびリポテイコ酸 (LTA) など細菌の糖脂質に結合すること、さらには CL-K1 特異抗体を使用した免疫組織染色により食道、胃、大腸などの消化管上皮、気管上皮、皮膚上皮など生体防御に重要な部分に多く発現していることなどを明らかにし (Motomura et. al, J HC, 2008)、自然免疫において重要な働きをしている可能性を報告した。さらに、当大学消化器血液腫瘍制御内科学との共同研究により、CL-K1 は大腸正常粘膜に比べ大腸癌組織で発現が著しく亢進していること、大腸腺腫においても正常粘膜に比べ大腸癌ほどではないが発現が亢進していることを発見し、癌化や癌細胞の増殖、浸潤に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、分泌蛋白質であることを考慮すると、腫瘍マーカーとしての臨床応用の可能性が示唆される。

2. 研究の目的

従来、生体防御レクチンと考えられていたコレクチン分子の癌との関係、特に組織での発現を検討することにより癌組織における機能解析に役立てる。

3. 研究の方法

1) サンプル

免疫染色用の Multiple normal tissues (FDA normal human survey; ARY-HH0122) と cancer tissues (10-carcinoma (3 cases each); ARY-HH0040) は KURABO より購入。

2) 胃癌組織の組織学的分類

旭川医科大学病院より胃癌組織を 42 例抽出した。胃癌のステージは 8 例の T1, 14 例の T2, 18 例の T3, 2 例の T4 である。分類は Ohmura classification (Ohmura et al HUM PATHOL 2000) に従った。19 例の

complete-intestinal type (CI type), 11 例の ordinary type (O-type) と 12 例の gastric type (G-type) に分類された。

3) 大腸癌組織の組織学的分類

旭川医大にて大腸組織を 98 例抽出した。大腸組織は 8 例の正常組織、31 例の腺腫と 59 例の腺癌であった。大腸癌のステージは 8 例の Tis, 30 例の T1, 21 例の T2-4。

4) 胃癌組織からの RNA 採取

RNA は胃内視鏡検査での新鮮サンプルを使用し、胃癌の癌部分と非癌部を採取し精製した。c DNA を「作成した。

5) リアルタイム PCR

Real-time PCR は 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を使用した。Taqman probe primer は human CL-K1 (Hs0038816-m1)。

6) 免疫組織染色

ABC 方で染色し、Motomura et. al, J Histochem Cytochem, 2008、に従った。

4. 研究成果

1) ヒト正常組織における CL-K1 の分布

Supplementary figure 1A のように副腎、腎臓小腸、肝臓で発現が高く、食道などの消化管、心臓、精巣でも発現を認めた。CL-K1 特異抗体を使用した免疫染色の結果 (Supplementary figure 1B) 腎臓の糸球体メサンギウム細胞、近位尿管に発現が多く、他に各臓器の血管平滑筋、脳の神経細胞、肝細胞に多く発現していた。以前報告したマウスでの分布と酷似している。また、消化管では上皮に多く発現していた。

2) ヒト癌組織と非癌部での発現検討

Figure 1 に示すとおり食道、胃、大腸などの消化管癌組織で隣接する正常部分より CL-K1 の発現が高い傾向にあった。さらに腎癌、甲状腺癌でも正常部分に比べ発現が増強していた。ヒトの組織においては癌化により発現が上昇することが示唆される。

3) 胃癌組織での癌部分、非癌部での CL-K1 mRNA の発現比較

内視鏡により 5 例の新鮮な組織を採取し realtimePCR を行った。Figure 1A に示すとおり全例で CL-K1 の発現は癌部で上昇していた。

4) 胃癌での CL-K1 の発現を免疫組織学的に検討

CL-K1 蛋白は癌部、非癌部ともに発現を認めたが癌部でより発現の上昇を認めた

(Figure 2B)。さらに癌組織での間質での発現を検討すると正常組織に比べ癌組織の間質での発現も上昇していることは明らかとなった。発現量を分類し上皮、間質で検討すると Figure 2C に示すとおり癌部で非癌部に比べ CL-K1 の発現が上昇していることが示された。また、modified Ohmura classification を使用しムチンのタイプでの検討で

Figure 2D に示すとおり CI type で CL-K1 の発現が上昇傾向にあった。

5) 大腸癌組織におけるCL-K1の免疫組織学的発現の検討

CL-K1蛋白は正常組織、腺腫、腺癌組織のすべてで発現を認めた。Figure3A、3Dで示すとおりCL-K1は正常、腺腫、腺癌の順に発現の上昇を認めた。同一組織で正常、腺腫、腺癌が混在している場合に関し、悪性度に従いCL-K1の発現が上昇している傾向にあった

(Figure3A)。また、間質での発現の検討に関しても同様の傾向を認めた。さらに個々の組織での検討において癌組織においては浸潤部で発現がより強い事が示唆された(Figure3C)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本村 亘 (MOTOMURA WATARU)

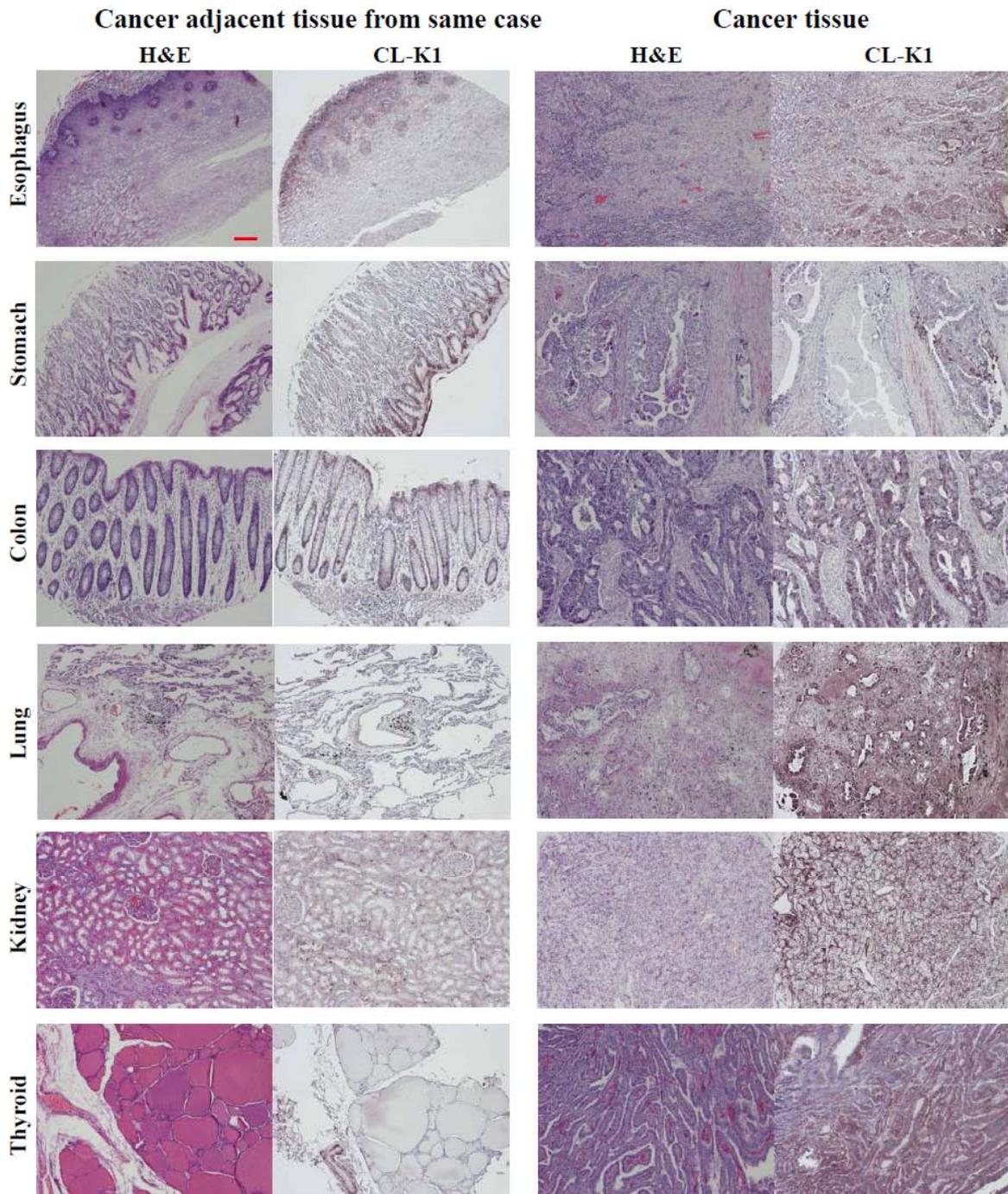
旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70374791

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し

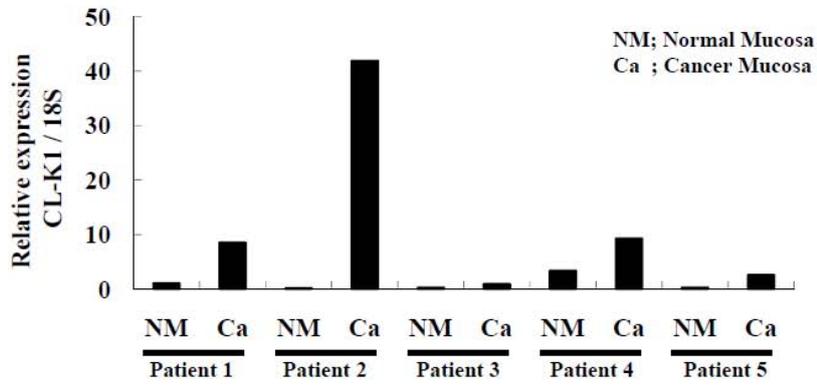
Figure 1



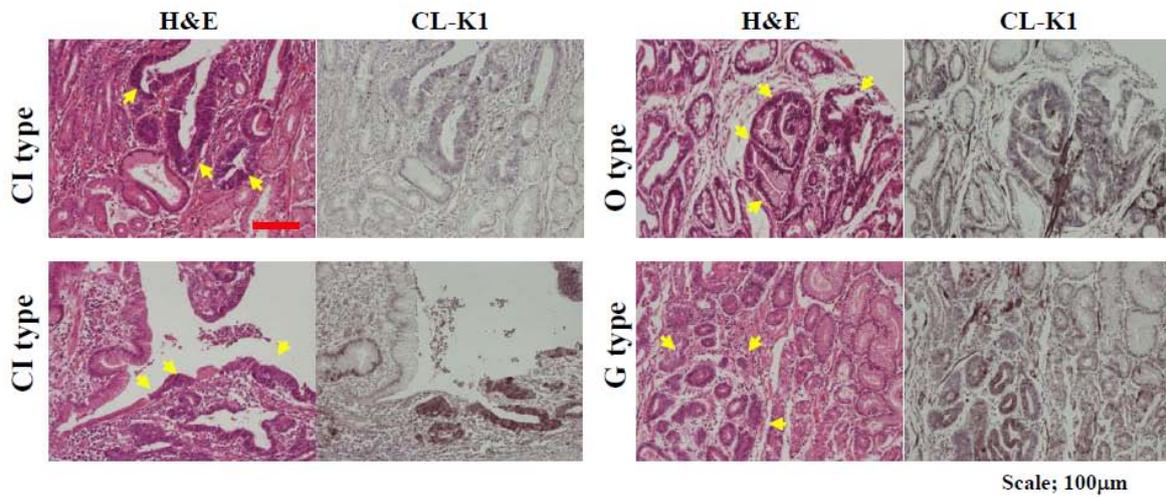
Scale: 100µm

Figure 2

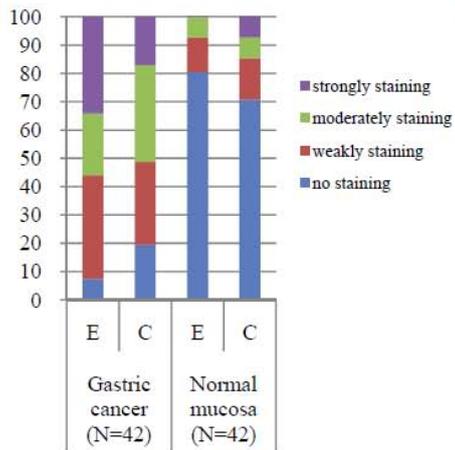
A



B



C



D

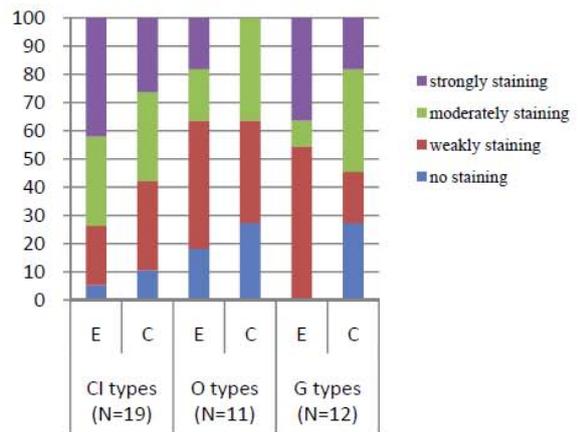
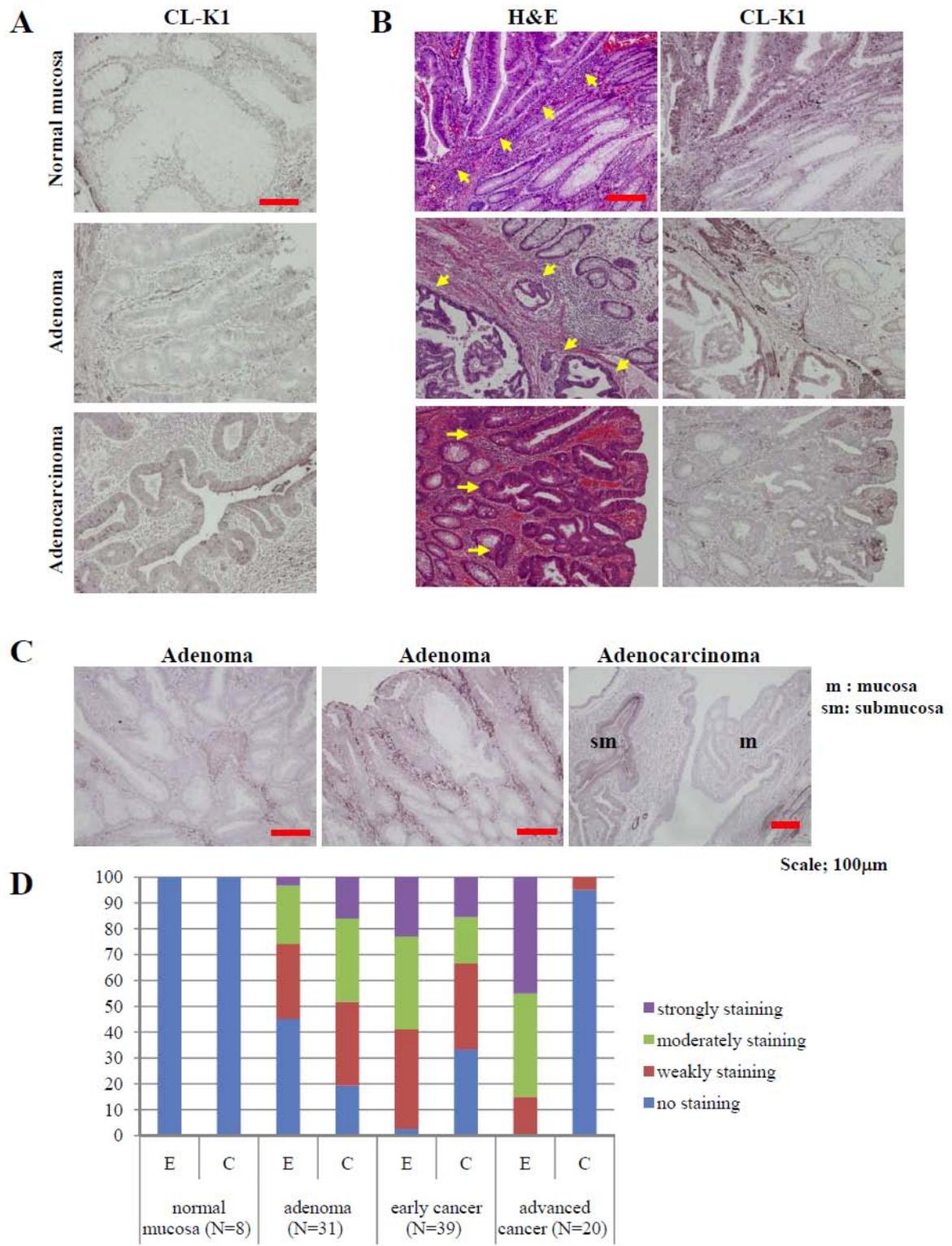
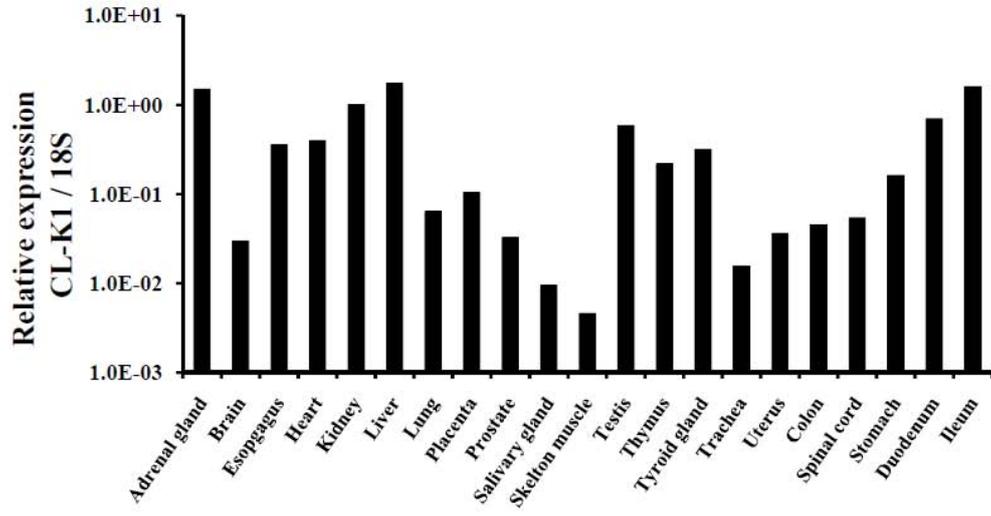


Figure 3



Supp 1

A



B

