

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591978

研究課題名(和文)大腸癌間質に着目した再発リスクに関わるバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search of novel biomarkers as prognostic factors focused on the stromal cells in patients with colorectal cancer

研究代表者

古畑 智久 (FURUHATA, TOMOHISA)

札幌医科大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80359992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌間質組織に存在する癌関連線維芽細胞は、癌の進展に重要な役割をすると考えられている。大腸癌細胞株と線維芽細胞株の共培養によって、線維芽細胞のMMP-2が誘導され、癌細胞の浸潤能が亢進することが観察された。線維芽細胞のMMP-2発現を誘導する因子としてEMMPRINが考えられる。大腸癌の臨床検体を用いた免疫組織学的検討では、EMMPRIN、MMP-2ともに約半数の症例で発現していた。両者の発現には有意な関連を認め、EMMPRINによるMMP-2誘導を示唆する結果であった。予後因子の解析では、有意な因子を見出すことはできなかったが、EMMPRINとMMP-2の同時発現が有意な傾向を示していた。

研究成果の概要(英文)：It has been thought that cancer associated fibroblasts have important roles on invasive behavior of colorectal cancer. MMP-2 expression in fibroblasts and invasive potential in cancer cells are induced in co-culture with fibroblasts and colon cancer cell lines. EMMPRIN produced in cancer cells may induce MMP-2 expression in fibroblasts. Immuno-histochemical staining demonstrates EMMPRIN and MMP-2 expression in half of cases in Stage 2 and 3 colorectal cancer patients. Correlation between EMMPRIN and MMP-2 expression is observed and statistically significant ($p=0.025$). This results imply that MMP-2 expression in fibroblasts is induced by EMMPRIN originated from cancer cells. We can not find out significant prognostic factors in this series. Both expression of MMP-2 and EMMPRIN may have some trends on survival of patients with Stage 2 and 3 colorectal cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 間質細胞 MMP-2 EMMPRIN 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

大腸癌研究会によって作成された大腸癌治療ガイドライン医師用 2010 年度版, によると補助化学療法の適応基準は, 「治癒切除が行われた Stage3 結腸癌, 主要臓器機能が保たれている, 再発高リスク Stage2 結腸癌に術後補助療法を行う場合もある。」である。現段階では, 臨床病理学的所見を中心に, 大腸癌を病期分類し, 化学療法の適応を決定しているが, オーダーメイド医療が求められてきている現状を考えるとさらなる細分類が必要と思われる。網羅的な遺伝子発現解析やゲノム解析などが進み, ColoPrint は, 18 遺伝子の発現解析をすることによって Stage2 および 3 の再発リスク分類を行う非常に有用な方法として発表されている¹⁾。しかしながら, 先進的解析の手法を駆使し詳細な情報を取得することは技術的には可能ではあるが, そのために費やす時間とコストを考慮すると, 現時点では多くの大腸癌患者に適用していくことは効率的であるとはいえない。われわれは, 現行の病期分類に切除標本の免疫組織学的検討および簡便な遺伝子解析による情報を加えることによって再発リスク分類を行うことを目標としている。癌細胞が血管およびリンパ管内に進展していくためには基底膜を通過する必要があるが, MMP はその際の重要な分子のひとつとして広く認識されている。われわれは, 癌細胞および間質細胞の両方に発現を認める MMP-2 に着目し, その発現パターンと予後との関係について解析を行ったところ, 癌細胞における発現 (t-MMP-2) ではなく, 間質細胞における発現 (s-MMP-2) が予後因子となることを見出した²⁾。そこで, 癌周囲の間質組織で MMP-2 を発現していると考えられる線維芽細胞, いわゆる腫瘍関連線維芽細胞に着目し腫瘍の

進展の機序を解明するとともに, そこに関連する分子の臨床的な意義を検討することを本研究の目標とする³⁾。

2. 研究の目的

- (1)大腸癌間質組織・細胞に着目し, 新たなるバイオマーカーを見出す。特に, 先行研究によって, 重要性が明らかになっている間質に発現する MMP-2 関連分子について検討する。
- (2)バイオマーカーの Candidate となった分子について, 大腸癌の臨床検体を用いて, その有用性について検討する。

3. 研究の方法

- (1)大腸癌細胞株の EMMPRIN 発現を RT-PCR 法にて解析する。
- (2)大腸癌細胞株と線維芽細胞株の共培養系を確立する。
- (3)共培養系における癌細胞の浸潤能獲得について解析する。
- (4)共培養系における癌細胞の EMMPRIN, 上皮間葉転換 (EMT) 関連分子の発現, 線維芽細胞の MMP-2, FAR の発現を解析し, 癌細胞の浸潤能との関連を検討する。
- (5)大腸癌組織における EMMPRIN, 間質 MMP-2 の発現と関連性, 臨床的予後との関連性を解析し, バイオマーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

(1)大腸癌細胞と線維芽細胞の共培養

EMMPRIN を発現する 3 種類の大腸癌細胞株と線維芽細胞株の共培養を行った。線維芽細胞単独培養に比べ, 共培養における線維芽細胞の MMP-2 発現は亢進していた (図 1)。この結果から, 大腸癌細胞株の産生する EMMPRIN によって, 線維芽細胞の MMP-2 の発現が誘導されることが予測される。

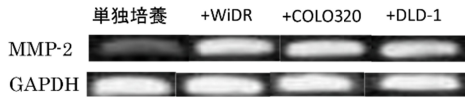


図1 線維芽細胞のMMP-2発現解析

(2) 癌細胞の浸潤能獲得

癌細胞の浸潤能を検討するためにマトリゲルを用いたインベーションアッセイを行った。癌細胞単独では、マトリゲルを通過する細胞はごくわずかであったが、線維芽細胞と共培養することによってマトリゲルを通過する細胞は増加していた(図2)。共培養で認められた癌細胞浸潤能獲得の機序のひとつとして、線維芽細胞の産生するMMP-2を利用している可能性が考えられた。

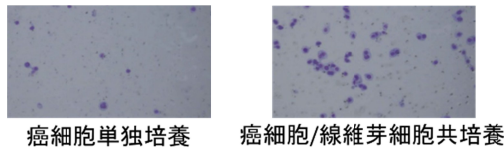


図2 マトリゲルを用いた浸潤能解析

(3) 臨床検体におけるEMMPRINとMMP-2の発現

Stage、大腸癌37例の切除標本を用い、免疫組織学的解析をEMMPRIN(CD147)とMMP-2について行った。EMMPRINは48.6%の症例で大腸癌組織に発現を認めた(図3)。MMP-2は56.8%の症例で大腸間質組織に発現を認めた(図3)。EMMPRINとMMP-2発現の関連性をカイ2乗検定で解析したところ $p=0.025$ であり、有意な関連を認めた(表1)。

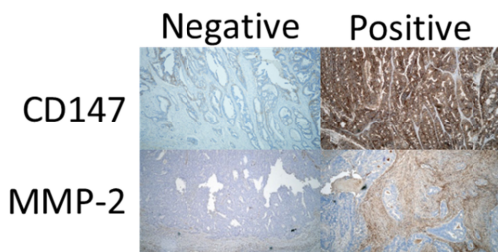


図3 大腸癌組織の免疫染色

表1 CD147とMMP-2発現の関連性

	CD147(+)	CD147(-)	計
MMP-2(+)	15	6	21
MMP-2(-)	3	13	16
計	18	19	37

$p=0.025$

(4) 大腸癌予後因子としてのEMMPRINとMMP-2の意義

癌関連死亡に関わる因子について、ロジスティック解析を行った(表2)。今回の検討では、有意な因子を見出すことはできなかったが、EMMPRINとMMP-2の同時発現が、予後因子として有意な傾向を示していた($p=0.077$, RR:2.23, 95%CI:0.83-5.99)。

表2 ロジスティック解析による予後因子の検討

因子	単変量解析			多変量解析		
	RR	95%CI	P値	RR	95%CI	P値
CD147(+)	1.28	0.96-1.71	0.08			
MMP2(+)	1.21	0.88-1.65	0.21			
CD147(+) MMP2(+)	1.32	0.90-1.94	0.08	2.23	0.83-5.99	0.08
リンパ管 侵襲	1.34	0.83-2.16	0.11	3.16	0.44-22.81	0.25
血管侵襲	0.34	0.07-1.63	0.15	2.94	0.40-21.84	0.29
腫瘍径	0.90	0.66-1.24	0.52			
深達度	1.13	0.63-2.03	0.61			
リンパ節 転移	1.03	0.75-1.43	0.83			

<引用文献>

1) Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, Lopez-Doriga A, Santos C, Marijnen C, Westerga J, Bruin S, Kerr D, Kuppen P, van de Velde C, Morreau H, Van Velthuysen L, Glas AM, Van't Veer LJ, Tollenaar R. Gene expression signature to improve prognosis

prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Jan 1;29 (1):17-24.

- 2) Inafuku Y, Furuhashi 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.
- 3) Buergy D, Fuchs T, Kambakamba P, Mudduluru G, Maurer G, Post S, Tang Y, Nakada MT, Yan L, Allgayer H. Prognostic impact of extracellular matrix metalloproteinase inducer: immunohistochemical analyses of colorectal tumors and immunocytochemical screening of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with gastrointestinal cancer. *Cancer.* 2009 Oct 15;115 (20):4667-78.

5 . 主な発表論文

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Kukita K, Tamura Y, Tanaka T, Kajiwara T, Kutomi G, Saito K, Okuya K, Takaya A, Kanaseki T, Tsukahara T, Hirohashi Y, Torigoe T, Furuhashi T, Hirata K, Sato N. Cancer-Associated Oxidase ERO1- α Regulates the Expression of MHC Class I Molecule via Oxidative Folding. *J Immunol.* 2015 May 15;194 (10):4988-96. DOI: 10.4049/jimmunol.1303228. 査読あり
- 2) Furuhashi T, Okita K, Nishidate T, Hirata K, Ohnishi H, Kobayashi H, Kotake K, Sugihara K; Study Group

for Peritoneal Metastasis from Colorectal Cancer by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. Oncological benefit of primary tumor resection with high tie lymph node dissection in unresectable colorectal cancer with synchronous peritoneal metastasis: a propensity score analysis of data from a multi-institute database. *Int J Clin Oncol.* 2015 Mar 12. Epub ahead of print DOI : 10.1007/s10147-015-0815-6. 査読あり

- 3) Furuhashi T, Okita K, Nishidate T, Ito T, Yamaguchi H, Ueki T, Akizuki E, Meguro M, Ogawa T, Kukita K, Kimura Y, Mizuguchi T, Hirata K. Clinical feasibility of laparoscopic lateral pelvic lymph node dissection following total mesorectal excision for advanced rectal cancer. *Surg Today.* 2015 Mar;45 (3):310-314. DOI: 10.1007/s00595-014-0906-4. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 小川宰司、廣端良彦、古畑智久、鳥越俊彦、平田公一、佐藤昇志. ヒト原発大腸癌組織からの幹細胞の分離とその機能解析 第 73 回日本癌学会総会 2014 年 9 月 パシフィコ横浜 (横浜市)
- 2) Furuhashi T, Okita K, Nishidate T, Tayama Y, Tayama M, Ueki T, Ito T, Kukita K, Zembutsu H, Kimjura Y, Hirata K. MMP-2 expression in stromal tissues is a consistent prognostic factor in Stage2 colon and

rectal cancer. 第 72 回日本癌学会総会
2013 年 10 月 パシフィコ横浜 (横浜市)

3) Ueki T, Nishidate T, Okita K, Kukita
K, Ogawa T, Furuhata T, Hirata K.
Expression of CD147 (EMMPRIN)
and MMP-2 in human colorectal
cancer. 第 72 回日本癌学会総会
2013 年 10 月 パシフィコ横浜 (横浜市)

4) Kukita K, Tamura Y, Kutomi G,
Okuya K, Saito K, Furuhata T, Torigoe
T, Hirata K, Sato N. hERO-1La acts as
a risk factor of recurrence via
regulation of tumor growth factors
under hypoxia in colorectal cancer. 第
71 回日本癌学会総会 2012 年 9 月 ホ
テルロイトン札幌 (札幌市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古畑 智久 (FURUHATA, Tomohisa)
札幌医科大学・保健医療学部・教授
研究者番号：80359992

(2)研究分担者

沖田 憲司 (OKITA Kenji)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：70517911