

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462066

研究課題名(和文)大腸癌先進部におけるEMTに関する検討

研究課題名(英文)Analysis about EMT at invasive front of colon cancer

研究代表者

小林 敬明 (Kobayashi, Takaaki)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：10439169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究においてケモカイン群(CCL9-10)が大腸癌浸潤先進部に強発現していた。それらケモカインの共通する受容体CXCR3の解析を行った。

CXCR3はアイソフォーム(CXCR3AとCXCR3B)を2つ持ち、大腸癌切除検体において癌全体にCXCR3Bが発現していた。先進部ではCXCR3B/CXCR3A比が癌中央部より有意に低かった。また、大腸癌細胞株においてCXCR3AはCCL10暴露下で増殖、浸潤、遊走を促進する事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Expressions of chemokines, CCL9-10 were increased at invasive front of colon cancer in previous study. We analysed common receptor, CXCR3 to those chemokines.

CXCR3 have two isoforms, CXCR3A and CXCR3B, expression of CXCR3 was overall increased in cancer tissue. The ratio of CXCR3B/CXCR3A was significantly high at invasive front. CXCR3A increased abilities of proliferation, invasion and motility for colorectal cancer cell lines.

研究分野：結腸癌

キーワード：結腸癌 浸潤先進部 EMT マイクロアレイ

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は深部へと浸潤し、脈管やリンパ管に進入し、肝や肺の臓器への遠隔転移やリンパ節転移を来す。深部への浸潤の機序は、細胞外基質や MMP (matrix metalloproteinase) をはじめとするプロテアーゼが関与することは知られていたが、その他に関与する分子のスクリーニングや、その関与度などに関しての報告は少ない。また、臨床的に癌の先進部における低分化低分化癌の存在は予後不良因子と考えられているが、分子生物学的な機序は不明であった。

先行研究において大腸癌の浸潤に関する機序を解明するため、大腸癌先進部特異的な遺伝子発現変化を有する遺伝子群のスクリーニングを行った。新鮮凍結切片における癌の先進部(先進部より 150 μm 以内)、中央部(先進部より 500 μm 以上離れ、かつ表層でない部分)よりマイクロダイゼクション法により癌細胞を採取した。癌先進部において発現が亢進している遺伝子群として、ケモカイン 4 遺伝子、細胞接着関連因子 3 遺伝子、酵素 2 遺伝子、トランスポーター 2 遺伝子、分化関連分子 2 遺伝子など合計 19 の遺伝子を選出された。

また、今回作製した遺伝子プロファイルでは先進部においては、Eカドヘリンが低下し、他間葉系マーカー(Nカドヘリン、ビメンチン、フィブロネクチン)は上昇する傾向があり、上皮間葉移行(EMT: Epithelial-mesenchymal transition 以下 EMT)の性質に近いことが分かった。

よって大腸癌先進部に高発現している分子と EMT との関連を解析することで、癌の浸潤の機序を明らかに出来る可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

大腸癌先進部における浸潤の機能解析として、発現が亢進している遺伝子群のうち多くを占めるケモカイン群に注目した。ケモカインは正常細胞においては白血球の遊走などを促進するため、本研究では癌浸潤の機序として考えられている EMT との関連を検討する。

### 3. 研究の方法

大腸癌先進部で有意に発現が亢進しているケモカイン群のうち共通の受容体をもつ CXCL9・10・11 の受容体である CXCR3 に注目し遺伝子発現と機能解析を行った。CXCR3 は CXCR3A、CXCR3B の二つのアイソフォームを持つため、実験は(1)大腸癌組織検体における CXCR3 及びバリエーションの発現の検討と(2)大腸癌細胞を用いたバリエーションの機能解析に分けておこなった。

### 4. 研究成果

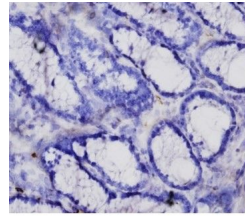
(1)大腸癌組織検体における CXCR3 及びバリエーションの発現

### 遺伝子発現解析アレイ

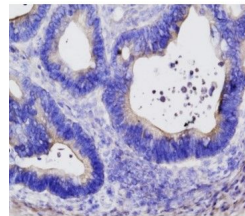
癌中心部に対する先進部の CXCR3mRNA 発現比は 0.94 倍 ( $P=0.257$ ) であり有意な差はなかった。

### 免疫染色

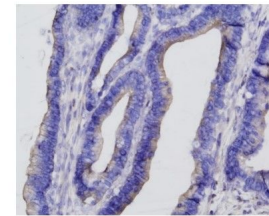
CXCR3 抗体を用い免疫染色を行った。正常粘膜に描出を認めず(A)、癌中央部(B)および先進部(C)の癌細胞膜上に染色が確認された。



A. 正常粘膜



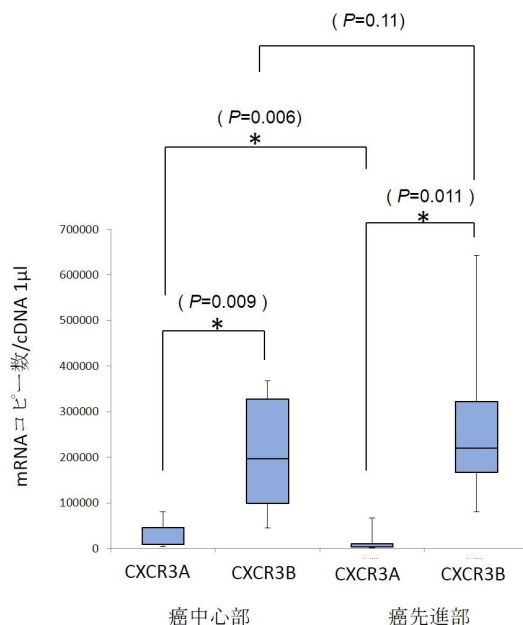
B. 癌中央部



C. 癌先進部

### 定量 real time PCR

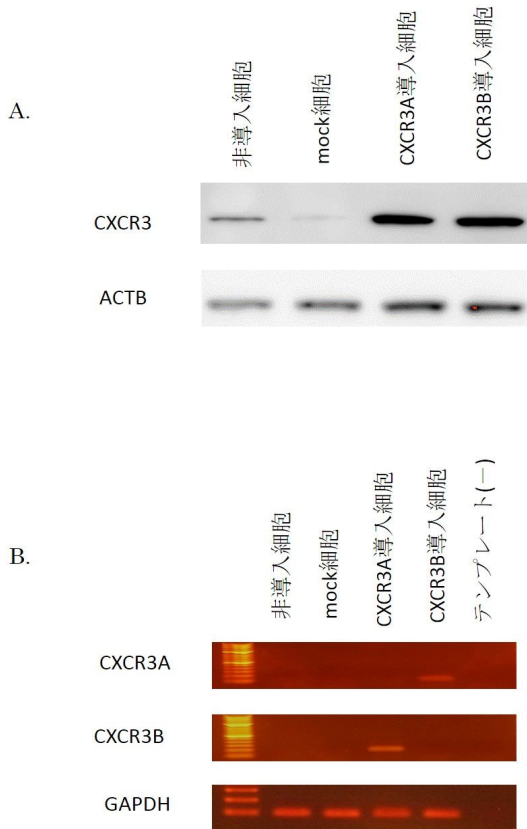
癌中心部では CXCR3A と比較し CXCR3B の mRNA 発現量が 7.3 倍で有意に高かった ( $P=0.009$ )。癌先進部においても CXCR3B の mRNA 発現量が 19.5 倍で有意に高かった ( $P=0.011$ )。また CXCR3A、CXCR3B の各々について癌中心部と先進部の mRNA 発現量を比較した結果、CXCR3AmRNA の発現量は先進部で 0.50 倍有意に低かった ( $P=0.006$ )。一方 CXCR3BmRNA の発現は先進部で 1.84 倍高かったものの有意な差は認められなかった ( $P=0.11$ )



(2) 大腸癌細胞を用いたバリエーションの機能解析

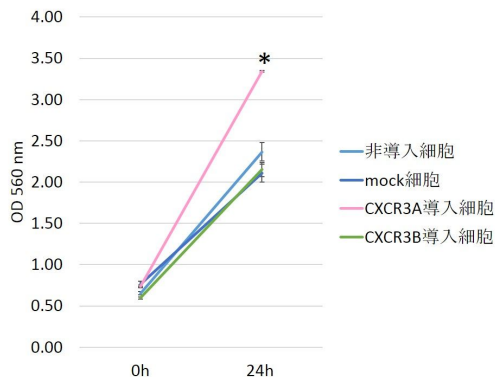
強制発現の確認

プラスミド DNA 非導入細胞、mock 細胞に比べ CXCR3A、CXCR3B 導入細胞で CXCR3 の蛋白発現に明らかな増加が認められた(図 A)。次いで CXCR3A に特異的プライマーで PCR を行った結果、非導入細胞、mock 細胞、CXCR3B 導入細胞ではバンドが検出されず、CXCR3A 導入細胞でのみ発現が確認された。CXCR3B 特異的プライマーでは非導入細胞、mock 細胞、CXCR3A 導入細胞ではバンドが検出されず、CXCR3B 導入細胞でのみ発現が確認された(図 B)。



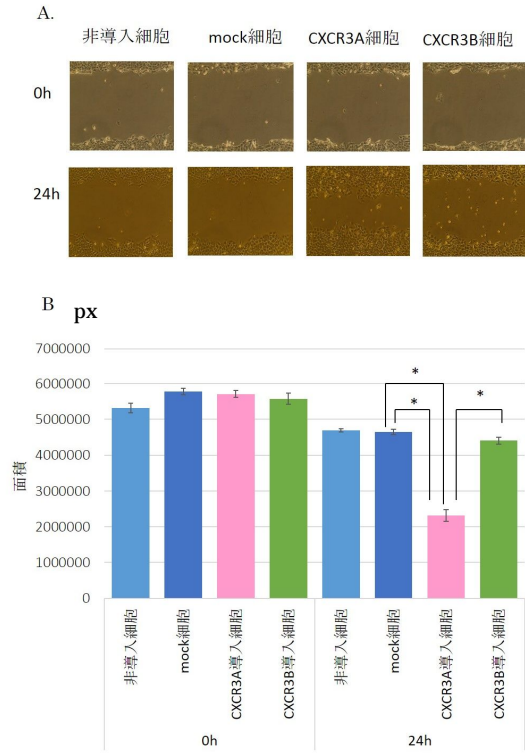
MTT アッセイ

CXCL10 100mg/ml を含む培養液で 24 時間培養した結果、非導入細胞、mock 細胞に比べ CXCR3A 導入細胞で増殖能が有意に亢進していた( $P=0.012$ 、 $0.0003$ )。一方 CXCR3B 導入細胞では増殖能に有意な差は認められなかった( $P=0.197$ 、 $0.767$ ) (図)



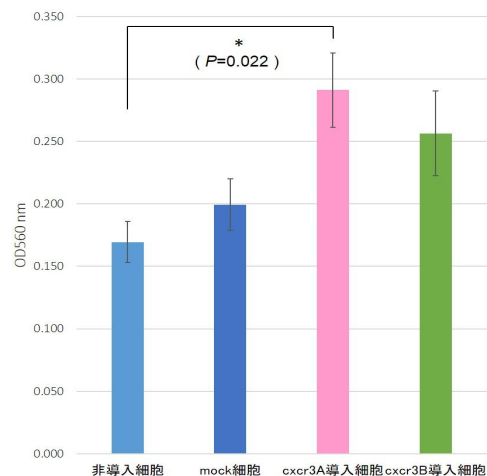
スクラッチアッセイ

CXCL10 100mg/ml を含む培養液で 24 時間培養した結果、非導入細胞、mock 細胞の面積が 4696322px、4647244px であるのに対し CXCR3A 導入細胞の擦過部位の面積が 2313025px で有意に縮小していた ( $P=0.0001$ 、 $0.0002$ )。一方 CXCR3B 導入細胞の擦過部位の面積は 4410677px であり差は認められなかった( $P=0.053$ 、 $0.119$ ) (図 A・B)



トランスウェルアッセイ

CXCL10 100mg/ml を含む培養液で 24 時間培養した結果、非導入細胞に比べ CXCR3A 導入細胞で有意な浸潤細胞の増加が認められた ( $P=0.022$ )。CXCR3B 導入細胞では非導入細胞、moc 細胞と比較し浸潤細胞の有意な増加は認められなかった ( $P=0.072$ 、 $0.21$ ) (図)。



## 結論

大腸癌組織を用いた CXCR3 分子の発現解析では癌中央部と癌先進部のいずれにおいても CXCR3B が CXCR3A よりも高発現していた。癌中心部に対する先進部の発現量は CXCR3A が先進部で低く、CXCR3B は高い傾向にあり部位特異的な発現を示した。強制発現系を用いた in vitro による機能解析では CXCL10/CXCR3A シグナルが大腸癌の増殖や浸潤に関与することが明らかとなった一方、CXCR3B の機能については明確にならなかった。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Takaaki Kobayashi “The expression of specific genes and Epithelial Mesenchymal Transition related molecules at the tumor front of colon cancer” Asia-Pacific Colorectal cancer congress(国際学会) 2015/5/15-16 韓国 ソウル

〔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:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 敬明 (Kobayashi, Takaaki)

杏林大学 医学部 助教

研究者番号: 10439169

### (2) 研究分担者

正木 忠彦 (Masaki, Tadahiko)

杏林大学 医学部 教授

研究者番号: 30238894

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

野崎 江里子 (Nozaki Eriko)

杏林大学 医学研究科 大学院生

(平成 26 年度より研究協力者)