

令和元年5月14日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19946

研究課題名（和文）大腸癌間質における癌関連線維芽細胞由来VCANによる転移・浸潤促進機構の解明

研究課題名（英文）Stromal VCAN expression in colorectal cancer

研究代表者

岡山 洋和 (Okayama, Hirokazu)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20583397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では大腸癌におけるVCAN遺伝子およびVCANタンパク発現に着目し、その臨床病理学的意義、予後との関連、機能的意義について、多数のマイクロアレイデータ、手術摘出検体を用いた免疫染色などを用いて検討した。マイクロダイセクションや特定の細胞分画由来の発現プロファイルから、VCAN遺伝子発現が癌間質、特に癌関連線維芽細胞（CAF）特異的であることがわかり、免疫染色でもVCANタンパクは癌間質のみに認められた。VCAN遺伝子発現およびVCANタンパク発現は、それぞれ有意かつ独立してステージ2-3大腸癌術後の不良な無再発生存と関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は全がんにおいて死亡・罹患数が最も上位の癌腫のひとつであり、さらに増加傾向とされている。効果的で安全な個別化医療を提供することが重要である。本研究で着目したVCAN遺伝子発現およびVCANタンパク発現は、ステージ2-3大腸癌術後の再発リスクの高い症例において特に高発現していることがわかった。今後は、大腸癌間質、癌関連線維芽細胞におけるVCANの機能的な意義の解明とともに、ステージ2-3大腸癌術後の予後バイオマーカーとして有用な可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to examine the clinicopathological, prognostic and functional roles of VCAN expression cancer stroma in CRC, using microarray datasets and FFPE tissues. We initially attempted to determine the localization of VCAN transcript and VCAN protein using expression datasets derived from laser-microdissected CRC samples and FACS-purified CRC cell populations, followed by immunohistochemistry for FFPE specimens. VCAN was found to be expressed specifically by cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment, and VCAN immunohistochemical staining was detected specifically in cancer stroma. Importantly, we found that the expression of VCAN in mRNA transcript and protein levels was each associated with poor disease-free survival in stage II-III CRC, independent of conventional clinicopathological parameters.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 癌間質

1. 研究開始当初の背景

大腸癌（結腸直腸癌）は罹患・死亡数とも最も上位の癌腫のひとつである。近年、診療の進歩は著しく、早期癌に対する内視鏡治療や、低侵襲な腹腔鏡手術は高度化し標準的となった。切除不能・再発例に対して多数の新規薬剤、分子標的薬、免疫療法が導入され生存期間の延長に貢献している。抗 EGFR 抗体薬の適否を判断する RAS・BRAF 遺伝子変異や、抗 PD1 抗体、pembrolizumab の有効性を示唆する MSI 検査など、分子マーカーによる個別化医療が現実のものとなった。

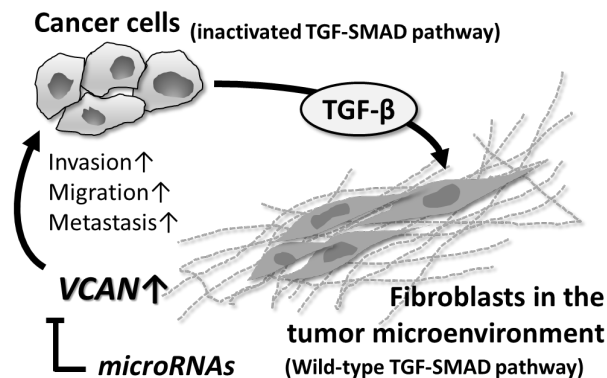
近年、癌間質が癌の進展を促進していることが広く研究されている。間質は線維芽細胞、血管内皮細胞や血球・免疫細胞などの骨髄由来細胞、細胞外基質などで構成されるが、なかでも癌間質における線維芽細胞とマクロファージはそれぞれ癌関連線維芽細胞:Cancer-associated fibroblast (CAF)、腫瘍関連マクロファージ:Tumor-associated macrophage (TAM)と呼ばれ注目されている。癌間質は癌細胞の生存や増殖を育む「微小環境」として認識され、浸潤や転移、血管新生を促進するとともに癌組織内多様性(heterogeneity)を生み出し治療抵抗性を惹起する。また微小環境における NF- κ B などの転写因子やサイトカインが炎症依存的な発癌を促進することもよく知られる。そのため間質は個々の癌の臨床的な特徴を規定し得る重要な因子である。

癌間質を必須の構成要素として癌が成り立つと考えれば、癌の治療において癌細胞のみを対象とするのでは片手落ちかもしれない。癌細胞のゲノムプロファイル(例えば HER2、EGFR、ALK、BRAF)に応じた分子標的治療が昨今主役となりつつあるが、それに加えて癌間質をいかに制御するか、さらに個々の癌間質特性に応じた個別化医療を見据えた対微小環境戦略が次のパラダイムシフトとなり得ると考える。

2. 研究の目的

近年当研究者は、大腸癌間質における VCAN 遺伝子および VCAN タンパク発現に着目しており、VCAN が転移、浸潤など、大腸癌の進展に関与するのではと考えている。本研究の目的は、大腸癌間質における VCAN 遺伝子発現、VCAN タンパク発現の臨床的意義とその再現性を複数のコホートを用いて検証することで、バイオマーカーとして可能性を追求することである。

TGF- β は本来、癌細胞の増殖抑制に働くが、多くの大腸癌では進行とともに TGF- β 経路が癌細胞のゲノム異常により不活化され、TGF- β の制御から逸脱していく。一方で癌の進行に伴い TGF- β 産生は paradoxical に増加していくが、間質細胞が機能的 TGF 経路を保持していることと合わせて考えると、これは TGF- β シグナルの意義が上皮から癌間質に移っていくことを反映するものと思われる(*Cancer Cell* 2012, *Nat Genet* 2015)。このコンセプトを背景にした当研究者の仮説は、大腸癌において癌関連線維芽細胞が、癌細胞からの TGF- β 刺激に伴い VCAN を高発現し、癌促進的な微小環境を作り出すというものである(下図)。したがって、VCAN 発現制御に関連すると推定される TGF- β シグナルと微小環境、特に癌関連線維芽細胞における VCAN 発現のメカニズムを解明することが第2の目的である。



3. 研究の方法

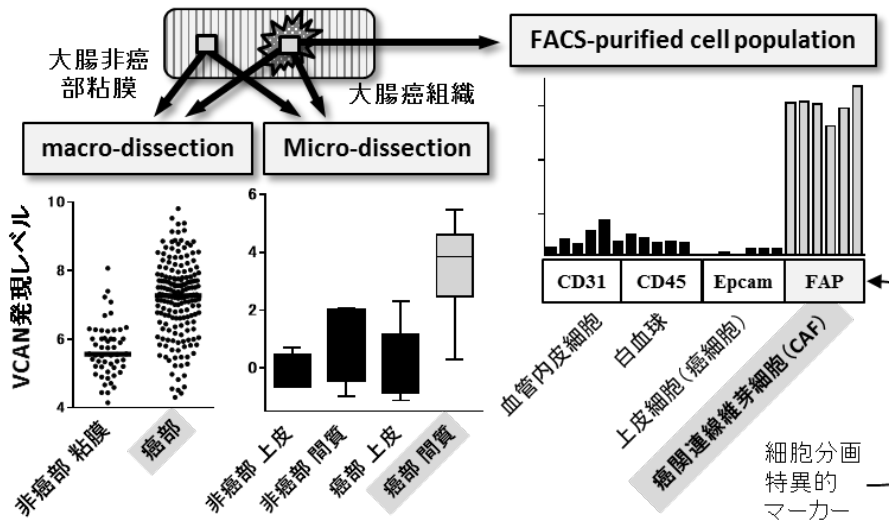
大規模なトランスクリプトームデータや手術検体のパラフィン包埋切片を用いた免疫染色などによる臨床サンプルの解析により 1000 例超の症例を集積し VCAN 遺伝子発現および VCAN タンパク発現の臨床的意義を追求する。

腫瘍組織だけでなく、癌間質、非腫瘍部粘膜とその間質、間質内の各細胞レベルへのこれと並行して、癌細胞株・線維芽細胞を主とした invitro の実験準備を進める。線維芽細胞 - 癌細胞株における TGF- シグナル - VCAN の関連を検討する。

4. 研究成果

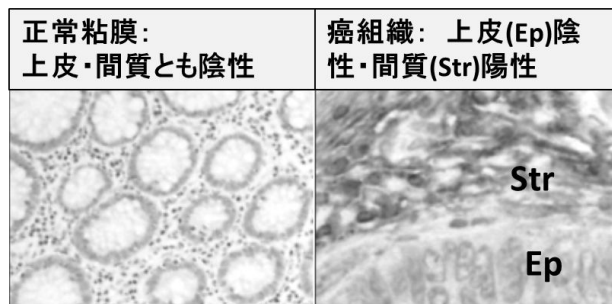
VCAN 遺伝子発現、VCAN タンパク発現の局在

種々のマイクロアレイデータを用いた Macro-dissection による大腸粘膜・大腸癌組織の解析、Micro-dissection による間質特異的解析、および細胞表面マーカーを用いて抽出された細胞分画特異的解析による解析を組み合わせた。VCAN 遺伝子は、非癌部粘膜に比して癌組織に高発現



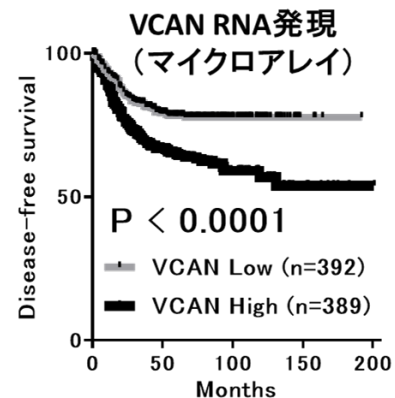
しており、癌部・非癌部においてそれぞれ間質と上皮を比較すると癌間質のみに認められる。さらに癌組織内の細胞分画特異的マーカーで抽出された細胞群において、VCAN 遺伝子発現は癌関連線維芽細胞(CAF)に特異的であり、癌細胞や血管内皮細胞、白血球には発現していない(上図)。なおここでは CAF は線維芽細胞特異的マーカー、FAP (Fibroblast activation protein) により検出されている。免疫染色を用いて、タンパクレベルでもその癌間質特異的な局在を確認した。VCAN 抗体を用いた免疫染色では、正常粘膜においては上皮および間質に染色されない。一方、大腸癌組織においては、癌細胞は染色されないが、癌間質で VCAN 陽性となる(右図)。

以上から、大腸癌において、VCAN 遺伝子および VCAN タンパクは癌間質、特に特異的に発現すること、癌間質において癌関連線維芽細胞(CAF)が主として VCAN を発現すること、が明らかとなった。



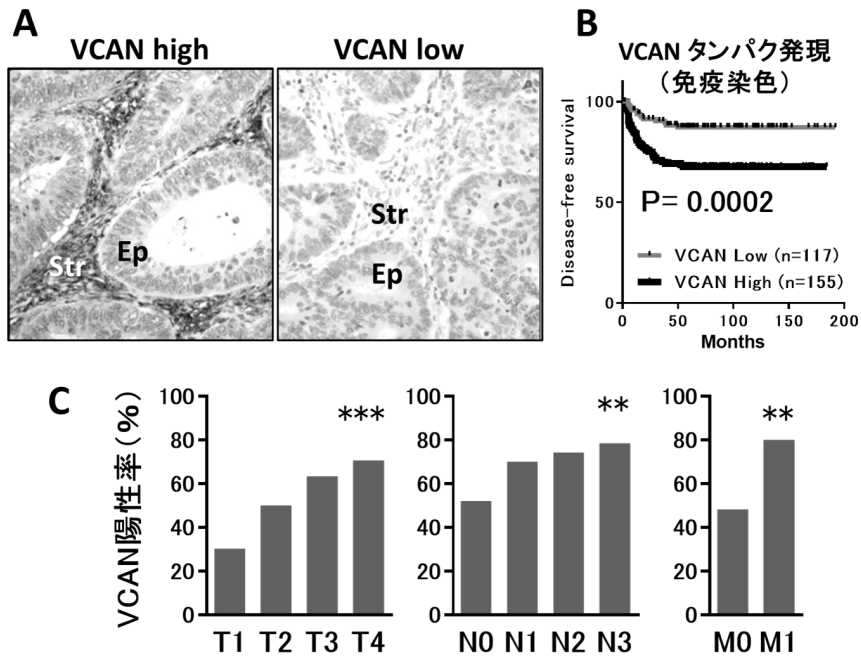
VCAN 遺伝子発現の臨床的意義

Gene Expression Omnibus より大腸癌根治術後のステージ 2-3 症例を含むマイクロアレイデータを取得した。ステージ 2-3 でかつ予後データなどの臨床情報が利用可能であった約 800 例を集積し、VCAN 遺伝子発現を中央値により 2 分し Kaplan-Meier 解析を行った(右図)。VCAN 遺伝子発現が術後の再発(無再発生存: DFS)と強く関連することが明らかであった。また多変量解析において、VCAN 遺伝子発現の予後における意義は、他の臨床病理学的因子と独立していた。つまり VCAN 発現が予後バイオマーカーとして利用できる可能性を強く示唆するものである。



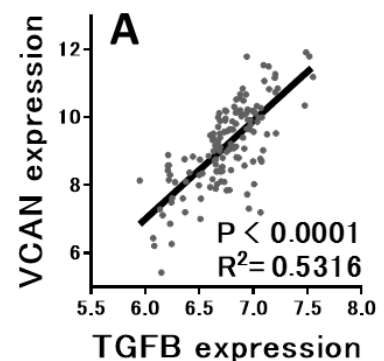
VCAN タンパク発現の臨床的意義

大腸癌手術症例約 400 例の VCAN 免疫染色を行った(下図 A)。癌間質 VCAN 陽性症例は深達度(T)、リンパ節転移(N)、遠隔転移(M)など、高悪性度群と有意な正の相関がみられている(下図 C)。さらに間質における VCAN タンパク陽性症例は不良な無再発生存率と有意な相関を認めた(下図 B)。これは前述の RNA 解析結果と極めて一貫性の高い結果であった。以上より癌間質における VCAN は大腸癌切除後の再発リスクを示す有力なバイオマーカーとなり得るとともに、微小環境における VCAN 発現は癌細胞との相互作用により大腸癌の浸潤・転移に促進的に働くことが強く示唆される。



TGF との関連

TGF は本来、癌細胞の増殖抑制に働くが、多くの大腸癌では進行とともに TGF -SMAD 経路が癌細胞のゲノム異常により不活化され、TGF の制御から逸脱していく。一方で癌の進行に伴い TGF 産生は増加していくが、間質細胞が機能的 TGF 経路を保持していることと合わせて考えると、これは TGF シグナルの意義が上皮から癌間質に移っていくことを反映するものと思われる。このコンセプトを背景にした当研究者の仮説は、大腸癌において、癌関連線維芽細胞(CAF)が、癌細胞あるいは他の間質細胞からの TGF 分泌に伴い VCAN を高発現し、癌促進的な微小環境を作り出すというものである。TGF と VCAN の高い相関(右図)や大腸線維芽細胞への TGF 刺激による VCAN 上昇は上記仮説を支持するものである。今後、さらにその詳細な制御機構の解明が望まれる。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Ashizawa M, Okayama H, Ishigame T, Thar Min AK, Saito K, Ujiie D, Murakami Y, Kikuchi T, Nakayama Y, Noda M, Tada T, Endo H, Fujita S, Sakamoto W, Saito M, Saze Z, Momma T, Ohki S, Mimura K, Kono K. miRNA-148a-3p Regulates Immunosuppression in DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancer by Targeting PD-L1. Mol Cancer Res. Epub ahead of print, 2019.

Noda M, Okayama H, Kofunato Y, Chida S, Saito K, Tada T, Ashizawa M, Nakajima T, Aoto K, Kikuchi T, Sakamoto W, Endo H, Fujita S, Saito M, Momma T, Ohki S, Kono K. Prognostic role of FUT8 expression in relation to p53 status in stage II and III

colorectal cancer. PLoS One. 13(7): e0200315, 2018.

Okayama H, Noda M, Kono K. Aberrant glycosylation in colorectal cancer with genomic and epigenomic alterations. Oncotarget. 9(86): 35609-35610, 2018.

Noda M, Okayama H, Tachibana K, Sakamoto W, Saito K, Thar Min AK, Ashizawa M, Nakajima T, Aoto K, Momma T, Katakura K, Ohki S, Kono K. Glycosyltransferase Gene Expression Identifies a Poor Prognostic Colorectal Cancer Subtype Associated with Mismatch Repair Deficiency and Incomplete Glycan Synthesis. Clin Cancer Res. 24(18): 4468-4481, 2018.

Hayase S, Kumamoto K, Saito K, Kofunato Y, Sato Y, Okayama H, Miyamoto K, Ohki S, Takenoshita S. L-type amino acid transporter 1 expression is upregulated and associated with cellular proliferation in colorectal cancer. Oncol Lett. 14(6): 7410-7416, 2017.

Momma T, Okayama H, Saitou M, Sugeno H, Yoshimoto N, Takebayashi Y, Ohki S, Takenoshita S. Expression of circadian clock genes in human colorectal adenoma and carcinoma. Oncol Lett. 14(5):5319-5325, 2017.

Chida S, Okayama H, Noda M, Saito K, Nakajima T, Aoto K, Hayase S, Momma T, Ohki S, Kono K, Takenoshita S. Stromal VCAN expression as a potential prognostic biomarker for disease recurrence in stage II-III colon cancer. Carcinogenesis. Sep;37(9):878-887, 2016

〔学会発表〕(計 11 件)

大木進司,岡山洋和,芦澤舞,菊池智宏,坂本渉,藤田正太郎,遠藤久仁,齋藤元伸,門馬智之,佐瀬善一郎,河野浩二. ハイリスク stage 大腸癌における inflammatory-based marker の意義と個別化治療戦略. 第 14 回日本消化管学会総会学術集会; 2018/2/9-10; 東京

Ashizawa M, Okayama H, Ishigame T, Mimura K, Kono K. Identification of microRNAs that target PD-L1 in mismatch repair-deficient colorectal cancer. ASCO-SITC CLINICAL IMMUNO-ONCOLOGY SYMPOSIUM; 2018/01/25-27; San Francisco

Okayama H, Ashizawa M, Kikuchi T, Sakamoto W, Fujita S, Endo H, Saito M, Momma T, Ohki S, Kono K. Targeting the tumor microenvironment in dMMR/MSI-H colorectal cancer. 第 73 回日本消化器外科学会総会; 2018/7/11-13; 鹿児島

岡山洋和,野田勝,立花和之進,坂本渉,芦澤舞,中島隆宏,青砥慶太,門馬智之,大木進司,河野浩二. 糖鎖酵素遺伝子によるステージ III 大腸癌の予後バイオマーカー. 第 56 回日本癌治療学会学術集会; 2018/10/18-20; 横浜

芦澤舞,岡山洋和,石亀輝英,Thar Min Aung Kyi,氏家大輔,村上祐子,菊池智宏,野田勝,青砥慶太,中島隆宏,早瀬傑,坂本渉,藤田正太郎,遠藤久仁,齋藤元伸,門馬智之,佐瀬善一郎,三村耕作,大木進司,丸橋繁,河野浩二. Identification of microRNAs that target PD-L1 in mismatch repair-deficient colorectal cancer. 第 118 回日本外科学会定期学術集会; 2018/4/5-7; 東京

遠藤英成,岡山洋和,菊池智宏,氏家大輔,多田武志,坂本渉,藤田正太郎,遠藤久仁,齋藤元伸,佐瀬善一郎,門馬智之,三村耕作,大木進司,河野浩二. dMMR/MSI-H 大腸癌における TGF- 依存性間質型サブタイプの同定. 第 56 回日本癌治療学会学術集会; 2018/10/18-20; 横浜

佐藤孝洋,仲野宏,山田玲央,菊池智宏,岡山洋和,藤田正太郎,坂本渉,遠藤久仁,齋藤元伸,門馬智之,三村耕作,大木進司,河野浩二. dMMR/MSI-high の大腸癌患者における PD-L1 および p-STAT1 の発現について. 第 56 回日本癌治療学会学術集会; 2018/10/18-20; 横浜

菊池智宏,三村耕作,岡山洋和,坂本渉,遠藤久仁,藤田正太郎,齋藤元伸,門馬智之,大木進司,河野浩二. 大腸癌新鮮標本における腫瘍随伴マクロファージの解析. 第 56 回日本癌治療学会学術集会; 2018/10/18-20; 横浜

岡山洋和,野田勝,芦澤舞,中島隆宏,青砥慶太,千田峻,小船戸康英,大木進司,丸橋繁,河野浩二. 大腸癌における 1-6 フコース転移酵素と p53. 第 72 回日本消化器外科学会総会; 2017/7/20-22; 金沢

芦澤舞,岡山洋和, Aung Kyi Thar Min,野田勝,青砥慶太,中島隆宏,石亀輝英,円谷彰,丸橋繁,河野浩二. ミスマッチ修復機構欠損を有する大腸癌における microRNA による PD-L1 調整機構. 第 72 回日本消化器外科学会総会; 2017/7/20-22; 金沢

大木進司,岡山洋和,千田峻,芦澤舞,菊池智宏,坂本渉,藤田正太郎,遠藤久仁,齋藤元伸,門馬智之,佐瀬善一郎,丸橋繁,河野浩二. ハイリスク stage 大腸癌の治療戦略における inflammatory-based marker の意義. 第 79 回日本臨床外科学会総会; 2017/11/23-25; 東京

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。