

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10596

研究課題名(和文) 消化器癌におけるCCN familyの網羅的解析と癌進展及び耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of CCN family for development and drug resistance of gastrointestinal cancers

研究代表者

長井 洋平 (Nagai, Youhei)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：30551254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：間質増殖因子CCN(Cyr61:cysteine-rich 61、CTGF:connective tissue growth factor、Nov:nephroblastoma overexpressed) family は4つの特徴的なモジュールを有し、様々な細胞外シグナルを制御するタンパク質ファミリーである。本研究の目的は、膨大な消化器癌データベースを用い、消化器癌におけるCCN familyの発現意義を解明し、新規治療法開発に寄与する事である。当科の有するデータベースを用い、消化器癌におけるCCN family 発現と臨床病理学的因子、分子的变化との関連を網羅的に解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では間質増殖因子CCN(Cyr61:cysteine-rich 61、CTGF:connective tissue growth factor、Nov:nephroblastoma overexpressed) family の消化器癌における意義を明らかにすべく、グローバルかつ膨大な消化器癌データベースを用い、検討を行った。その結果、CCN familyの一つであるCCN4が食道癌の癌進展、予後不良に関連する可能性が示唆された。また、飲酒歴およびリンパ球浸潤低下と関連する可能性もあり、今後の発癌予防および免疫を介したがん治療に寄与できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the current study is to investigate the significance of CCN (Cyr61:cysteine-rich 61、CTGF:connective tissue growth factor、Nov:nephroblastoma overexpressed) family using global human population-based database, and contribute to the development of the new treatments. We found the significant inverse association of CCN4 expression level with high-T, high-M, high-Stage, poor clinical outcomes, and less follicle lymphocytic reaction. Our findings support the possible influence of CCN4 on cancer development and anti-tumor immunity.

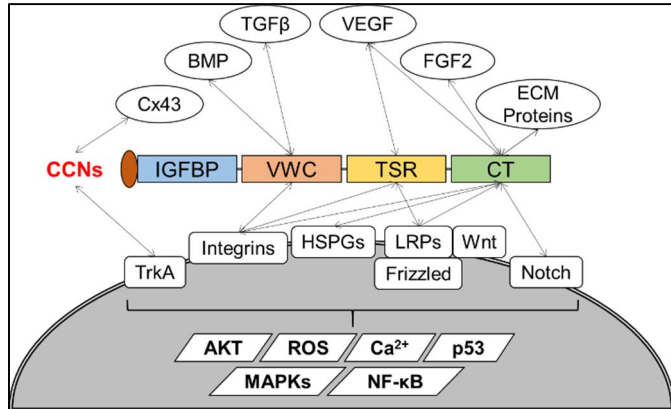
研究分野：外科腫瘍学

キーワード：CCN family 消化器癌 バイオマーカー エピジェネティクス がん代謝 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

悪性新生物は本邦の死因第一位(年間死亡数 37 万人)であり、消化器癌はその約半数(19 万人)を占める。基礎研究及び臨床研究により、分子標的療法等の革新的治療法が開発されているが、消化器癌の予後は未だ不良であり、更なる治療法開発が必要である。間質増殖因子 CCN (Cyr61 : cysteine-rich 61、CTGF : connective tissue growth factor、Nov : nephroblastoma overexpressed) family は特徴的な 4 つのモジュール構造 (IGF 結合ドメイン、von Willebrand factor type C ドメイン、thrombospondin ドメイン、cysteine knot ドメイン) を有するタンパク質ファミリーであり、6 種類存在する (Cyr61/CCN1、CTGF/CCN2、Nov/CCN3、Wnt-induced secreted protein-1 (WISP1)/CCN4、WISP2/CCN5、WISP3/CCN6)。

CCN family は交錯する様々な細胞外シグナルを制御することで調和を保ち、生物学的作用を発揮するため、Signal conductor と呼ばれる新しい概念の分子である(下図)(Nat Rev Drug Discov 2011、J Cell Commun Signal 2013)。CCN family は癌進展のみならず (Sci Rep 2016)、発癌に寄与する可能性がある (Sci Rep 2016、Oncotarget 2016)。更に、薬剤耐性及び放射線抵抗性への関与報告があることも重要である (Int J Cancer 2010、PLoS One 2014)。消化器癌、特に食道癌・肛門管癌に対しては化学放射線療法が行われる症例があり、薬剤耐性・放射線抵抗性の機序解明・予測因子の開発は癌研究において急務である。従って、消化器癌における CCN family の発現意義を明らかにする事は、治療法の開発、発癌予防のみならず、患者毎の適切な治療選択つまり個別化治療の実現化に大きく貢献することが期待できる。



2. 研究の目的

間質増殖因子 CCN (Cyr61 : cysteine-rich 61、CTGF : connective tissue growth factor、Nov : nephroblastoma overexpressed) family は 4 つの特徴的なモジュールを有し、様々な細胞外シグナルを制御するタンパク質ファミリーである。本研究の目的は、グローバルかつ膨大な消化器癌データベースを用い、消化器癌における CCN family の発現意義を解明し、新規治療法開発に寄与する事である。当科の有するデータベースを用い、各癌腫における CCN family 発現と臨床病理学的因子(予後、患者因子、腫瘍因子、手術因子等)、分子的变化 (CMIP、MSI、KRAS・BRAF・PIK3CA 変異、LINE-1 メチル化レベル等) との関連を網羅的に解析する。

3. 研究の方法

熊本大学消化器外科学及び Dana-Farber Cancer Institute の所有する消化器癌臨床検体を対象に下記解析を行った。

免疫染色による CCN4 発現レベルの評価

CCN4 発現レベルと臨床病理学的因子、生活因子、予後との関連解析

CCN4 発現レベルと Epigenetic change 解析との関連解析

- ・ LINE-1 メチル化レベル解析

CCN4 発現レベルと Genetic change 解析との関連解析

- ・ KRAS、BRAF、PIK3CA 変異解析

CCN4 発現レベルとがん代謝関連との関連解析

- ・ PET による SUVmax

CCN4 発現レベルとマイクロバイーム解析との関連解析

- ・ 腫瘍内 Fusobacterium nucleatum 量

CCN4 発現レベルと腫瘍免疫関連マーカーとの関連解析

- ・ IDO1 発現と PD-L1 発現

- ・ リンパ球浸潤 (Tumor-infiltrating lymphocyte, Stromal lymphocyte, Peritumoral lymphocyte, Follicle lymphocytic reaction)

4. 研究成果

(1) CCN4 発現レベルと臨床病理学的因子

消化器癌臨床検体を用い、消化器癌における CCN family の発現意義を検討した。食道癌切除例を対象に、食道癌癌部における CCN4 の発現レベルを免疫染色により評価し、CCN4 の発現意義を検討した。CCN4 高発現群は high-pT (P=0.007)、cM (P=0.02)、high-pStage (P=0.03) と有意に相関し、陽性リンパ節個数とは正の相関の傾向を認めたと (P=0.08)、(下表) 以上から、CCN4 が食道癌の進行度強い相関を有することが明らかとなり、食道癌進展において重要な役割を有することが示唆された。

	CCN4-high	CCN4-low	P value
AJCC-T (T1/T2/T3)	34/17/49%	70/11/19%	0.007
No of positive lymph node	2.6±3.8	1.2±1.9	0.08
AJCC-M (0/1)	89/11%	100/0%	0.02
AJCC-Stage (I/II/III)	23/31/46%	56/22/22%	0.03

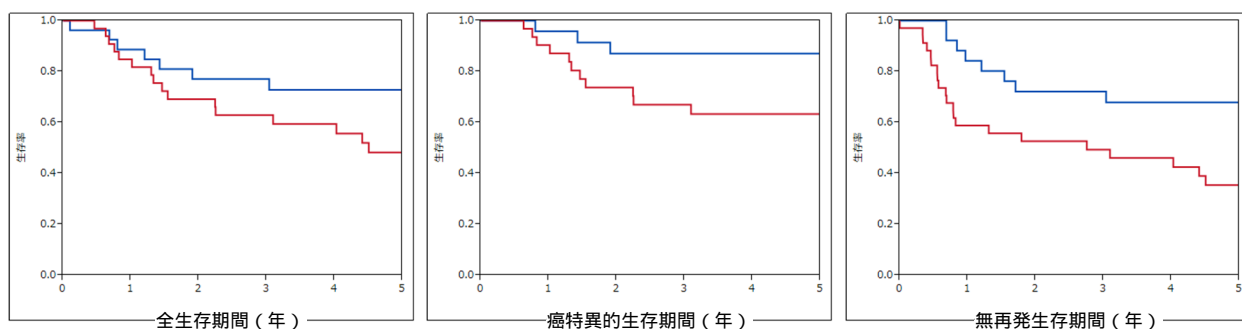
(2) CCN4 発現レベルと生活因子

食道癌の発癌において喫煙および飲酒が関連すると考えられる。発癌機序に CCN family がどのように関連するかを明らかにするために、CCN4 と食道癌診断前のライフスタイルに関して解析を行った。CCN4 は喫煙との関連を認めなかったが (P=0.95)、飲酒歴と正の相関の傾向を認めたと (P=0.10)、(下表) 以上から、CCN4 が飲酒を契機とする食道癌発癌過程に関連する可能性が示唆された。

	CCN4-high	CCN4-low	P value
喫煙歴 (+/-)	80/20%	78/22%	0.95
飲酒歴 (+/-)	89/11%	70/30%	0.10

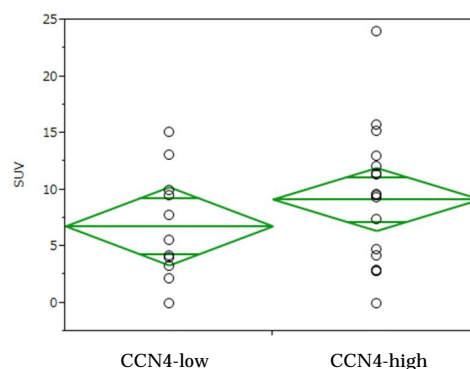
(3) CCN4 発現レベルと予後

予後解析では、全生存期間、癌特異的生存期間、無再発生存期間の全てにおいて、CCN4 高発現群 (赤線) が有意に不良である事が明らかになった (P=0.03、P=0.02、P=0.02)、(下図) 以上から、食道癌において、CCN4 が予後不良に寄与すること、また予後予測因子としての CCN4 の有用性が示唆された。



(4) CCN4 発現レベルとがん代謝

消化器癌の臨床において、FDG-PET は非常に有用である。FDG の構造はグルコースと類似しており、体内ではグルコースと同じような動態を示すことから、悪性腫瘍などの糖代謝が亢進した細胞に集積し、画像化することができる。つまり、FDG-PET はがん代謝を利用した検査機器であり、SUVmax はがん代謝の指標とも言える。食道癌において、CCN4 の発現レベルを SUV 値と比較解析したが、有意な相関を認めなかった (P=0.28)、(右図)

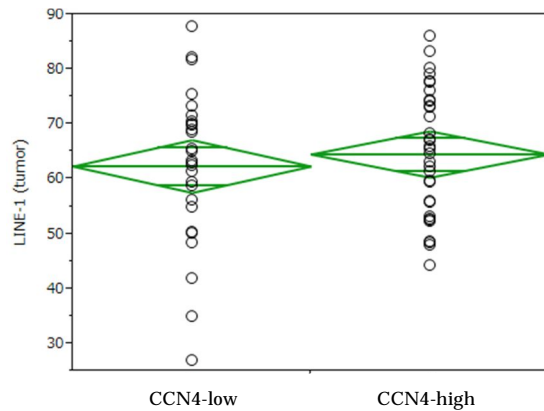


(5) CCN4 発現レベルと Genetic change

食道癌において、PIK3CA 変異は予後良好と関連する可能性があるが、CCN4 発現レベルと PIK3CA 変異に相関は認めなかった (P=0.47)。

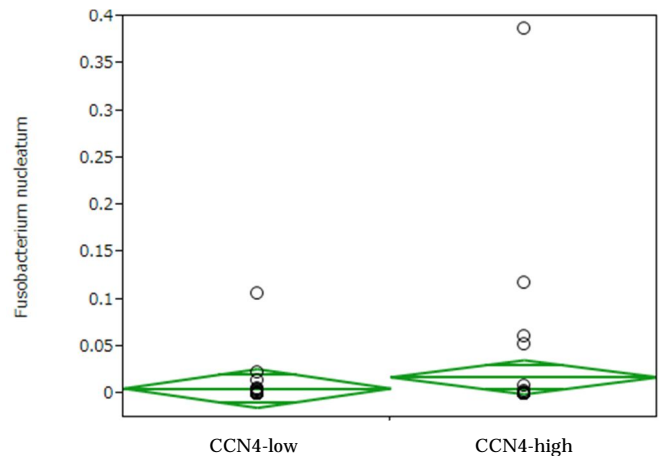
(6) CCN4 発現レベルと Epigenetic change

癌のエピジェネティック異常のひとつに DNA メチル化異常があり、中でもゲノム全体の低メチル化は非常に重要である。LINE-1 はゲノム全体の約 17%を占める転移因子で、そのメチル化レベルはゲノム全体のメチル化レベルの指標となる。食道癌においてLINE-1 低メチル化は予後不良と関連する可能性があり検討したが、CCN4 発現レベルとLINE-1 メチル化レベルに相関は認めなかった (P=0.50)。(右図)



(7) CCN4 発現レベルとマイクロバイオーム

近年の消化器癌研究においてマイクロバイオームは多くの注目を集める。なかでも Fusobacterium nucleatum は大腸癌および食道癌において予後不良と関連する可能性がある。また、消化管内のマイクロバイオームが発癌に寄与する可能性も示唆されている。そこで、CCN4 と Fusobacterium nucleatum の関連解析を行った。検討症例中 27%において Fusobacterium nucleatum 陽性だった。しかし、CCN4 発現レベルと Fusobacterium nucleatum に相関は認めなかった (P=0.75)。(右図)



(8) CCN4 発現レベルと腫瘍免疫関連マーカー

注目される腫瘍免疫関連マーカーである IDO1 発現と PD-L1 発現に関しても検討したが、相関は認めなかった (P=0.89、P=0.39)。

切除標本におけるリンパ球浸潤は予後と関連する可能性がある。CCN4 発現レベルと様々なリンパ球浸潤様式 (Tumor-infiltrating lymphocyte, Stromal lymphocyte, Peritumoral lymphocyte, Follicle lymphocytic reaction) の関連を評価した結果、CCN4 発現レベルは follicle lymphocytic reaction と有意な逆相関を認めた (P=0.03)。

	CCN4-high	CCN4-low	P value
Tumor-infiltrating lymphocyte (Absent, low/Intermediate/High)	11/69/20%	26/59/15%	0.33
Stromal lymphocyte (Absent, low/Intermediate/High)	31/69/0%	33/63/3.7%	0.42
Peritumoral lymphocyte (Absent, low/Intermediate/High)	34/51/14%	22/67/11%	0.47
Follicle lymphocytic reaction (Absent, low/Intermediate/High)	65/26/8.6%	37/59/3.7%	0.03

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Baba Y., Yagi T., Kosumi K., Okadome K., Nomoto D., Eto K., Hiyoshi Y., Nagai Y., Ishimoto T., Iwatsuki M., Iwagami S., Miyamoto Y., Yoshida N., Komohara Y., Watanabe M., Baba H.	4. 巻 106
2. 論文標題 Morphological lymphocytic reaction, patient prognosis and PD-1 expression after surgical resection for oesophageal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BJS	6. 最初と最後の頁 1352 ~ 1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bjs.11301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okadome Kazuo, Baba Yoshifumi, Nomoto Daichi, Yagi Taisuke, Kalikawe Rebecca, Harada Kazuto, Hiyoshi Yukiharu, Nagai Yohei, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Komohara Yoshihiro, Shono Takashi, Sasaki Yutaka, Baba Hideo	4. 巻 122(10)
2. 論文標題 Prognostic and clinical impact of PD-L2 and PD-L1 expression in a cohort of 437 oesophageal cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1535-1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0811-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Naoya, Nagai Yohei, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Iwagami Shiro, Iwatsuki Masaaki, Hiyoshi Yukiharu, Eto Kojiro, Ishimoto Takatsugu, Kiyozumi Yuki, Nomoto Daichi, Akiyama Takahiko, Imamura Yu, Watanabe Masayuki, Baba Hideo	4. 巻
2. 論文標題 Effect of Resection of the Thoracic Duct and Surrounding Lymph Nodes on Short- and Long-Term and Nutritional Outcomes After Esophagectomy for Esophageal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07304-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 NOMOTO DAICHI, YOSHIDA NAOYA, AKIYAMA TAKAHIKO, KIZOZUMI YUKI, ETO KOJIRO, HIYOSHI YUKIHARU, NAGAI YOHEI, IWATSUKI MASAACKI, IWAGAMI SHIRO, BABA YOSHIFUMI, MIYAMOTO YUJI, BABA HIDEO	4. 巻 39
2. 論文標題 Influence of Neoadjuvant Chemotherapy on Short-term Outcomes After Minimally Invasive Esophagectomy for Esophageal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 471 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.13136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Naoya, Kosumi Keisuke, Tokunaga Ryuma, Baba Yoshifumi, Nagai Yohei, Miyamoto Yuji, Iwagami Shiro, Iwatsuki Masaaki, Hiyoshi Yukiharu, Ishimoto Takatsugu, Eto Kojiro, Imamura Yu, Watanabe Masayuki, Baba Hideo	4. 巻
2. 論文標題 Clinical Importance of Mean Corpuscular Volume as a Prognostic Marker After Esophagectomy for Esophageal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000002971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiyozumi Y, Yoshida N, Ishimoto T, Yagi T, Koga Y, Uchihara T, Sawayama H, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Miyamoto Y, Watanabe M, Matsuyama T, Oya N, Baba H.	4. 巻 Feb 8.
2. 論文標題 Prognostic Factors of Salvage Esophagectomy for Residual or Recurrent Esophageal Squamous Cell Carcinoma After Definitive Chemoradiotherapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Surg.	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-018-4536-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baba Y, Yagi T, Sawayama H, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H.	4. 巻 97(1)
2. 論文標題 Long Interspersed Element-1 Methylation Level as a Prognostic Biomarker in Gastrointestinal Cancers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestion.	6. 最初と最後の頁 26-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000484104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitano Y, Baba Y, Nakagawa S, Miyake K, Iwatsuki M, Ishimoto T, Yamashita YI, Yoshida N, Watanabe M, Nakao M, Baba H.	4. 巻 244(3)
2. 論文標題 Nrf2 promotes oesophageal cancer cell proliferation via metabolic reprogramming and detoxification of reactive oxygen species.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pathol.	6. 最初と最後の頁 346-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yagi T, Baba Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H.	4. 巻 Dec 4
2. 論文標題 PD-L1 Expression, Tumor-infiltrating Lymphocytes, and Clinical Outcome in Patients With Surgically Resected Esophageal Cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ann Surg.	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000002616.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamura K, Baba Y, Miyake K, Nakamura K, Shigaki H, Mima K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Yamashita Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H.	4. 巻 14(6)
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum in gastroenterological cancer: Evaluation of measurement methods using quantitative polymerase chain reaction and a literature review.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 6373-6378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.7001.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izumi D, Ishimoto T, Miyake K, Eto T, Arima K, Kiyozumi Y, Uchihara T, Kurashige J, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Goel A, Tan P, Baba H.	4. 巻 35(9)
2. 論文標題 Colorectal Cancer Stem Cells Acquire Chemoresistance Through the Upregulation of F-Box/WD Repeat-Containing Protein 7 and the Consequent Degradation of c-Myc.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cells.	6. 最初と最後の頁 2027-2036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2668.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, Lin SJ, Kalpana R, Tay ST, Suzuki Y, Cho BC, Kuroda D, Arima K, Izumi D, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Watanabe M, Saya H, Hirakawa K, Baba H, Tan P.	4. 巻 153(1)
2. 論文標題 Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of Rho GTPase 5 Homolog 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gastroenterology.	6. 最初と最後の頁 191-204. e16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2017.03.046.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuki Kiyozumi, Yoshifumi Baba, Taisuke Yagi, Yuki Koga, Tomoyuki Uchihara, Daisuke Kuroda, Hiroshi Sawayama, Ryuichi Krashima, Yukiharu Hiyoshi, Takatsugu Ishimoto, Masaaki Iwatsuki, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba.
2. 発表標題 IDO1 high expression is associated with a poor prognosis in patients with esophageal cancer.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Liu Yang, Yoshifumi Baba, Shigeki Nakagawa, Hiroshi Sawayama, Takatsugu Ishimoto, Masaaki Iwatsuki, Yuji Miyamoto, Yoichi Yamashita, Naoya Yoshida, Hideo Baba.
2. 発表標題 The relationship between Microbiome Fusobacterium Nucleatum and autophagy in esophageal cancer.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石本 崇胤 (Ishimoto Takatsugu) (00594889)	熊本大学・病院・特任准教授 (17401)	
研究分担者	馬場 祥史 (Baba Yoshifumi) (20599708)	熊本大学・病院・非常勤診療医師 (17401)	
研究分担者	小澄 敬祐 (Kosumi Keisuke) (50594884)	熊本大学・病院・非常勤診療医師 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	吉田 直矢 (Yoshida Naoya) (60467983)	熊本大学・病院・特任准教授 (17401)	
研究 分担者	宮本 裕士 (Miyamoto Yuuji) (80551259)	熊本大学・病院・講師 (17401)	