

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06999

研究課題名(和文)大腸癌における新たな静脈侵襲判定基準の確立を目指す分子病理学的研究

研究課題名(英文)A pathological study to establish new criteria for venous invasion in colorectal cancer

研究代表者

深澤 由里 (FUKASAWA, Yuri)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：90392331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌症例50例についてHE染色、弾性線維染色、MMP7・S100A4の免疫組織化学染色を用いて検討した。リンパ節転移が5個以上、非連続性の静脈侵襲像、S100A4の腫瘍細胞陽性像のうち1項目でも満たすと感度85%、特異度83%で肝転移を予測できた。内皮細胞株にVEGFA、IL-8を添加した結果、VE-cadherinの発現低下をみとめた。酪酸およびTNF- $\alpha$ 添加後の大腸癌細胞株の変化を調べた結果、DLD-1は細胞間接着の減弱、CD44発現の低下、遊走能の増加、WiDrはCD44の低下、CD44細胞外切断(ELISA法)をみとめ、CD44発現変化が脈管内侵入に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行大腸癌において、原発巣の病理組織学的所見のみでは予後予測は困難である。脈管侵襲を弾性線維染色を加えて判定することは重要だが、病理医間の判定一致率は低く、新たな所見およびマーカー分子の発見が必要と考えた。腫瘍細胞の脈管内侵入に焦点を当て、内皮細胞の変化および腫瘍細胞の結合性変化を起こす分子機構の一端を確認でき、新たなマーカー分子発見につながる所見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Using fifty colorectal cancer cases, histumbilical observations (HE and EvG staining) and immunohistochemistry for MMP7 and S100A4 were conducted. As a result, more than 5 lymph node metastases, non-contiguous venous invasion, and S100A4 expression of tumor cells were predictors of liver metastasis (sensitivity 85%, specificity 83%). The addition of VEGFA or IL-8 to HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) resulted in increased expression of pVE-cadherin. The results of the changes in colon cancer cell lines after the addition of butyric acid and TNF- $\alpha$  showed that DLD-1 reduced cell-cell adhesion, decreased CD44 expression, and increased migration ability, and WiDr decreased CD44 and increased CD44 extracellular cleavage (ELISA method). These results suggest that alteration of CD44 may be implicated in intravascular invasion in colorectal cancer.

研究分野：大腸癌

キーワード：血行性転移

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌患者の生命予後を大きく決定するのは転移であり、特に血行性転移が重要であることが知られている。しかし、静脈侵襲そして血行性転移をきたす詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。大腸癌の特に浸潤先進部における微小環境が癌の浸潤・転移機構に重要であり、「癌細胞が個々遊離細胞状に発育するもの」と定義される簇出は、微小環境の影響が強く、高い浸潤能を有した腫瘍の特徴を表していると考えられている。実際、大腸癌における高度の簇出は、リンパ節転移危険因子および予後不良因子であることが報告されている。その簇出に注目し、大腸癌の浸潤先進部を組織形態学的に2種に分けて癌周囲の間質を比較した。その結果、簇出周囲の間質に特異的な遺伝子として、腫瘍細胞の浸潤能亢進に関与する複数のケモカインならびにマトリックスメタロプロテイナーゼ(以下 MMP)が見出された。この結果をもとに大腸癌の血行性転移の特に肝転移に関して、浸潤先進部における腫瘍細胞の E-cadherin、Dysadherin に加えて MMP7 の発現が肝転移予測因子であることを明らかにした。また、早期大腸癌において、浸潤先進部の腫瘍細胞における MMP7 の発現程度が、独立したリンパ節転移予測因子の一つであることを見出した。これは早期大腸癌におけるリンパ節転移の予測は、内視鏡的切除後の追加治療を決定する上で重要であることから、大腸癌におけるリンパ管侵襲・リンパ節転移機構について病理学的に解析した成果である。

以上の結果から、大腸癌の腫瘍細胞の脈管内への侵入機構を解明するためには、浸潤先進部の MMP7 発現腫瘍細胞とその周囲の間質構成細胞の性質について詳細な検討が必要であると考えた。そこで、培養血管内皮細胞に MMP7 を添加することにより、内皮細胞の結合性が低下することを見出した。しかし、MMP7 の検討のみでは静脈侵襲の分子機構を説明できず、MMP7 に関連する新たな分子に注目する必要があることが示唆された。

### 2. 研究の目的

手術検体において簇出部の腫瘍細胞および静脈を詳細に解析することで、静脈侵襲をきたす重要な候補分子を選出し、それら候補分子が培養内皮細胞株へどのような変化をもたらすかを *in vitro* で解析することで、分子生物学的な裏付けを行う。その結果をふまえたうえで、手術検体を用いた病理学的な解析、統計学的な解析を行うことで、血行性転移を予測できる形態学および分子病理学的な静脈侵襲判定基準を確立する。

簇出を示す腫瘍で明らかな静脈侵襲を観察できない理由として、静脈が完全に破壊され静脈の弾性線維が消失してしまうため静脈侵襲と断定できない、あるいは簇出する腫瘍細胞は大きな腫瘍塞栓のような像ではなく、毛細血管レベルで血管の破壊なく個細胞性に血管内に侵入することが考えられる。これまでの病理診断では弾性線維染色により静脈を同定することで、静脈の腫瘍による破壊、静脈内の腫瘍組織の存在に注目していたが、本研究では、浸潤先進部の簇出という形態を示す腫瘍がどのように静脈内に侵入し、転移巣を形成するのかに焦点を当てる。以上の現象に関与する分子機構が解明されることにより、病理診断における観察者間の一致率が低い静脈侵襲の評価ではなく、血行性転移予測に直結し客観性の高い新たな静脈侵襲の評価が可能となることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 進行大腸癌の免疫組織化学的解析

術後5年間の血行性転移(肝転移)の有無の判明している症例の進行大腸癌組織を用いて、形態学および免疫組織化学的に以下の分子の発現分布を詳細に観察し考察する。(a)肝転移予測因子であり、リンパ節転移と相関していた MMP7、(b)血管内皮細胞のマーカー CD34、CD31、(c)内皮細胞の結合性を示す VE-cadherin、(d)腫瘍の脈管内侵入に重要な分子として報告のある RHO-C、間葉系幹細胞の運命決定に関与するとの報告のある TAZ の免疫組織化学染色を施行し、組織学的特徴、転移の有無との統計学的解析を行う。

#### 培養細胞を用いた内皮細胞の腫瘍環境における変化の検証

購入可能なヒト臍帯静脈内皮細胞株(Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC)に浸潤部で関与すると示唆された Vascular endothelial growth factor-A(VEGFA)、Interleukin-8(IL-8)、Hepatocyte growth factor(HGF)を添加し、内皮細胞の変化を観察する。

- ・内皮細胞の形態学的変化、細胞増殖の変化：顕微鏡による観察および増殖率の計測。
- ・内皮細胞・内皮細胞間の結合分子の発現変化：VE-cadherin、phospho-VE-cadherin(pVE-cadherin)を用いて内皮細胞間結合に関わる分子のタンパク量の比較、培養細胞の蛍光染色を行う。

#### 大腸癌細胞株における、細胞間結合の変化の検証

浸潤先進部の簇出に相当する個細胞性浸潤細胞の性格を調べるため、購入可能なヒト大腸癌

細胞株 (WiDr および DLD-1) における、細胞間接着分子である CD44 の発現変化を観察する。

#### 4. 研究成果

##### 【進行大腸癌における形態学および免疫組織化学的解析】

ヒト進行大腸癌 50 例 (肝転移陽性 20 例、5 年間無再発症例 30 例) を用いて、組織学および免疫組織化学的解析を行った。HE 染色標本、弾性線維染色 (Elastica van Gieson 染色:EvG 染色)、血管内皮細胞マーカー (CD31, CD34)、リンパ管内皮細胞マーカー (D2-40)、その他 MMP7, S100A4, RHO-C, TAZ の免疫組織化学染色を施行し、臨床情報も併せて解析した。リンパ節転移が 5 個以上、腫瘍原発巣から非連続性に存在する静脈侵襲像 (EvG 染色で確認) (図 1A)、腫瘍細胞の核と細胞質にみられる S100A4 陽性像の有無 (図 1B) の 3 個が選出された。いずれも個々の判定のみでは特異度は高いが (87~97%)、感度は低かった (20~40%)。そのため、この 3 項目のいずれか 1 個でも満たす条件で検討すると、感度 85%、特異度 83%、陽性的中率 83%、陰性的中率 77% で肝転移を予測することができた。脈管内侵襲に参与するとされる RHO-C は有意な染色性を観察することができず、TAZ に関しては腫瘍間質の線維芽細胞および内皮細胞の核に陽性像をみとめたが、肝転移との関係を示す結果は得られなかった。また、小集塊~個細胞性に間質に浸潤する腫瘍細胞にみえる症例の一部 (図 1C) には、CD34 の免疫組織化学染色により毛細血管レベルの太さの血管内に多数の静脈侵襲像をみる (図 1D) ことがあり、弾性線維染色で判定できる太さの静脈侵襲のみでなく、このような微小な脈管侵襲も判定できる新たな方法の必要性を強く感じた。

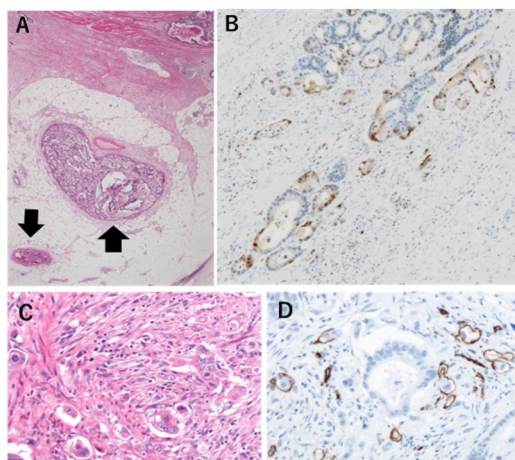


図 1 A: 腫瘍原発巣から非連続性に存在する静脈侵襲像 (HE 染色)、B: S100A4 の免疫組織化学染色、CD: HE 染色標本 (C) では判定できないが、CD34 の免疫染色 (D) で微小な血管内に腫瘍細胞が侵入する像

##### 【培養内皮細胞の細胞間結合の変化】

腫瘍組織内で腫瘍細胞が脈管内侵入を来す際の内皮細胞の変化を in vitro で確認するため、HUVEC を用いた内皮細胞間結合の変化を観察した。蛍光染色においては、コントロールでは内皮細胞-内皮細胞間に VE-cadherin が観察された。VEGFA 添加では大きな変化はみられなかったが、HGF 添加により、細胞間の VE-cadherin の著明な減弱をみとめた (図 2)。

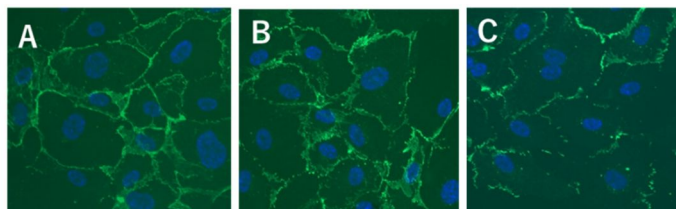


図 2 HUVEC の蛍光染色 A: Control, B: VEGFA 100 ng/ml 60min 添加後、C: HGF 300 ng/ml 60min 添加後

VE-cadherin のリン酸化により細胞間結合性が減弱することから、phospho-VE-cadherin 抗体を用いて Western Blotting 法を施行した。コントロールと比較して、VEGFA、IL-8、HGF の添加により、軽度ではあるが、pVE-cadherin の増加をみとめたこと (図 3) から、腫瘍内および腫瘍周囲に存在する血管においては、内皮細胞間結合が減弱しており、腫瘍細胞が血管内に入りやすい状態にあることが示唆された。

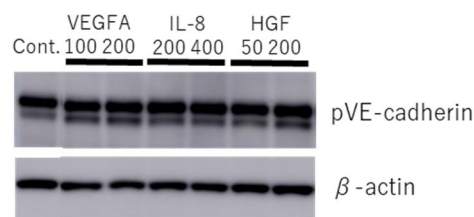


図 3 HUVEC の Western Blotting 法 (リン酸化 VE-Cadherin) Control, VEGFA:100,200 ng/ml, IL-8:200,400 ng/ml, HGF:50,200 ng/ml いずれも 60min 添加後

##### 【大腸癌細胞株における細胞間結合の変化の検証】

腫瘍細胞が脈管内侵入する際の腫瘍細胞同士の結合性の減弱を表す現象を in vitro で観察するため、ヒト大腸癌細胞株 (WiDr および DLD-1) を用いて細胞間接着因子である CD44 変化を調べた。その結果、DLD-1 は腸内に存在する酪酸、WiDr は Tumor necrosis alpha (TNF- $\alpha$ ) の添加により CD44 (細胞外ドメイン部) の発現低下をみとめた (図 4)。しかし、CD44 の mRNA

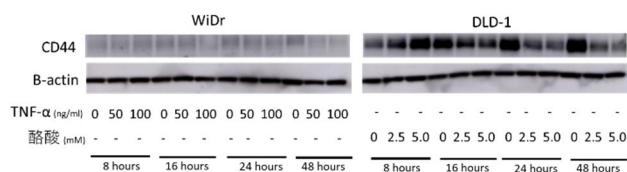


図 4 TNF- $\alpha$  と酪酸添加による CD44 の変化

の発現は、DLD-1, WiDr とともにそれぞれ  
 ぞれの添加により減少しておらず、  
 逆にやや増加していた。ELISA によ  
 って、少なくとも WiDr に関しては、  
 培養液中への CD44 細胞外ドメイン  
 の分泌の有意な亢進が確認されたこ  
 とから、TNF- $\alpha$  により、CD44 の細胞  
 外ドメインの切断があることで、  
 CD44 における細胞間結合の減弱が  
 起こることがわかった。DLD-1 にお  
 いては、ELISA により CD44 細胞外ド  
 メインの明らかな分泌は確認できな  
 かったが、Wound healing assay によ  
 り細胞遊走能が有意に亢進すること  
 がわかった (図 5)。

以上より、腸管内で様々な成長因子、

サイトカイン、ケモカインなどが存在する腫瘍環境下では、腫瘍細胞の結合性が減弱し、腫瘍細胞の遊走能が亢進するという腫瘍細胞の変化と、内皮細胞間の結合の減弱という血管の変化が起こる可能性があり、脈管内侵入がしやすい環境が生じていると考えられた。組織切片において肝転移を予測できる因子が存在する一方、細胞レベルの変化で組織学的所見では検出の困難な症例が一定割合混在していることがわかった。

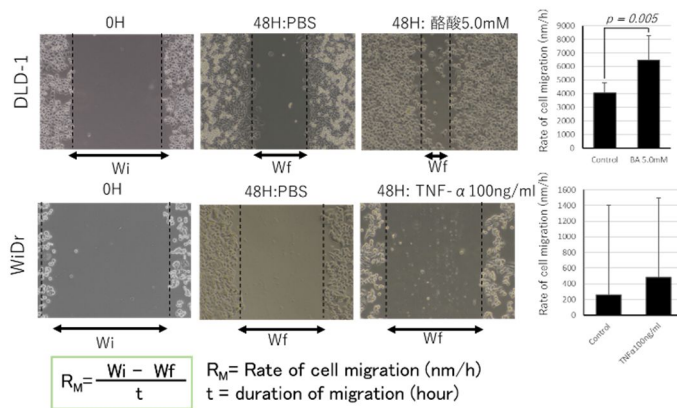


図 5 TNF- $\alpha$  と酪酸添加による細胞遊走能の変化 (Wound healing assay)

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〕

〔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	藤澤 千恵  (FUJISAWA Chie)  (10393000)	東邦大学・医学部・講師    (32661)	
研究分担者	三上 哲夫  (MIKAMI Tetsuo)  (90286352)	東邦大学・医学部・教授    (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関