

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07052

研究課題名(和文) ヒト大腸癌におけるADAM分子発現と浸潤・転移における役割解析

研究課題名(英文) Expression and function of ADAM on cancer cell progression in human colorectal cancer

研究代表者

望月 早月 (Mochizuki, Satsuki)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・外科学・助教)

研究者番号：80365428

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)：大腸癌線維性癌間質反応の形態的变化はがん関連線維芽細胞におけるa disintegrin and metalloproteinase 9s(ADAM9s)の発現と関連しており、ADAM9sは大腸癌細胞のインテグリンを介して細胞内ERK1/2のリン酸化促進と細胞増殖と遊走を促進し癌悪性度へ影響を及ぼしていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌細胞とCAFを区別してそれぞれで発現するADAM分子の情報や機能に関してはほとんど報告がない。一方、大腸癌浸潤先端部DRのimmatureタイプの形態学的特徴と予後との関連は当教室の上野秀樹教授らが独自に明らかにしたデータであるが、その形成機構やADAM分子の関与に関しては全く情報がない。これらのことから、本研究項目の遂行によって明らかにできるデータは、ADAMやCAFの研究分野に大きなインパクトを与えることができるばかりでなく、癌組織内微小環境研究分野に大きな貢献ができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Desmoplastic reaction of colorectal cancer (CRC), i.e. Mature, Intermediate or Immature type, is related with prognosis, but molecular mechanism remains unknown. We demonstrate that survival rate is worst in Immature group, and secreted isoform of “a disintegrin and metalloproteinase-9” (ADAM9s) is overexpressed by cancer-associated fibroblasts from Immature-type CRC (CAFslmmature). CAFslmmature-derived ADAM9s contributes to increased proliferation and progression of CRC cells, suggesting the implications of CAFslmmature-derived ADAM9s for poor prognosis in CRC patients.

研究分野：メタロプロテアーゼ、癌微小環境

キーワード：ADAM CAF 線維性癌間質反応 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は転移のない早期癌であれば外科切除で完治できるが、浸潤・転移した大腸癌では抗癌剤治療が主体となる。しかし、大腸癌細胞は遺伝子異常の頻度が高く容易に薬剤耐性を獲得することから、新規分子標的治療薬や治療抵抗性が生じにくいがん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: CAF) を標的とした治療法の導入が期待されている。CAF は線維芽細胞が癌細胞由来因子による刺激や細胞接触により特殊に分化した線維芽細胞であり、癌特異的な間質形成に関わるとともに癌細胞に作用して増殖能や運動能を亢進する (Nature Rev. Cancer 16:582-598, 2016)。申請者が所属する研究室では、大腸癌腫瘍浸潤先進部での線維性癌間質反応 (Desmoplastic reaction: DR) が組織学的予後予測因子として有望であることを見出してお

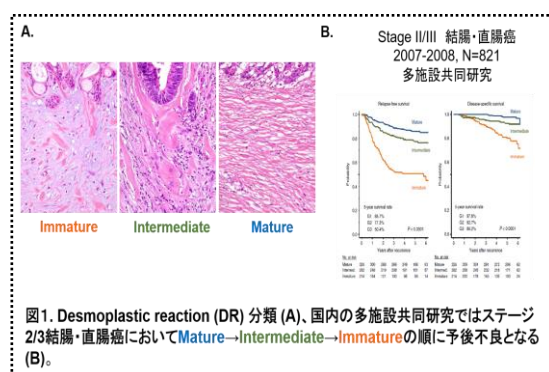


図1. Desmoplastic reaction (DR) 分類 (A)、国内の多施設共同研究ではステージ 2/3 結腸・直腸癌において Mature→Intermediate→Immature の順に予後不良となる (B)。

り (Gut 53: 581-586, 2004; Am J Surg Pathol. 41: 1506-1512, 2017; Br J Cancer 2021 doi: 10.1038 /s41416-020-01222-8)、DR を形態学的に immature、intermediate、mature に分類し、immature>intermediate>mature の順で予後不良となることを示している (Gut 53:581-6, 2004) (図 1)。中間質反応は、従来の臨床病理学的因子を凌ぐ優れた予後予測指標ではあるが、本病変の形成機構や癌悪性度へ関与するメカニズムについては不明である。

2. 研究の目的

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 分子は、MMP (matrix metalloproteinase) の近縁遺伝子ファミリーで、細胞外マトリックスの分解や細胞膜上の増殖因子やサイトカインの代謝により、癌細胞の増殖・浸潤・転移に関与している (Cancer Sci. 98:621-628, 2007; Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8 :245-257, 2007; Curr. Pharm. Des. 15:2349-2358, 2009; Digestion 13:1-7, 2020) (図 2) 本研究では DR と ADAM 分子との関係ならびに DR が癌の悪性度に関与するメカニズムについて検討した。

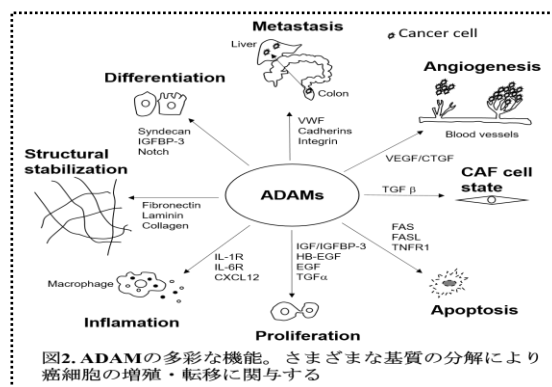


図2. ADAMの多彩な機能。さまざまな基質の分解により癌細胞の増殖・転移に関与する

3. 研究の方法

大腸癌手術切除検体から DR 分類別に CAFs やオルガノイドを培養し (Digestion 13:1-7, 2020) (図 3)、CAF



図3. 大腸癌オルガノイドの培養

で発現する ADAM 分子について RT-PCR 法、real-time PCR 法、免疫ブロット法を用いて比較検討した。CAF の培養上清と共培養した大腸癌細胞株 (HCT-116, HT-29) やオルガノイドの増殖能、遊走能、細胞内 extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2) のリン酸化を検討した。さらに、CAF と Luciferase と Venus 融合遺伝子を導入した大腸癌細胞株 (HCT-116^{fluc-cp156} や HT-29^{fluc-cp156}) をヌードマウスの皮下や盲腸漿膜下層に混合移植し、増殖能と浸潤能を in

vivo モデルで検討を行った。

4. 研究成果

13種類あるメタロプロテアーゼ型 ADAM 分子の中で、分泌型の ADAM9s は mature 症例に比

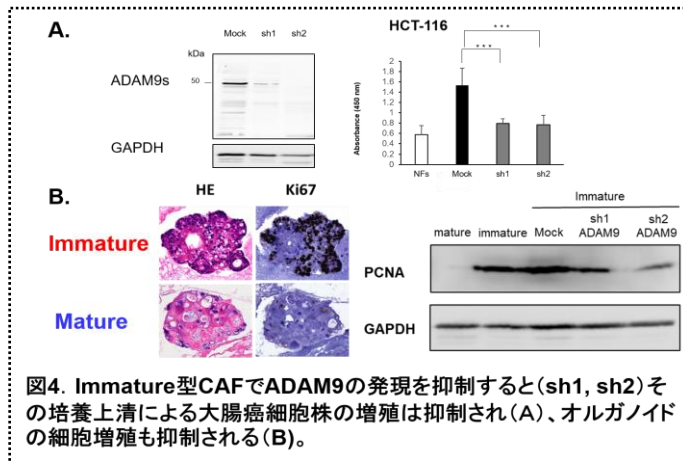


図4. Immature型CAFでADAM9の発現を抑制すると(sh1, sh2)その培養上清による大腸癌細胞株の増殖は抑制され(A)、オルガノイドの細胞増殖も抑制される(B)。

べて immature 症例から採取した CAFs において有意に高発現していた。mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAFs の培養上清と共培養した大腸癌細胞株 (HCT-116, HT-29) や大腸癌オルガノイドは増殖能、遊走能、細胞内 ERK 1/2 のリン酸化が有意に促進され、shRNA を用いた CAFs での ADAM9s の発現抑制により

HCT-116 と HT-29 やオルガノイドの増殖能、遊走能、ERK1/2 のリン酸化が抑制された (図 4)。さらに mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAFs を HCT-116^{ffLuc-cp156} や HT-29^{ffLuc-cp156} とヌードマウスの盲腸漿膜下層に混合移植した場合、有意に増殖が亢進し腹膜播種が高度に形成された (図 5)。

以上の結果から、DR の形態的变化は CAFs における ADAM9s の発現と関連しており、ADAM9s は大腸癌細胞の $\alpha 6 \beta 4$ もしくは $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンを介して細胞内 ERK1/2 のリン酸化促進と細胞増殖と遊走を促進し癌悪性度へ影響を及ぼしていると考えられた。

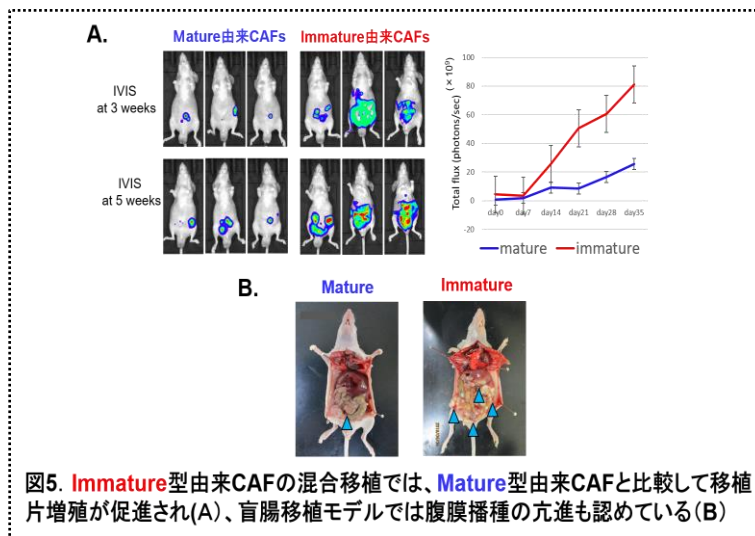


図5. Immature型由来CAFの混合移植では、Mature型由来CAFと比較して移植片増殖が促進され(A)、盲腸移植モデルでは腹膜播種の亢進も認めている(B)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 18件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 17件）

1. 著者名 Tashiro Keita, Shinto Eiji, Kajiwara Yoshiki, Mochizuki Satsuki, Okamoto Koichi, Nishizawa Aya, Satoh Takahiro, Kishi Yoji, Ueno Hideki	4. 巻 8
2. 論文標題 Systemic steroid treatment can desensitize the skin reaction due to regorafenib in a recurrence colorectal cancer patient	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal	6. 最初と最後の頁 164 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13691-019-00376-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamadera Masato, Shinto Eiji, Kajiwara Yoshiki, Mochizuki Satsuki, Okamoto Koichi, Shimazaki Hideyuki, Hase Kazuo, Ueno Hideki	4. 巻 74
2. 論文標題 Differential clinical impacts of tumour budding evaluated by the use of immunohistochemical and haematoxylin and eosin staining in stage II colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.13830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamadera Masato, Shinto Eiji, Kajiwara Yoshiki, Mochizuki Satsuki, Okamoto Koichi, Hase Kazuo, Yamamoto Junji, Ueno Hideki	4. 巻 62
2. 論文標題 Differential Survival Benefits of 5-Fluorouracil Based Adjuvant Chemotherapy for Patients With Microsatellite-Stable Stage III Colorectal Cancer According to the Tumor Budding Status	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diseases of the Colon & Rectum	6. 最初と最後の頁 1316 ~ 1325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/DCR.0000000000001480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mochizuki Satsuki, Ao Tadakazu, Sugiura Takumi, Yonemura Keisuke, Shiraishi Takehiro, Kajiwara Yoshiki, Okamoto Koichi, Shinto Eiji, Okada Yasunori, Ueno Hideki	4. 巻 101
2. 論文標題 Expression and Function of a Disintegrin and Metalloproteinases in Cancer-Associated Fibroblasts of Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 18 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000504087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Hideki, Kanemitsu Yukihide, Sekine Shigeki, Ishiguro Megumi, Ito Eisaku, Hashiguchi Yojiro, Kondo Fukuo, Shimazaki Hideyuki, Kajiwara Yoshiki, Okamoto Koichi, Mochizuki Satsuki, Tsujimoto Hironori, Shinto Eiji	4. 巻 43
2. 論文標題 A Multicenter Study of the Prognostic Value of Desmoplastic Reaction Categorization in Stage II Colorectal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ao Tadakazu, Kajiwara Yoshiki, Yonemura Keisuke, Shinto Eiji, Mochizuki Satsuki, Okamoto Koichi, Aosasa Suefumi, Ueno Hideki	4. 巻 475
2. 論文標題 Prognostic significance of histological categorization of desmoplastic reaction in colorectal liver metastases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 341 ~ 348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-019-02580-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nearcho Ines P., Kajiwara Yoshiki, Mochizuki Satsuki, Harrison David J., Caie Peter D., Ueno Hideki	4. 巻 43
2. 論文標題 Novel Internationally Verified Method Reports Desmoplastic Reaction as the Most Significant Prognostic Feature For Disease-specific Survival in Stage II Colorectal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yonemura Keisuke, Kajiwara Yoshiki, Ao Tadakazu, Mochizuki Satsuki, Shinto Eiji, Okamoto Koichi, Hase Kazuo, Ueno Hideki	4. 巻 43
2. 論文標題 Prognostic Value of Poorly Differentiated Clusters in Liver Metastatic Lesions of Colorectal Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1341 ~ 1348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe, Yuka Miyamae, Junko Kuramoto, Noriko Aramaki-Hattori, Ken Ishii, Hideki Ueno, Akira Miyakoshi, Kanehisa Kojoh and Yasunoti Okada	4. 巻 17
2. 論文標題 Selective inhibition of ADAM28 suppresses lung carcinoma cell growth and metastasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Ther	6. 最初と最後の頁 2427 ~ 2438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-17-1198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hidenori Shimizu, Masayuki Shimoda, Satsuki Mochizuki, Yuka Miyamae, Hitoshi Abe, Miyuki Chijiwa, Hiroyuki Yoshida, Jun Shiozawa, Muneaki Ishijima, Kazuo Kaneko, Arihiko Kanaji, Masaya Nakamura, Yoshiaki Toyama and Yasunori Okada	4. 巻 188
2. 論文標題 Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Is Up-Regulated and Involved in Hyaluronan Degradation in Human Osteoarthritic Cartilage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am. J. Pathol.	6. 最初と最後の頁 2109 ~ 2119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2018.05.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Aya, Abe Hitoshi, Mochizuki Satsuki, Shimoda Masayuki, Okada Yasunori	4. 巻 68
2. 論文標題 SOX4, an epithelial-mesenchymal transition inducer, transactivates ADAM28 gene expression and co-localizes with ADAM28 at the invasive front of human breast and lung carcinomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 449 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12685	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takehiro Shiraishi, Eiji Shinto, Satsuki Mochizuki, Hitoshi Tsuda, Yoshiki Kajiwara, Koichi Okamoto, Takahiro Einama, Kazuo Hase, Hideki Ueno	4. 巻 474
2. 論文標題 Mesothelin expression has prognostic value in stage / colorectal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virchows Arch	6. 最初と最後の頁 297 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-018-02514-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ao Tadakazu, Kajiwara Yoshiki, Yamada Kentaro, Shinto Eiji, Mochizuki Satsuki, Okamoto Koichi, Yamadera Masato, Yonemura Keisuke, Ueno Hideki	4. 巻 49
2. 論文標題 Cancer-induced spiculation on computed tomography: a significant preoperative prognostic factor for colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 629 ~ 636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-01780-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sueyama Takahiro, Kajiwara Yoshiki, Mochizuki Satsuki, Shimazaki Hideyuki, Shinto Eiji, Hase Kazuo, Ueno Hideki	4. 巻 478
2. 論文標題 Periostin as a key molecule defining desmoplastic environment in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 865 ~ 874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-020-02965-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishibashi Yusuke, Tsujimoto Hironori, Einama Takahiro, Mochizuki Satsuki, Kouzu Keita, Nomura Shinsuke, Ito Nozomi, Harada Manabu, Sugasawa Hidekazu, Shinto Eiji, Kishi Yoji, Ueno Hideki	4. 巻 28
2. 論文標題 Correlation Between Immunoinflammatory Measures and Periostin Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Single-Center, Retrospective Cohort Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1228 ~ 1237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08765-3	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 Ishibashi Yusuke, Tsujimoto Hironori, Einama Takahiro, Mochizuki Satsuki, Kouzu Keita, Nomura Shinsuke, Ito Nozomi, Harada Manabu, Sugasawa Hidekazu, Shinto Eiji, Kishi Yoji, Ueno Hideki	4. 巻 28
2. 論文標題 Correlation Between Immunoinflammatory Measures and Periostin Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Single-Center, Retrospective Cohort Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1228 ~ 1237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08765-3	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 Nearchou Ines P., Ueno Hideki, Kajiwara Yoshiki, Lillard Kate, Mochizuki Satsuki, Takeuchi Kengo, Harrison David J., Caie Peter D.	4. 巻 13
2. 論文標題 Automated Detection and Classification of Desmoplastic Reaction at the Colorectal Tumour Front Using Deep Learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1615 ~ 1615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13071615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagata K, Shinto E, Yamadera M, Shiraishi T, Kajiwara Y, Okamoto K, Mochizuki S, Hase K, Kishi Y, Ueno H	4. 巻 4
2. 論文標題 Prognostic and predictive values of tumour budding in stage IV colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BJS Open	6. 最初と最後の頁 693 ~ 703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bjs5.50300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiraishi Takehiro, Shinto Eiji, Yamadera Masato, Nagata Ken, Tsuda Hitoshi, Mochizuki Satsuki, Kajiwara Yoshiki, Okamoto Koichi, Einama Takahiro, Kishi Yoji, Ueno Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 Significance of mesothelin expression in preoperative endoscopic biopsy specimens for colorectal cancer prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 3807 ~ 3817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27774	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Hideki Ueno and Yasunori Okada
2. 発表標題 Development of human antibody against ADAM28, a key modulator of tumor microenvironmental factors in non-small cell lung carcinomas.
3. 学会等名 Matrix Biology Europe 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 望月早月、阿尾理一、梶原由規、米村圭介、岡本耕一、神藤英二、下田将之、長谷和生、上野秀樹
2. 発表標題 がん関連線維芽細胞で発現するADAM分子による線維性癌間質反応への関与
3. 学会等名 第15回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 望月早月、岡田保典	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 1040 - 1045 (6ページ)
3. 書名 医学のあゆみ「線維症とメタロプロテアーゼ-MMP・ADAM・ADAMTS」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>防衛医科大学校 外科学（消化管外科） http://www.ndmc.ac.jp/med/subject/sh_med039e5a4%96e7a791e5ad%a6ef%bc88e6b6%88e58c%96e7ae%a1e5a4%96e7a791ef%bc89/ 防衛医科大学外科学（消化管外科） http://www.ndmc.ac.jp/med/subject/sh_med038syoukakangeka/</p>

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	上野 秀樹 (Ueno Hideki) (90597535)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・外科学・教授） (82406)	ヒト大腸癌症例のDR分類解析

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	岡田 保典 (Okada Yasunori) (00115221)	順天堂大学・順天堂大学大学院 医学研究科・教授 (32620)	マウス組織の病理学的解析

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2件

国際研究集会 Matrix Biology Europe 2018	開催年 2018年～2018年
国際研究集会 Gordon Research Conference on Metalloproteinases	開催年 2019年～2019年

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