

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21626

研究課題名（和文）大腸癌の予後を規定する神経周囲侵襲に関わる分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms for factors associated with perineural invasion as a prognostic factor in colorectal cancer

研究代表者

野澤 宏彰（Nozawa, Hiroaki）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80529173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：閉塞性大腸癌に対するステント留置により神経侵襲(Pn)が増加し、閉塞性大腸癌でもPnが増加することが報告されている。本研究では腫瘍口側と肛門測にわけてPnを評価し、閉塞癌では口測のPn陽性率が上昇し、ステント留置例では肛門側のPn陽性率も上昇することを見出した。ゆえにメカニカルストレスが局所のPn出現に関与すると考えられた。メカニカルストレスをin vitroで再現する系として培養細胞における伸展刺激を考案し、複数の大腸癌細胞株でBDNFなどの発現上昇を確認した。先行して一過性のERKのリン酸化を伴うことから、ERKがneurotrophic factor再生に関与する可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pnが予後因子であることから、それを規定するneurotrophic factorやさらにその上流にあって発現を制御する分子を解明することで、新しい大腸癌に治療標的となりうる可能性がある。特に閉塞性大腸癌に対するステント留置は予後の観点からガイドライン上推奨されるレベルになっていないが、上記の標的治療を組み合わせることで予後が改善し推奨レベルにまで上がってくる可能性もある。治療選択肢が広がるという意味で多くの患者への恩恵につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Perineural invasion is a prognostic factor in various solid tumors. Previous studies demonstrated that obstruction and stent insertion increase the frequency of perineural invasion (Pn) in colon cancer. In this study, we showed that obstructive colon cancer had a higher Pn rate at the oral side of than the anal side by histopathological examination. Stent placement increased Pn at both sides of obstructive cancer. The results support a hypothesis that mechanical stress may increase Pn locally. We considered that the above-mentioned phenomena might be imitated by stretch of cancer cells in vitro. One-dimension stretch induced transient phosphorylation of ERK, and later elevated expression in neurotrophic factors such as BDNF and CTNF in several colon cancer cell-lines. Therefore, the activation of ERK signaling pathway may contribute to Pn in response to stress.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：大腸癌 神経周囲侵襲

## 1. 研究開始当初の背景

神経周囲侵襲(perineural invasion, Pn)は癌先進部の病理学的所見であり、血行性転移、リンパ行性転移、播種に続く4番目の癌の遠隔部位への拡散ルートに関わるとして注目されるようになってきた。PN陽性は癌種を問わず遠隔転移、局所再発、生存率低下に相関するとされている。大腸癌による悪性狭窄に対するステント留置後の病理組織学的変化としてPnが高頻度であるという発表を受け、我々はステントを留置していない大腸癌で検討しても閉塞性大腸癌はPnが高頻度にみられ、閉塞はPnに相関する独立した因子であること、さらに閉塞とPnがともにみられる症例は著しく予後不良であると報告した(Nozawa H. et al. Colorectal Dis. 2019)。一方で、炎症性腸疾患ではPnを誘導するneurotrophic factorの発現異常があるとされ、炎症を母地に発生する大腸癌colitis-associated cancer(CAC)の進行癌症例では同様にPnが高率(90%)に認められることも見出した(Nozawa H. et al. Medicine, 2019)。検討したCACは何れも閉塞性ではなく、CACと閉塞はPnの予測因子として独立しているが、共通の分子メカニズムがあるとすればneurotrophic factorではないかと仮説を立てるに至った。

## 2. 研究の目的

今回の研究では、機械的ストレスが大腸癌でのPn出現に及ぼす影響、あるいは大腸の慢性炎症とPn出現との関係をneurotrophic factorに着目し、Pn促進につながるメカニズムの一端を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体(大腸癌の手術標本)を用いた検討

非閉塞性大腸癌、閉塞性大腸癌(ステント留置なし)、閉塞性大腸癌(ステント留置)に分類し、

以下の評価を行った。

閉塞性大腸癌（ステント留置なし）でのPNの分布を口側と肛門側に分類して評価する  
（即ち、内腔からの圧がより高いと想定される口側に多くみられるかを検討する）

閉塞性大腸癌（ステント留置あり）でのPnの分布を口側と肛門側に分類して評価する  
（内腔からの圧は口側と肛門側で同等と想定されるがPNも同程度にみられるかを検討する）

## （2） 大腸癌細胞への伸展刺激実験

1方向に接着培養細胞を伸展できる装置を用いてヒト大腸癌細胞株を+20%伸展させた。  
この伸展刺激による種々の neurotrophic factor と受容体の発現変化のほか、関連が想定されるシグナル伝達経路の key molecule を、それぞれ定量 RT-PCR および western blot にて解析した。

## 4．研究成果

（1） 本学附属病院大腸肛門外科で2017年1月-2020年6月の間に施行されたpT3/T4大腸癌切除症例で通常診療としての病理診断でPn陽性と診断された181例を対象として、腫瘍の腸管軸方向での切片の口側、肛門側について2名が臨床情報なしで再度Pnを診断した。非閉塞症例127例、閉塞症例（ステントなし）127例、ステント留置症例15例で比較した。口側切片、肛門側切片でのPn陽性率は、非閉塞例で50例(39%)、32例(25%)、閉塞例で22例(56%)、13例(33%)、ステント例で10例(67%)、11例(73%)であった。閉塞例で腫瘍口側でのみPn陽性率が上昇し、非閉塞例との比較でPn陽性率に有意差を認めた( $p=0.049$ )。また閉塞例では口側切片のPn陽性率は肛門側と比較し有意に高かったが( $p=0.04$ )、ステント留置例では肛門側のPn陽性率も上昇したため口側のPn陽性率との差はなくなった( $p=0.69$ )。これらからメカニカルストレスが局所のPnの出現に関与していると考えられた。

（2）シリコンゴム培養容器に大腸癌細胞株DLD-1やHT-29を48時間培養後、血清飢餓とした。+20%の1次元の伸展刺激を行い24時間後に細胞を回収してmRNAを抽出した。neuron growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), Ciliary neurotrophic factor (CNTF), neurotrophin-3 などとその受容体 (p75-NGFR, TrkA, TrkB, TrkC など)の発現を定量RT-PCRにて解析すると、BDNF, CNTFが4-20

倍に発現が上昇していることが明らかとなった。その他の neurotrophic factor や受容体の発現量に有意な変化はなかった。

同様に +20%の1次元の伸展刺激を5分、15分、30分、1時間、3時間、12時間加え、それぞれタンパクを回収し Western Blotting にて ERK、AKT、JNK のリン酸化を解析すると伸展刺激後15分で ERK のリン酸化が増加し、その後は低下した。AKT、JNK については進展刺激による有意なリン酸化の増減は見られなかった。これらの *in vitro* の結果から機械刺激を受けた大腸癌細胞では ERK シグナル伝達経路の活性化が先行し、その下流において BDNF、CNTF 発現が誘導される可能性が考えられた。臨床において機械的ストレスがこれらの neurotrophic factor の発現を介して大腸癌での Pn を誘導するかどうか更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 館川裕一、野澤宏彰、立石陽子、園田洋史、牛久哲男、石原聡一郎
2. 発表標題 大腸癌における神経侵襲の局在とメカニカルストレスの解析
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津島辰也、野澤宏彰、館川裕一、園田洋史、立石陽子、佐々木和人、室野浩司、江本成伸、松崎裕幸、横山雄一郎、阿部真也、永井雄三、吉岡佑一郎、品川貴秀、牛久哲男、石原聡一郎
2. 発表標題 閉塞性大腸癌における局所の機械的刺激と神経侵襲の関連の検討
3. 学会等名 第97回大腸癌研究会
4. 発表年 2022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	石原 聡一郎  (Ishihara Soichiro)  (00376443)	東京大学・医学部附属病院・教授   (12601)	
研究分担者	川合 一茂  (kawai Kazushige)  (80571942)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員   (12601)	

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
研究 分 担 者	園田 洋史  (Hirofumi Sonoda)  (80770205)	東京大学・医学部附属病院・助教     (12601)	

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