

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 26 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590382

研究課題名（和文） 早期大腸癌のリンパ節転移における SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 シグナルの役割研究課題名（英文） The role of SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 signal in the lymph node metastases of early colon cancer.

研究代表者

井村 穰二（IMURA JOHJI）

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80316554

研究成果の概要（和文）：

早期大腸癌の治療においてリンパ節転移を予測するマーカーの確立が切望されている。本研究では、CXCR4とSDF-1 $\alpha$ の発現意義を解明し、その発現が転移を予測しうるか検討する。

大腸癌組織における両因子の発現の局在とリンパ節転移との相関性に関して比較する。また、低酸素状態でCXCR4の発現を増強させるHIFおよび基底膜関連物質であるLaminin-5 $\gamma$ 2chainとの共発現を検討する。細胞集塊からの解離に両因子が関与するか、三次元培養条件で比較検討する。

研究成果の概要（英文）：

[The purpose of this study]

The endoscopic resection with a low aggressiveness is expected from the treatment for patients of early colon cancer. However, they have been removed surgically until now though the risk of lymph node metastases are less than 10%. If the lymph node metastatic mechanism of colon cancer is elucidated and the marker to predict lymph node metastases is established, the patients of early colon cancer without lymph node metastasis might be cured by the endoscopic resection with low aggressiveness. Therefore, comparing between the expression of CXCR4 and of its ligand SDF-1 $\alpha$  and the clinicopathological factors in this study, I clarify whether both factors are an useful marker to predict the lymph node metastases in the early colon cancer.

[The study design]

(1) Histopathological examination about the expression of CXCR4 and SDF-1 $\alpha$  in the colon cancer tissue.

①Localization of the expression in the tumor tissue:

Localization of the expression for CXCR4 and SDF-1 $\alpha$  in the primary lesion of surgically resected specimens provided from colon cancer patients was immunohistochemically examined. The expression of both factors was compared about the correlation with lymph node metastases.

②The examination for coexpressed factors:

The coexpression of Hypoxia inducible factor (HIF) to let overexpression of CXCR4 in hypoxic condition and Laminin-5 $\gamma$ 2chain to be one of the basement membrane components were examined. The ability to dissociate from the neoplastic nest, the migration and the adhesion ability of tumor cells correlated with CXCR4/SDF-1 $\alpha$  signaling.

(2)Correlation with the ability of migration and adhesion:

①It was examined whether the CXCR4 overexpression colon cancer cells transfected using the expression vector affected the ability of migration and adhesion.

Similarly, it was considered whether the CXCR4 reduced cells by siRNA affect these phenomenon.

②The expression of both factors examined the differences between the single layered colon cancer cells and the spheroid formed cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

### 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国における各臓器における悪性腫瘍の発生の頻度に変貌してきていることが注目され、環境要因と共に食生活の欧米化に伴うものか、従来、胃癌に大腸されるものから、肺癌、乳癌をはじめとして大腸癌の発生が急増している。それに相応して、死亡率も増加していることは明白である。現行では、大腸癌の早期診断には、従来の造影による下部消化管造影から内視鏡検査の頻度を増し、機器の進歩に留まらず、診断技術の向上は飛躍的で、微小な病変も捕捉することに繋がっている。また、表面の微細構造を観察することで、良悪性の判断のみならず、腫瘍細胞の浸潤の有無までも評価できるようになってきているなど、めざましい進歩を来している。一方、これら飛躍的にその技術、知識が向上し、経験が積まれた大腸内視鏡分野ではあるが、深達度診断の面ではある程度の評価が可能となってきたが、リンパ節転移の有無に関して、通常の内視鏡観察やそれらの際の生検材料から評価することは困難であった。従来では、ある程度深部浸潤が疑われる症例に対しては、手術的に当該部位を切除するだけでなく、リンパ節郭清も行われてきたが、それらの多くにおいてリンパ節転移が無いものが多い。結果的に、侵襲性の高い手術を施行せざる、かつ、それらの多くの症例で過度な治療を選択せざるを得ない状況には何らかの対策を取らざるを得ない。そこで、侵襲性に少ない大腸内視鏡検査にて得られる材料から、リンパ節転移を評価し得るような生物学的マーカーの見出すことは重要なことである。

### 2. 研究の目的

これまでの大腸癌の診断と治療戦略の向上から、より早期に発見でき、患者にとって

可能な限り低侵襲な内視鏡的切除が望まれるが、背景にも述べられているよう、現状ではリンパ節転移の危険性(10%以下)を考慮して、外科的に切除されている場合がほとんどである。これらの過度な治療を加えざるを得ない状況を解決すべく何らかの手段を検討する必要がある。その初期段階として、早期大腸癌のリンパ節転移メカニズムを解明することは重要であり、その結果から導き出されるような、リンパ節転移を予測するマーカーを確立すれば早期大腸癌を低侵襲な内視鏡的切除術で治療する道が開かれる。そこで本研究では、CXCR4 とそのリガンドである SDF-1 $\alpha$  の発現意義を臨床病理学的に解明し、CXCR4 と SDF-1 $\alpha$  の発現様式が早期大腸癌のリンパ節転移の予測マーカーとして有用であるか明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)大腸癌組織におけるCXCR4とSDF-1 $\alpha$ の発現に関する病理組織学的検討

本研究の施行に対し患者の同意が得られた症例の内視鏡的あるいは手術的に摘出された検体より、通常ホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いた。これら包埋材料から切片を従来法に従い免疫組織学的検索を行った。具体的には、切片を脱パラフィン処理と親水化後、内因性のペルオキシダーゼの不活化を行い、さらにリン酸バッファー下で熱処理(95 $^{\circ}$ C、15分)にて抗原の賦活化を行った。賦活化処理を行った切片に対し、人右位的な結合を防ぐ目的で、1%胎児血清添加PBSにて処理を行った後、一次抗体の反応(室温、2時間)を行った。用いた一次抗体は抗CXCR-4抗体(BD Biosciences Pharmingen)と抗SDF-1 $\alpha$ (R & D System Inc.)である。これらを洗浄の後、ABC

法 (UltraTech kit, Immunotech) とDAB発色により可視化して顕微鏡下に観察した。

切片における観察部位は非腫瘍部と共に、腫瘍組織におけるCXCR-4とSDF-1 $\alpha$ の発現の局在部位について注目した。さらに発現の有無とその局在の差異と、リンパ節転移などの臨床病理学諸因子との相関性に関して比較検討した。

低酸素状態におけるCXCR4の発現を増強させるHypoxia inducible factor: HIFおよび基底膜関連物質であるLaminin-5 $\gamma$ 2chainとの共発現の有無を検討した。上記3-(1)-①で使用した切片を同様の方法に従い、抗HIF-1 $\alpha$  (Sigma-Aldrich)と抗Laminin-5 $\gamma$ 2chain抗体 (Chemicon)を用いて免疫組織学的に検討した。

(2)CXCR4/SDF-1 $\alpha$ シグナルの遊走・接着能及び腫瘍細胞集塊からの解離におよぼす効果の検討

大腸癌細胞株 (HT29) に対しCXCR4遺伝子発現ベクターを用いたCXCR4強発現させた細胞や同様の細胞に対しsiRNAによるCXCR4抑制させた細胞などを作成した。これらの細胞を用い、遊走能や接着能に変化をおよぼすかを検討した。

細胞集塊解離におよぼす影響

大腸癌細胞 (HT29) を通常の5%CO<sub>2</sub>および90%N<sub>2</sub>の存在のものと低酸素状態下で、接着系での単層性平面培養条件と、低接着性培養シャーレ (HydroCell™, 和光) を用いSpheroid形成を目的と培養を行った細胞株におけるCXCR-4およびSDF-1 $\alpha$ の両因子の発現に差異について検討すると共に、また集塊からの解離に影響をおよぼすかを観察した。

#### 4. 研究成果

(1)大腸癌組織におけるCXCR4とSDF-1 $\alpha$ の発現に関する病理組織学的検討

合計60名の大腸癌患者におけるCXCR-4およびSDF-1 $\alpha$ の発現の有無とその局在を観察し得た。CXCR-4が発現していた症例は47/60 (78%)に認められた。臨床病理学的諸因子との相関では、性差、年齢、腫瘍の存在部位、大きさ、分化度などとは有意な相関は認められなかった。一方、病理病期とは有意に病期が進行するに従い発現頻度は高まり ( $p<0.0001$ )、また、リンパ管侵襲とは傾向は見いだせるものの有意な相関はないが ( $p=0.07$ )、リンパ節転移とは発現例の多くがリンパ節転移を生じてた ( $p<0.004$ )。

の細胞内局在からみると核内を主体とするものは29/60例 (48%)に認められ、その中でも有意な相関を示す因子として分化度、病理病

期とリンパ節転移 ( $p<0.05$ )等であった。

一方、SDF-1 $\alpha$ の発現例は病期の推移 ( $p<0.0005$ ) リンパ管侵襲 ( $p<0.001$ )、血管侵襲 ( $p<0.05$ )およびリンパ節転移 ( $p<0.005$ )と有意な相関を認めた。

HIF-1 $\alpha$ の発現する細胞は主に胞巣から解離して単一細胞性に浸潤する芽出部分や浸潤先進部の腫瘍細胞に多く認められた。さらにLaminin 5 $\gamma$ 2 chainも同様に芽出部分や浸潤先進部に発現するだけでなく、間質の線維化を伴った部位では間質の線維芽細胞様細胞や周囲の間質の線維にも微弱ながら発現を認めた。

(2) CXCR4/SDF-1 $\alpha$ シグナルの遊走・接着能及び腫瘍細胞集塊からの解離におよぼす効果の検討

単層培養条件下では集塊を形成しがたいHT29大腸癌細胞株は非接着性培養かでは容易にその形態を変貌させ、3次元的配列と結合を示すSpheroidの形成した (図1)。これらのSpheroidは低酸素状態に移すとこれらの結合した状態のSpheroidから細胞が解離する傾向を示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

1. Imura J, Fujimori T. IgG4-related plasmacytic enteropathy mimicking ulcerative colitis. *Int J Surg Pathol.* 2012; 20(1):59.査読有
2. Shida Y, Fujimori T, Tanaka H, Fujimori Y, Kimura R, Ueda H, Ichikawa K, Tomita S, Nagata H, Kubota K, Tsubaki M, Kato H, Yao T, Sugai T, Sugihara K, Ohkura Y, Imura J. Clinicopathological features of serrated adenocarcinoma defined by mäkinen in dukes' B colorectal carcinoma. *Pathobiology.* 2012; 79(4):169-74.査読有
3. Iwasaki Y, Tagaya N, Nakagawa A, Kita J, Imura J, Fujimori T, Kubota K. Laparoscopic resection of epidermoid

- cyst arising from an intrapancreatic accessory spleen: a case report with a review of the literature. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2011; 21(5):275-9. 査読有
4. Tanaka H, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Yamagishi H, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Yasuda Y, Chiba T, Fujimori T. Immunohistochemical analysis of REG I $\alpha$  expression in ulcerative colitis-associated neoplastic lesions. *Digestion.* 2011; 83(3):204-9. 査読有
  5. Yamagishi H, Fukui H, Tomita S, Ichikawa K, Imura J, Ishizuka M, Kubota K, Fujimori T. Ectopic gastric mucosa and pancreatic ducts in the rectum. *Intern Med.* 2011; 50(15):1587-9. 査読有
  6. Singhi AD, Hruban RH, Fabre M, Imura J, Schulick R, Wolfgang C, Ali SZ. Peripancreatic paraganglioma: a potential diagnostic challenge in cytopathology and surgical pathology. *Am J Surg Pathol.* 2011; 35(10):1498-504. 査読有
  7. 井村穰二, 木村隆輔, 内田好明, 市川一仁, 藤盛孝博医療の均霑化に向けての病理・細胞診の関わり病理と臨床 2011; 29(12):1376-8. 査読無
  8. Fukui H, Sekikawa A, Tanaka H, Fujimori Y, Katake Y, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T. DMBT1 is a novel gene induced by IL-22 in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17(5):1177-88. 査読無
  9. Sekikawa A, Fukui H, Suzuki K, Karibe T, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Shiratori K, Chiba T, Fujimori T. Involvement of the IL-22/REG I $\alpha$  axis in ulcerative colitis. *Lab Invest.* 2010; 90(3):496-505. 査読有
  10. Hirose M, Fukui H, Igarashi Y, Fujimori Y, Katake Y, Sekikawa A, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Ajioka Y, Ueno H, Hase K, Ohkura Y, Kashida H, Togashi K, Nishigami T, Matsui T, Yao T, Wada R, Matsuda K, Watanabe T, Ochiai A, Sugai T, Sugihara K, Fujimori T. Detection of desmoplastic reaction in biopsy specimens is useful for predicting the depth of invasion of early colorectal cancer: a Japanese collaborative study. *J Gastroenterol.* 2010; 45(12):1212-8. 査読有
  11. Ogata H, Sekikawa A, Yamagishi H, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Ito Y, Fujita M, Tsubaki M, Kato H, Fujimori T, Fukui H. GRO $\alpha$  promotes invasion of colorectal cancer cells. *Oncol Rep.* 2010; 24(6):1479-86. 査読有
  12. 井村穰二, 常松一恵, 内田好明, 阿部香織, 新発田雅晴, 藤盛孝博. 術中迅速細胞診の普及に向けて 病理と臨床 2010; 28(12): 1312-4. 査読無
  13. Yamagishi H, Fukui H, Sekikawa A, Kono T, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Hiraishi H, Chiba T, Fujimori T. Expression profile of REG family proteins REG I $\alpha$  and REG IV in advanced gastric cancer: comparison with mucin phenotype and prognostic markers. *Mod Pathol.* 2009; 22(7):906-13. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. 井村穰二, 阿部香織, 富田茂樹, 大竹真一郎, 市川一仁, 藤盛孝博 乳癌におけるインスレーター機構としてのCTCF-1 の役割 第 70 回日本癌学会総会.名古屋. 名古屋国際会議場. 2011.10.4.
2. 井村穰二, 内田好昭, 安田真大, 古村祐紀, 阿部香織, 新発田雅晴, 小谷松寿美子, 米川伸生, 富田茂樹, 藤盛孝博膵臓細胞診における質的診断向上への試み膵臓細胞診の質的精度向上に向けた新たな取り組み 第 52 回日本臨床細胞学会総会.福岡.福岡国際会議場. 2011.5.21
3. 井村穰二, 山岸秀嗣, 富田茂樹, 市川一仁, 加藤洋, 藤盛孝博. 肝細胞癌における新たな癌幹細胞因子の探索 第 100 回日本病理学会総会. 横浜. パシフィコ横浜. 2011. 4.28
4. 井村穰二, 阿部香織, 内田好明, 池田聡, 新発田雅晴, 常松一恵, 富田茂樹, 飯嶋達生, 鈴木恵子, 藤盛孝博分子診断に焦点を合わせた内臓病変の診断法、検査法分子診断を目的とした内臓病変におけるmethyl化異常の捕捉第 49 回日本臨床細胞学会秋季大会. 神戸. 神戸ポートピアホテル. 2010.11.20.
5. 井村穰二. 胆道・膵臓の細胞診 今後の胆道・膵臓の細胞診に求められる期待に応えるための新たな探究第 49 回日本臨床細胞学会秋季大会. 神戸. 神戸ポートピアホテル. 2010.11.20.
6. 井村穰二, 斉藤仁昭, 富田茂樹, 藤盛孝博 子宮体部内膜癌の発生に関わる各種遺伝子の Promoter 領域における Methylation状態の検討. 第 57 回日本臨床検査医学会. 東京. 京王プラザホテル. 2010.8.28.
7. 井村穰二 今後の細胞診と応用可能な工夫 第 51 回日本臨床細胞学会総会.東京. 京王プラザホテル. 2010.5.30.
8. 井村穰二, 富田茂樹, 市川一仁, 関川昭, 福井広一, 藤盛孝博 膵癌Spheroid形成に関わる諸因子の検索 第 99 回日本病理学会総会. 東京. 京王プラザホテル. 2010.4.22.

[図書] (計 2 件)

1. 井村穰二, 藤盛孝博 病理診断の流れとポイント 癌診療指針のための病理診断プラクティス 食道癌・胃癌 中山書店, 2011.
2. 井村穰二 國実 久秋 びまん性星細胞腫, 髄膜腫, 退形成星細胞腫, 膠芽腫, 転移性脳腫瘍 アトラス 細胞診と病理診断, 医学書院, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

**井村 穰二 (IMURA JOHJI)**  
獨協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 80316554

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :