

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28日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591719

研究課題名（和文） 大腸癌転移を制御する候補遺伝子群の次ステップの研究

研究課題名（英文） A next step study on candidate genes regulating metastasis of colorectal cancer

研究代表者

三浦 康 (MIURA KOH)

東北大学・病院・講師

研究者番号：40282074

研究成果の概要（和文）： 22種類の大腸癌細胞株のリンパ節転移実験のマウス標本(Cancer Sci. 2008; 99(4):711-9)における EMT について、E-cadherin, vimentin について免疫組織化学的解析を行い、HCT116 細胞株において E-cadherin (-), vimentin (+)、HT29 細胞株で E-cadherin (+), vimentin (-)など対照的な結果が得られ、現在 22 種での全容を明らかにしている。リンパ節転移を有した大腸癌細胞株で高発現であった遺伝子群 (RNF125, TCF25, CRIP1, その他)、低発現であった遺伝子群 (LOXL3, EN2, P2RX5, その他) について、臨床検体を用いて定量 RT-PCR による発現の検討を行い、RNF125, CRIP1 の両遺伝子については、stage が進むごとに発現量が上昇する傾向を認めた。一方、LOXL3, EN2, P2RX5 遺伝子については、stage が進むごとに発現量が低下する傾向と推察するが、発現量と照らし合わせて検証を進めている。

研究成果の概要（英文）： We are analyzing orthotopically-transplanted tumors of 22 types of colorectal cancer cell lines in mouse models on epithelial-to-mesenchymal transition. Firstly E-cadherin and vimentin were immunohistochemically analyzed, and contrasting results were obtained with two cell lines: HCT116 and HT29. Currently we are examining the results for 22 types of cell lines. Next, we are analyzing the expressions of *RNF125*, *TCF25*, *CRIP1*, *LOXL3*, *EN2*, *P2RX5* and other genes, which are candidate genes to regulate lymph node metastasis, on their expressions with RT-PCR using clinical materials, whether the results are reproducible compared with those acquired with cell lines. It seems that the expressions of *RNF125* and *CRIP1* are higher in more advanced cases; on the other hand, the expressions of *LOXL3*, *EN2*, and *P2RX5* genes seems to be lower in more advanced cases although the results still have to be confirmed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード： 大腸癌・転移

1. 研究開始当初の背景

大腸癌に生涯に罹患する確率は約7%と日本国内で増加しており、胃癌を抜いて肺癌に

ついで第2位である。外科治療法の改良、切除不能・再発大腸癌に対する集学的治療の進歩は目覚ましいものがあるが、その治療成績はいまだ満足できるものではなく、治療成績の改善には早期診断法の確立と、大腸癌の転移（リンパ節、肝、肺、その他）の制御が必要である。

2. 研究の目的

(1) 大腸癌のリンパ節転移を規定する候補遺伝子群 (RNF125, TCF25, CRIP1, LOXL3, EN2, P2RX5 遺伝子、その他) の、臨床検体での発現様式を明らかにする。

(2) 大腸癌細胞株の転移様式を、マウスの病理組織標本で解析する。

(3) 発現調節にもとづく *in vitro* の実験を行い、機能解析へと進める。

(4) 上皮間葉系転換 (epithelial-to-mesenchymal transition; EMT) 等の転移カスケードの解析へつなげる。

(5) 上記の結果により、大腸癌の転移制御の診断・治療への臨床応用の道を探る。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子群 (RNF125, TCF25, CRIP1, LOXL3, EN2, P2RX5 遺伝子、その他) の臨床検体における RT-PCR での発現様式を明らかにする。

(2) 候補遺伝子群の臨床検体における免疫染色による発現様式を明らかにする。

(3) *in vitro* での発現調節による機能解析へと進める。

(4) E-cadherin, vimentin その他の EMT の関連因子を免疫染色により解析する。

4. 研究成果

(1) マウス転移モデルにおける原発巣、リンパ節転移巣の病理組織学的解析：

22種類の大腸癌細胞株のリンパ節転移実験のマウス標本(Cancer Sci. 2008; 99(4):711-9)における、EMTを含めた病理組織学的、免疫組織学的な解析を進めてきた。EMTについて、まずE-cadherin, vimentinについて免疫組織化学的染色にもとづく解析を進めた。HCT116細胞株においてE-cadherin (-), vimentin (+)、HT29細胞株でE-cadherin (+), vimentin (-) など対照的な結果が得られ、現在22種での全容を明らかにしている。さらにfibronectin, vimentin, cytokeratinなどの免疫組織化学染色にもとづく発現も、原発巣および転移巣につ

いて解析している。

(2) 候補遺伝子群 (RNF125, TCF25, CRIP1, LOXL3, EN2, P2RX5遺伝子、その他) の臨床検体における発現の検討：リンパ節転移を有した大腸癌細胞株で高発現であった遺伝子群 (RNF125, TCF25, CRIP1, その他)、低発現であった遺伝子群 (LOXL3, EN2, P2RX5, その他) について、臨床検体を用いて定量RT-PCRによる発現の検討を行ってきた。進行度との相関において、RNF125, CRIP1の両遺伝子については、stageが進むごとに発現量が上昇する傾向を認めた (RNF125: II: 2.3±0.4 AU; III: 6.0±2.3, IV: 6.2±4.1, など)。一方、LOXL3, EN2, P2RX5遺伝子については、stageが進むごとに発現量が低下する傾向を認めるが、発現量と照らし合わせて検証を進めている。

(3) beta-cateninの発現解析

22種類の大腸癌細胞株の原発巣、転移巣の解析において、beta-cateninの核内集積、細胞質内への集積、細胞膜への集積など、22種間で特徴的な結果が得られてきている。

(4) 22種類の大腸癌細胞株において、リンパ節転移以外の転移様式の解析：同所移植モデルにて肝転移を有する大腸癌細胞株

(HT-29, CX-1, T84, HST116, COLO320など) と肝転移を有しない大腸癌細胞株

(KM12c, Clone A, MIP101など) について、マイクロアレイデータとの相関から、肝転移を規定している遺伝子群の抽出を試みている。

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16件)

- ① Toshima M, Miura K, Ishida K, Mizoi T, Naitoh T, Ogawa H, Ohnuma S, Sasaki H, Watanabe K, Haneda S, Sase T, Kajiwaru T, Matsuda Y, Shibata C, Sasaki I. Young-onset perianorectal leiomyomatosis: Report of a case. Surg Today. In press (accepted on Nov. 24, 2011.) (査読有)
- ② Miura K, Ishida K, Fujibuchi W, Ito A, Niikura H, Ogawa H, Sasaki I. Differential diagnosis of rectal carcinoma using immunohistochemistry of carcinomas from other pelvic organs with NCBI literature survey and the Human Protein Atlas

- database. *Surg Today*. In press (accepted on Aug. 1, 2011.) (査読有)
- ③ Miura K, Shirasaka T, Yamaue H, Sasaki I. S-1 as a core anticancer fluoropyrimidine agent. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012 Mar;9(3):273-86. Epub 2012 Jan 11. (査読有)
- ④ Ikezawa F, Shibata C, Kikuchi D, Imoto H, Miura K, Naitoh T, Ogawa H, Sasaki I, Tsuchiya T. Effects of ileal interposition on glucose metabolism in obese rats with diabetes. *Surgery*. 2012 Feb 6. [Epub ahead of print] (査読有)
- ⑤ Kinouchi M, Miura K, Mizoi T, Ishida K, Fujibuchi W, Ando T, Yazaki N, Saito K, Shiiba K, Sasaki I. Infiltration of CD14-positive macrophages at the invasive front indicates a favorable prognosis in colorectal cancer patients with lymph node metastasis. *Hepatogastroenterology*. 2011 Mar-Apr;58(106):352-8. (査読有)
- ⑥ Miura K, Fujibuchi W, Sasaki I. Alternative pre-mRNA splicing in digestive tract malignancy. *Cancer Sci*. 2011 Feb;102(2):309-16. (査読有)
- ⑦ Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Naitoh T, Ogawa H, Ando T, Yazaki N, Watanabe K, Haneda S, Shibata C, Sasaki I. Inhibitor of apoptosis protein family as diagnostic markers and therapeutic targets of colorectal cancer. *Surg Today*. 2011 Feb;41(2):175-82. Epub 2011 Jan 26. (査読有)
- ⑧ Sato M, Shibata C, Kikuchi D, Ikezawa F, Imoto H, Kakyo M, Kinouchi M, Tanaka N, Miura K, Naitoh T, Ogawa H, Sasaki I. Effect of viscosity of enteral nutrient on gut motility and hormone secretion in dogs. *Hepatogastroenterology*. 2011 Jan-Feb;58(105):36-41. (査読有)
- ⑨ Watanabe M, Kinoshita H, Nitta M, Yukishita R, Kawai Y, Kimura K, Taketomo N, Yamazaki Y, Tateno Y, Miura K, Horii A, Kitazawa H, Saito T. Identification of a new adhesin-like protein from *Lactobacillus mucosae* ME-340 with specific affinity to the human blood group A and B antigens. *J Appl Microbiol*. 2010 Sep;109(3):927-35. (査読有)
- ⑩ Hayashi K, Shibata C, Nagao M, Sato M, Kakyo M, Kinouchi M, Saijo F, Miura K, Ogawa H, Sasaki I. Intracolonic capsaicin stimulates colonic motility and defecation in conscious dogs. *Surgery*. 2010 Jun;147(6):789-97. (査読有)
- ⑪ Kaneko N, Miura K, Gu Z, Karasawa H, Ohnuma S, Sasaki H, Tsukamoto N, Yokoyama S, Yamamura A, Nagase H, Shibata C, Sasaki I, Horii A. siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 390: 1235-1240. (査読有)
- ⑫ Miura K, Karasawa H, Sasaki I. cIAP2 as a therapeutic target in colorectal cancer and other malignancies. *Expert Opin Ther Targets*. 2009; 13(11):1333-1345. (査読有)
- ⑬ Nagao M, Shibata C, Funayama Y, Fukushima K, Miura K, Ogawa H, Ueno T, Kudoh K, Unno M, Sasaki I. The effect of a total colectomy on the motor inhibition of the upper gut induced by intraileal stimuli in conscious dogs. *Surg Today*. 2009;39(9):780-6. (査読有)
- ⑭ Karasawa H, Miura K, Ishida K, Sase T, Kobayashi T, Kinouchi M, Okabe M, Ando T, Kaneko N, Yamamura A, Shibata C, Sasaki I. Cronkhite-Canada Syndrome Complicated with Huge Intramucosal Gastric Cancer: Report of a Case. *Gastric Cancer*. 2009;12(2):113-7. (査読有)
- ⑮ Karasawa H, Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Kaneko N, Kinouchi M, Okabe M, Ando T, Murata Y, Sasaki H, Takami K, Yamamura A, Shibata C, Sasaki I. Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Sci*. 2009 May;100(5):903-13. (査読有)
- ⑯ Sato R, Suzuki T, Katayose Y, Miura K, Shiiba K, Tateno H, Miki Y, Akahira J, Kamogawa Y, Nagasaki S, Yamamoto K, Ii T, Egawa S, Evans DB, Unno M, Sasano H.

Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in colon carcinoma: regulators of intratumoral estrogen concentrations and potent prognostic factors. *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):914-22. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 三浦康, 大沼忍, 藤渕航, 石田和之, 佐々木巖 胃癌・大腸癌における選択的 pre-mRNA スプライシングの制御の異常の解明とその臨床応用 第 49 回日本癌治療学会総会学術集会(2011 年 10 月 29 日、名古屋)
- ② 三浦康, 藤渕航, 大沼忍, 唐澤秀明, 木内誠, 内藤剛, 小川仁, 矢崎伸樹, 柴田近, 佐々木巖 消化器癌に対する分子生物学の臨床応用(肝胆膵・上部消化管) 胃癌・大腸癌における選択的 pre-mRNA スプライシングの異常の解明とその臨床応用 第 66 回日本消化器外科学会総会(2011 年 7 月 15 日、名古屋)
- ③ 三浦康, 唐澤秀明, 大沼忍, 佐々木宏之, 内藤剛, 小川仁, 木内誠, 安藤敏典, 矢崎伸樹, 渡辺和宏, 羽根田祥, 山村明寛, 佐瀬友彦, 柴田近, 佐々木 IAP ファミリーおよび 5-FU 感受性の制御による大腸癌の治療戦略と個別化治療への応用 第 111 回日本外科学会学術集会(2011 年 5 月 26 日、東京)
- ④ Miura K, Katayose Y, Oikawa M, Yamauchi J, Sakurai N, Musha H, Narushima Y, Nakagawa K, Egawa S, Unno M. A phase II multicenter trial of neoadjuvant chemotherapy FOLFOX6 in combination with bevacizumab for patients with resectable synchronous liver metastases after R0-resections of primary colorectal cancers: The interim analysis. 2011 Gastrointestinal Cancers Symposium (2011 年 1 月 16 日、サンフランシスコ、米国) Poster
- ⑤ Miura K, Tsuchiya T, Tanno H, Shiiba K, Shimamura H, Suzuki Y, Nakamura R, Kimura Y, Naitoh H, Shibata C, Sasaki I. Multicenter feasibility study of the Sendai Oncologist Salon (SOS) group on the adjuvant Chemotherapy with a 4-week administration method of S-1 for Colorectal

Cancer - Interim Report - 9th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society (2010 年 8 月 26 日、岐阜) Oral session

- ⑥ 三浦康, 唐澤秀明, 山村明寛, 内藤剛, 小川仁, 安藤敏典, 矢崎伸樹, 佐瀬友彦, 柴田近, 佐々木巖 大腸癌の 5-FU 感受性を規定する predictive marker としての cIAP2 遺伝子の臨床への応用 第 65 回日本消化器外科学会総会(2010 年 7 月 14 日、山口)
- ⑦ 三浦康, 唐澤秀明, 佐々木巖 消化器疾患における分子腫瘍マーカーの新展開 大腸癌の 5-FU 感受性規定因子としての cIAP2 遺伝子および IAP ファミリー遺伝子群の研究とその臨床応用 第 96 回日本消化器病学会(2010 年 4 月 24 日、新潟) ワークショップ
- ⑧ 三浦康, 藤渕航, 唐澤秀明, 大沼忍, 佐々木宏之, 矢崎伸樹, 田中直樹, 金子直征, 山村明寛, 佐瀬友彦, 小川仁, 安藤敏典, 羽根田祥, 柴田近, 鹿郷昌之, 木内誠, 西條文人, 鈴木秀幸, 木村俊一, 福島浩平, 佐々木巖 当科での癌研究への取り組みと今後の展望 第 109 回日本外科学会学術集会(2010 年 4 月 9 日、名古屋)
- ⑨ 三浦康, 佐々木宏之, 藤渕航, 石田和之, 矢崎伸樹, 唐澤秀明, 山村明寛, 小川仁, 木内誠, 安藤敏典, 田中直樹, 羽根田祥, 佐瀬友彦, 柴田近, 佐々木巖 臨床検体を用いた大腸癌転移を制御する遺伝子群の同定と新規治療法の開発 第 47 回日本癌治療学会学術集会(2009 年 10 月 24 日、横浜)
- ⑩ 三浦康, 大沼忍, 金子直征, 唐澤秀明, 山村明寛, 佐瀬友彦, 堀井明, 藤渕航, Lee Christopher, 木内誠, 小川仁, 安藤敏典, 佐々木巖 胃癌切除標本を活用した胃癌に特異的な splicing variants の同定と生命科学情報の利用、臨床応用 第 68 回日本癌学会総会(2009 年 10 月 1 日、横浜)
- ⑪ 三浦康, 佐々木宏之, 小川仁, 岡部光規, 安藤敏典, 羽根田祥, 鹿郷昌之, 木内誠, 柴田近, 佐々木巖 動物モデルと外科標本を用いた大腸癌リンパ節転移を制御する遺伝子群の同定と臨床への応用

第 64 回日本消化器外科学会総会(2009
年 7 月 17 日、大阪)

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Miura K, Kinouchi M, Ishida K, Fujibuchi W, Naitoh T, Ogawa H, Ando T, Yazaki N, Watanabe K, Haneda S, Shibata C, Sasaki I. Cancers (ISSN: 2072-6694), Special Issue: Cell Death and Cancer (Edited by Prof. Samali A); 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. MDPI Publishing (Basel, Switzerland); 2010 Vol. 2, 1717-1730.

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 康 (MIURA KOH)

東北大学・病院・講師

研究者番号 : 40282074

(2)研究分担者

(3)連携研究者