

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890106

研究課題名（和文） 大腸癌患者における糞便・末梢血からのあらたな発癌・予後マーカーの確立

研究課題名（英文） Establishment of biomarker and prognostic marker of feces and peripheral blood in colorectal cancer patients

研究代表者

奥川 喜永 (Okugawa Yoshinaga)

三重大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30555545

研究成果の概要（和文）：

大腸癌発生過程の多段階発癌に関与する遺伝子異常が明らかにされてきており、糞便を検体としてこれらの遺伝子異常を検索することで、より精度の高いスクリーニング法の確立が試みられている。また一方で、便潜血検査に代替しうる末梢血を用いた新たな大腸癌バイオマーカーの検索や、進行性大腸癌における新たな予後マーカーの確立もまた、大腸癌治療を飛躍的に進歩させる一助となりうる。

本研究は大腸癌患者群と健常者群の糞便中 cDNA と末梢血を用いて、大腸癌におけるあらたなバイオマーカー/予後マーカーを検索し、便潜血検査に代替しうるあらたな検査方法を確立することを目的とする。我々は DPEP-1 (Dipeptidase-1) が免疫染色で大腸癌組織においてのみ、特異的に発現していることを確認し、FAP (familial adenomatous polyposis) において、p53 変異の後に発現することを確認した。以上のことから carcinogenesis において、DPEP-1 は p53 変異より、より悪性度の高い腫瘍の早期検出の可能性を考慮した。また大腸癌患者糞便中 cDNA から有用なマーカーを発見できなかったものの、大腸癌組織における sIL-6R 発現低下が trans-signaling pathway を介する大腸癌進展に深く関与する可能性を確認し、報告した。また大腸癌患者術前末梢血を用いた検討では、cytokine array を施行し、CXCL16 が、大腸癌 stage IV 群で高値を示し、大腸癌術前血清約 200 例をもちいた検討でも、肝転移との相関を強く認め、予後マーカーとしての有用性が示唆された。肝転移との相関を強く認めたことから、臓器特異性転移のメカニズムに深く関与する可能性を考慮し、現在、そのメカニズムの解明を継続中である。

研究成果の概要（英文）：

The gene abnormality that is involved in carcinogenesis of colorectal cancer has been clarified. Recently, some researchers tried to establish the high accurate screening method by detecting the gene abnormalities of the feces. Moreover, the establishment of the new prognostic marker and biomarker of the peripheral blood in colorectal cancer patients can be helped to advance the treatment of colorectal cancer. The aim of this study is to detect the new prognostic marker and biomarker in colorectal cancer patients used with feces and peripheral blood. We have demonstrated that DPEP1 expression in normal colonic mucosa was very low, but it was highly expressed in colorectal adenoma and cancer specimens. DPEP1 expression in colorectal cancer was negatively correlated with parameters of pathological aggressiveness and poor prognosis. In addition, DPEP-1 was expressed after the mutation of p53 in familial adenomatous polyposis (FAP) patients. These data suggested that DPEP1 is expressed in the early stages of colon carcinogenesis and affects cancer cell invasiveness. Although we could not demonstrate a significant gene marker of the feces in colorectal cancer, we could show that loss of tumour expression of sIL-6R was associated with colorectal cancer disease progression via IL-6 trans-signaling pathway. Moreover, analysis of preoperative peripheral blood of colorectal cancer patients showed that increased expression of CXCL16 was associated with disease progression and poor prognosis. Because this marker was strongly correlated with

hepatic metastasis, we are being continued to clarify the association between these markers and the mechanism of organ specific metastasis in vivo and in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,470,000	441,000	1,911,000
2010年度	1,140,000	342,000	1,482,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,610,000	783,000	3,393,000

研究分野：消化管外科・小児外科

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 マーカー 糞便 血液

1. 研究開始当初の背景

大腸癌発生過程の多段階発癌に関与する遺伝子異常が明らかにされてきており、糞便を検体としてこれらの遺伝子異常を検索することで、より精度の高いスクリーニング法の確立が試みられている。また一方で、便潜血検査に代替しうる末梢血を用いた新たな大腸癌バイオマーカーの検索や、進行性大腸癌における新たな予後マーカーの確立もまた、大腸癌治療を飛躍的に進歩させる一助となりうる。

2. 研究の目的

大腸癌患者群と健常者群の糞便中 cDNA と末梢血を用いて、大腸癌におけるあらたなバイオマーカー/予後マーカーを検索し、便潜血検査に代替しうるあらたな検査方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

便中 cDNA の抽出し、microarray, realtime PCR を施行したほか、標的遺伝子を確認した場合には、RNAi を用いて in vitro (cell proliferation assay, colony formation assay, cell cycle check, migration assay, invasive assay, anoikis assay など) で機能解析を行った。末梢血は cytokine array を施行し、Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) や原発巣を用いた免疫染色、in vitro (cell proliferation assay, colony formation assay, cell cycle check, migration assay, invasive assay, anoikis assay など)。また nude mouse を用いて肝転移モデルを作成し、目的蛋白の肝転移形成メカニズムの関与の解明を試みた。

4. 研究成果

我々は DPEP-1(Dipeptidase-1)が免疫染色

で大腸癌組織においてのみ、特異的に発現していることを確認し、FAP(familial adenomatous polyposis)において、p53 変異の後に発現することを確認した。以上のことから carcinogenesis において、DPEP-1 は p53 変異より、より悪性度の高い腫瘍の早期検出の可能性を考慮した。大腸癌細胞株を使用し、RNAi を施行して DPEP-1 の機能解析を in vitro で施行したところ、DPEP-1 は増殖能や、アポトーシスには関与しないものの、浸潤能に関与することから、DPEP-1 は癌発生早期の段階における浸潤能にも関与する可能性が考慮された。

また大腸癌患者糞便中 cDNA からの検討では多数の臨床検体を用いた解析で、有意差を示す有用なマーカーは指摘できなかったが、大腸癌組織における sIL-6R(可溶性 IL-6 レセプター)発現低下群が、臨床病理学的因子(深達度、遠隔転移)と有意に相関し、また予後不良となることを確認した。In vitro では大腸癌細胞株自身が、sIL-6R を発現することを確認し、その発現のメカニズムとして shedding と splicing の両者が関与することを証明した。また IL-6, mIL-6R(膜結合型 IL-6 レセプター)、gp130 の大腸癌組織における発現と sIL-6R 発現との相関を評価し、sIL-6R 発現が IL-6 発現と逆相関の関係を示すことから、IL-6 trans-signaling pathway を介する大腸癌進展に深く関与する可能性を報告した。また大腸癌患者術前末梢血を用いた検討では、cytokine array を施行し、大腸癌 stageIV群と stage I 群のそれぞれ 5 症例ずつの患者術前血清を用いて比較検討を行った。数個の有用性のありうるマーカーを同定し、その中から CXCL16 に着目し、約 230 症例の患者術前血清と 20 症例の健常者群血清を用いて、ELISA 法にて、その発現と臨床病理学的因子との相関を検討した。CXCL16

は健常者群と比較し、大腸癌患者群で有意に高値を示し、病期の進行(UICC stage)とともに上昇を示した。臨床病理学的因子では、CXCL16 高値群はリンパ節転移、肝転移と有意な相関を示し、多変量解析でも独立予後規定因子であった。Logistic regression analysis では、独立肝転移規定因子を示したことから、CXCL16 が臓器特異性転移のメカニズムに深く関与する可能性を考慮し、in vitro では CXCL16 のレセプターである CXCR6 発現大腸癌細胞株 (HT-29) を使用し、CXCL16 投与群と非投与群で機能解析を行った。Cell proliferation assay, migration scratch assay, invasive assay を施行し、CXCL16 は、cell growth, migration, invasion のいずれにも関与することが示唆された。CXCL16 投与群では、E-カドヘリンの発現低下、ビメンチンの発現上昇を示したため、CXCL16 が、epithelial mesenchymal transition(上皮間葉移行)に関与している可能性が考慮された。現在、in vivo の評価として、nude mouse (BALB/cAJcl-nu)を用いて肝転移モデルを作成し、CXCL16 の肝転移形成への関与の有無について、検討中である。

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9件)

1. DPEP1, expressed in the early stages of colon carcinogenesis, affects cancer cell invasiveness.

Toiyama Y, Inoue Y, Yasuda H, Saigusa S, Yokoe T, Okugawa Y, Tanaka K, Miki C, Kusunoki M.

J Gastroenterol. 2011 Feb;46(2):153-63.

査読有

2. Loss of tumoral expression of soluble IL-6 receptor is associated with disease progression in colorectal cancer.

Okugawa Y, Miki C, Toiyama Y, Yasuda H, Yokoe T, Saigusa S, Hiro J, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M.

Br J Cancer. 2010 Sep 7;103(6):787-95.

査読有

3. Stromal CXCR4 and CXCL12 expression is associated with distant recurrence and poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy.

Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Kawamoto A, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M.

Ann Surg Oncol. 2010 Aug;17(8):2051-8.

査読有

4. Soluble VCAM-1 and its relation to disease progression in colorectal carcinoma.

Okugawa Y, Miki C, Toiyama Y, Koike Y, Yokoe T, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M.

Experimental and Therapeutic Medicine. 2010 1(3):463-469. 査読有

5. Intravital imaging of DSS-induced cecal mucosal damage in GFP-transgenic mice using two-photon microscopy.

Toiyama Y, Mizoguchi A, Okugawa Y, Koike Y, Morimoto Y, Araki T, Uchida K, Tanaka K, Nakashima H, Hibi M, Kimura K, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M.

J Gastroenterol. 2010 May;45(5):544-53.

査読有

6. KAP1 is associated with peritoneal carcinoma matosis in gastric cancer.

Yokoe T, Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Ohi M, Inoue Y, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M.

Ann Surg Oncol. 2010 Mar;17(3):821-8.

査読有

7. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy.

Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, Miki C, Kusunoki M.

Ann Surg Oncol. 2009 Dec;16(12):3488-98.

査読有

8. Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients.

Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Okugawa Y, Tanaka K, Kusunoki M.

Int J Cancer. 2009 Oct 1;125(7):1657-62.

査読有

9. Serum level of soluble vascular cell adhesion molecule 1 is a valuable prognostic marker in colorectal carcinoma.

Okugawa Y, Miki C, Toiyama Y, Koike Y, Inoue Y, Kusunoki M.

Dis Colon Rectum. 2009 Jul;52(7):1330-6.

査読有

[学会発表] (計1件)

① 奥川喜永 ほか

大腸癌における腫瘍組織中 soluble IL-6
Receptor 発現の臨床病理学的意義
第110回日本外科学会 2010.4.10.名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥川 喜永 (Okugawa Yoshinaga)
三重大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30555545

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：