

## 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25年6月1日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591448

研究課題名（和文）CRP遺伝子多型による食道癌リンパ節転移診断法の開発と機序解明

研究課題名（英文）A novel diagnostic method using C-reactive protein genetic polymorphism in patients with thoracic esophageal cancer and its mechanisms

研究代表者

本山 悟 (MOTOYAMA SATORU)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60292372

研究成果の概要（和文）：

マウス背部皮下に扁平上皮癌細胞を下移植し、その後3日おきに、マウス頸部に recombinant CRP 1  $\mu$ g を皮下注した群と PBS を皮下注した群を作製した。5週間経過後、生着した腫瘍と鼠径部のリンパ節を摘出、リンパ節転移の有無と腫瘍内リンパ管新生に関して検討した。結果、コントロール群と比較し CRP 群ではリンパ節転移が少なかった。腫瘍のリンパ管新生を lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) 発現量で評価したところ、CRP 群で有意にリンパ管新生が少なかった。CRP は腫瘍のリンパ管新生を阻害することによってリンパ節転移を抑制した。

研究成果の概要（英文）：

We inoculated subcutaneously NR-S1M metastatic cells into the backs of C3H/HeN mice. Concurrently, 1  $\mu$ g of recombinant mouse CRP or PBS were injected subcutaneously every 3 days for 5 weeks, after which the mice were killed for evaluation. We evaluated lymph node metastasis and lymphangiogenesis in the implanted tumor using immunohistochemical analysis with anti-lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 antibodies. Immunohistochemical analysis confirmed inguinal lymph node metastasis in 70% of control mice, but in only 30% of mice in the CRP group. Moreover, tumoral lymphangiogenesis was decreased in the CRP group. CRP appears to inhibit tumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	105,000	4,550,000

研究分野：外科学

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：C反応性蛋白、リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

癌個別化治療が切望されている。至適個別化治療を行うために最も必要なのは治療前の正確かつ個別化された癌進展度診断である。特に食道癌では最新の画像診断を用いても十分なリンパ節転移診断を行うことができず、これが至適個別化治療の足かせになっている。

2. 研究の目的

最近我々は一般的な炎症マーカーである C 反応性蛋白 (CRP) 遺伝子多型が食道癌進展度、特にリンパ節転移と深く相関する事を発見した。この事象を逆手にとって患者遺伝子多型を癌リンパ節転移診断に用いようとするのが本研究の発想である。本申請研究の目的は、CRP による転移促進機序を解明することである。

3. 研究の方法

6-8 週齢の C3H/HeN マウス (雌) の背部皮下にマウス由来の扁平上皮癌細胞 (NR-S1M) を  $5 \times 10^6$  個皮下移植した。その後 3 日おきに、マウス頸部に recombinant CRP  $1 \mu\text{g}$  を皮下注した群 (CRP 群、 $n=10$ ) と PBS を皮下注した群 (コントロール群、 $n=20$ ) を作製した。両群間のマウス血清 CRP 濃度を測定し、5 週間経過後、生着した腫瘍と鼠径部のリンパ節を摘出、リンパ節転移の有無と腫瘍内リンパ管新生に関して検討した。

NR-S1M 細胞に Recombinant mouse CRP を濃度  $0 \mu\text{g/ml}$  (コントロール群)、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $50 \mu\text{g/ml}$  となるように添加し、それぞれ 18、36、48、72 時間培養、細胞増殖能、浸潤能、遊走

能について検討した。E-cadherin 発現は、CRP を加えて 72 時間培養した細胞を用い、蛍光免疫染色およびウエスタンブロッティングで解析した。

4. 研究成果

CRP 群の血清 CRP 濃度は CRP 投与後に徐々に上昇し、18 日目には  $9.9 \pm 4.3 \text{ng/ml}$  まで上昇した。コントロール群と CRP 群で腫瘍の大きさに差はなかったが、リンパ節の大きさは CRP 投与群で有意に小さかった ( $P < 0.05$ )。リンパ節転移の有無を Pancytokeratin 免疫染色で評価したところ、コントロール群では 14/20 匹 (70%)、CRP 群では 3/10 匹 (30%) にリンパ節転移を認め、CRP 群でリンパ節転移が少なかった。転移面積には両群で有意差を認めた (図 1)。

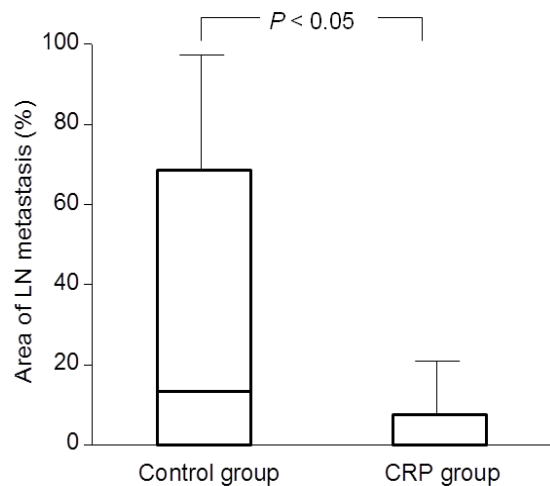


図 1 : CRP 皮下注によるリンパ節転移抑制効果

腫瘍のリンパ管新生を lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) 免疫染色で評価したと

ころ、CRP 群で有意にリンパ管新生が少なかった (P=0.0488)。腫瘍内 LYVE-1 蛋白量を Western blotting で評価した結果も同様に CRP 群で LYVE-1 の発現が低下していた (図 2-3)。

**Control group      CRP group**



図 2 : CRP 皮下注による腫瘍内 LYVE-1 の発現 (Western blotting)

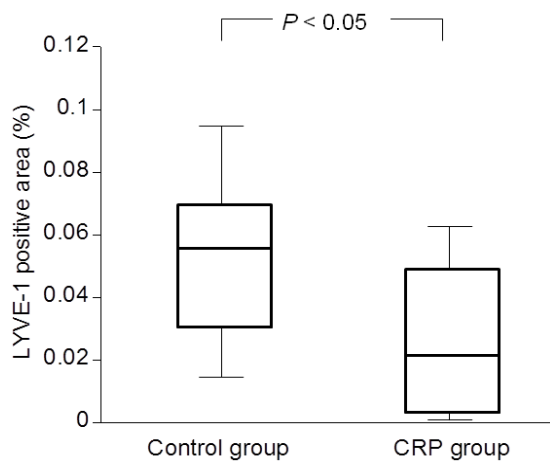


図 3 : CRP 皮下注によるリンパ管新生抑制効果

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 3 件)

1. Motoyama S, Mori K, Kamei T, Miura M, Hinai Y, Sato Y, Yoshino K, Sasaki T, Miyata G, Seto Y, Ogawa J: Evaluation of the risk of lymph node metastasis using CRP 1846C>T genetic polymorphism in submucosal thoracic esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol 20, 1978-1984 (4. 166)

2. Sasaki T, Motoyama S, Sato Y, Yoshino K, Saito H, Minamiya Y, Ogawa J. C-reactive protein inhibits cell migration and enhances expression of E-cadherin in murine squamous cell carcinoma cells. Akita J Med 39, 45-51, 2012
3. Sasaki T, Motoyama S, Sato Y, Yoshino K, Matsumoto G, Minamiya Y, Saito H, Murata K, Ogawa J: C-reactive protein inhibits lymphangiogenesis and resultant lymph node metastasis of squamous cell carcinoma in mice. Surgery, in press

[学会発表] (計 1 件)

1. 本山悟, 佐藤雄亮, 吉野敬, 佐々木智彦, 脇田晃行, 栗林邦明, 三浦昌朋, 比内雄大, 小川純一: 患者遺伝子多型を指標とした食道癌個別化医療. 第66回日本食道学会, 軽井沢, 2012
2. 本山悟, 南谷佳宏, 三浦昌朋, 比内雄大, 佐藤雄亮, 吉野敬, 佐々木智彦, 脇田晃行, 栗林邦明, 小川純一: シンポジウム 癌の個別化治療への新しい試み, 炎症関連遺伝子多型を用いた食道癌・肺癌個別化医療展開の可能性. 第 112 回日本外科学会, 千葉, 2012

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ガンのリンパ節転移抑制剤

発明者: 本山悟・佐々木智彦

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2013-015008

出願年月日: 2013 年 1 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本山 悟 (MOTOYAMA SATORU)  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60292372

### (2) 研究分担者

丸山 起誉幸 (MARUYAMA KIYOTOMI)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号：80361228  
(H22)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：