

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5月30日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790360

研究課題名（和文） 早期消化管がんにおけるリンパ節転移成立機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of lymphatic metastasis in early gastrointestinal carcinoma

研究代表者

深澤 由里（FUKASAWA YURI）

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：90392331

研究成果の概要（和文）：早期大腸がんにおけるリンパ節転移の有無に関わる組織学的因子を選出するため、浸潤形式、腫瘍の組織型、間質の性状、炎症細胞浸潤の程度、脈管侵襲、そして浸潤先進部における蛋白の発現程度を比較した。その結果、浸潤先進部における腫瘍胞巣内好中球浸潤の有無、LYVE-1によるリンパ管同定後のリンパ管侵襲の有無、浸潤先進部における腫瘍細胞のMMP7発現の程度が、統計学的に有意な所見であった。

研究成果の概要（英文）：

Using early colorectal carcinoma cases, histopathological observations and immunohistochemistry for LYVE-1, von Willebrand factor, MMP-7, CXCL12, and ANGPTL4 were conducted. Relationships between LN metastasis and growth pattern, status of muscularis mucosae, depth of cancer invasion, histopathological type, tumour budding, neutrophil infiltration in cancer cells (NIC), fibrotic cancer-stroma type, Crohn's-like lymphoid reaction, microscopic abscess formation, lymphatic invasion, the expression of MMP-7, CXCL12 and ANGPTL4 in cancer cells at the invasive front were determined. By multivariate analysis, lymphatic invasion, NIC, and MMP-7 expression at the invasive front were independent predictors of LN metastasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：消化器

1. 研究開始当初の背景
がん症例の予後は腫瘍の浸潤・転移能に依存している。転移の中でも、リンパ節転移は最も早期に転移が確認される臓器の一つであり、患者の生命予後だけでなく、外科的手術後補充療法の必要性を検討する上で重要な

因子であることは周知の事実である。培養細胞レベルにおいては、リンパ節転移に関わる分子機構が一部解明され始めているが、ヒトがん組織におけるリンパ節転移に関わる分子機構は実際には未だ明らかにされていない。

研究代表者は、リンパ管内皮細胞を同定出来るペプチド抗体 (LYVE-1 抗体) を作製し [Akishima Y 等. Virchows Arch. 2004]、それまで観察できなかった実際のヒト組織における様々な病変 (炎症や悪性腫瘍) のリンパ管の分布を観察してきた [Soh S. 等, Prostate, 2004, Nakano T. 等 Hum Pathol, 2005, Ishikawa Y. 等 Histopathol, 2006, Ishikawa Y. 等 Cancer, 2007, Fujimoto A. 等 AJCP, 2007]。

がん細胞は発生後、その一部からより悪性度を増したがん細胞が出現すると考えられている。研究代表者は、がん浸潤先進部の浸潤性発育を呈するがん細胞に発現する分子 (laminin5 γ 2、MMP7、Dysadherin 等) の発現分布を多数観察し [Ochiai H. 等 Oncology, 2008 等]、さらに、進行大腸がんの浸潤先進部における CXCL12 の発現程度と予後との関連を報告した [Akishima-Fukasawa Y. 等 AJCP, 2009]。以上の経験より、がん浸潤先進部は、がんの浸潤・転移能を決定する場ではないかと考えている。また、がん浸潤先進部は、がん細胞自身の特性だけではなく、そのがん周囲の微小環境 (がん間質) の関与が考えられることから [Bhowmick NA. 等 Science 2004, Raghu Kalluri. 等 Nat Rev, 2006 等]、がん浸潤先進部におけるがん間質組織を詳細に検討した。具体的には、進行大腸がん組織において、浸潤性発育を呈するがん細胞の周囲の間質と、膨張性発育を呈するがん細胞の周囲の間質を、各々 microdissection 法により回収し、Affymetrix 社の GeneChip を用いた発現解析を行い、有意に差のある分子を多数選出した [2006-2007 年度若手研究(B)]。その後も、がん浸潤先進部のがん細胞及びがん間質の形態学的特性に関心をもち研究を継続している。以上より、がん浸潤先進部におけるがん細胞を周囲の間質の変化を含めて総合的に考えることが、今まで明らかでなかったリンパ節転移機構の解明の一つの解決手段と考えている。

早期がんは、既存の構築が保たれており、転移能の高いがん細胞の特性を見極めやすいと考え、今回の研究では、早期消化管がんを対象とする。近年、早期消化管がん病変に対する内視鏡的粘膜切除術あるいは内視鏡的粘膜下層切除術が増加していることから、原発巣の組織からリンパ節転移を予測することは、臨床的に追加外科的治療が必要か否かを定める重要な臨床情報に直結する所見となり、患者にもたらす利益は多大なものと考える。

2. 研究の目的

早期消化管がんのリンパ管侵襲・リンパ節転移の分子機構の一端を解明することを目

的とする。本研究では、手術検体から採取したヒト早期大腸がん組織を用い、リンパ節転移陽性症例と陰性症例の間のがん細胞およびがん間質の形態学的特徴を詳細に検討する。これらの形態学的な解析から見出した組織像を裏付けるリンパ節転移に関わる重要な分子を選出する。免疫組織化学染色により、実際のヒトがん組織でのそれら分子の発現程度・分布を検討し、実際のリンパ節転移の有無との相互の関係を解析することにより、がんのリンパ節転移に関連する分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト早期大腸がん (sm 浸潤がん) の形態学的特徴とリンパ節転移との関係の統計学的解析

ヒト sm 浸潤がんより、リンパ節転移陽性群 (35 例)、リンパ節転移陰性群 (70 例) を収集し、年齢、性別において統計学的な有意差のない 2 群を選出する。それらにおいて、東邦大学医療センター大森病院より、腫瘍の最大断面および最深部を含むパラフィン包埋ブロックを借用する。パラフィン包埋ブロックより約 3~3.5 μ m 厚の連続切片を HE 染色と共に各 20 枚作成する。さらに特殊染色、免疫組織化学染色により、脈管侵襲を調べる。下記の病理組織学的所見を観察し、リンパ節転移陽性群とリンパ節転移陰性群における差異を検討するため、統計学的解析を行う。

①腫瘍細胞：

- ・組織型：高分化、中分化、低分化のうち優位な組織型を判定。さらに、浸潤先進部における腫瘍の組織型を別に判定 (WHO 分類に準ずる)。
- ・発育形式：膨張性増殖あるいは浸潤性増殖に分類。
- ・粘液がん成分の混在の有無を判定。
- ・Tumor budding (1-5 個の腫瘍細胞塊) の有無：弱拡大において、最も tumor budding の目立つ 1 視野を探し、強拡大 (200 倍) において budding の数を数える。
- ・micropapillary pattern の有無の判定。
- ・腫瘍内への好中球浸潤の有無の判定。

②がん間質：

- ・浸潤先進部におけるがん間質を、形態学的に mature type、immature type、intermediate type に分類。 [Ueno H. Gut, 2004]。
- ・浸潤先進部を囲う様にリンパ球浸潤を認める PLI: peritumoral lymphocytic infiltration の程度と CLR: Crohn's-like lymphoid reaction の程度を判定 [Jass JR. Lancet, 1987]。
- ・浸潤先進部における好中球の集簇の有無を判定 [Uehara K. Br J Surg., 2007]。

③リンパ管・血管：

ビクトリア青染色による弾性線維の染色お

よびLYVE-1抗体、von Willebrand抗体の免疫組織化学染色を用いリンパ管侵襲、静脈侵襲の個数と分布の検索をする。

④組織標本を用いた筋板の性状と浸潤部の測定：

・HE染色標本にて粘膜筋板(MM)の走行を確認する。HE染色標本でMMの走行が追えるもしくは推測できるタイプ(Type A)と完全にMMが断裂しているタイプ(Type B)に分類[立石陽子, 胃と腸, 2007]。

・浸潤距離：MMの走行が確認できる場合は、MMの下縁より腫瘍の最深部までの距離を測定。MMが断裂している場合は、腫瘍表面から最深部までの距離を測定。

・浸潤の広がり：浸潤距離と腫瘍浸潤の幅を測定し、それらを掛け合わせる。

(2) Real-time PCRによるがん浸潤先進部の発現解析

①ヒト早期大腸がん組織のパラフィン包埋切片からのRNA抽出：ヒト早期大腸がん症例の中で、リンパ節転移陽性群およびリンパ節転移陰性群より、浸潤部の腫瘍組織が十分量存在する症例を約10例ずつ選出する。上記1で見出した形態学的特徴を呈する組織のみを回収する。具体的には10 μ m厚パラフィン標本を作製し、脱パラフィン後、HE染色を行う。microdissectionはLaser Microdissection System (LSLMD-1) (ライカ)を用いる。パラフィン包埋切片用のRNA抽出キット (High Pure RNA Paraffin Kit, Roche)を用いてRNAを抽出する。

②抽出したRNAを用いたreal-time PCRによる差異のある遺伝子発現の解析：マトリックス分解酵素(MT1-MMP, MMP1, 2, 3, 7, 9, 13等)、ケモカイン(CCR7, CCL12, CXCR5, CXCR7等)、接着因子(Cadherin family)等の候補遺伝子のプライマーを設計し、real-time PCRにより癌細胞における発現量を測定する。統計学的に有意な差異を示す候補遺伝子を選出する。

(3) 選出した分子に対する抗体を用いた免疫組織化学染色の施行

免疫組織化学染色は、3%過酸化水素溶液にて内因性ペルオキシダーゼブロック後、pH6.0のクエン酸バッファー緩衝液を用いた熱処理を施行(microwaveを使用)する。5%スキムミルクにて非特異的反応をブロックした後、各一次抗体を反応させ、Dako社のEnvision kitおよびDAB発色試薬を用い、候補遺伝子のコードするタンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を施行する。HE染色にて形態を観察した約100例のヒト早期大腸がん組織切片を使用し、それら分子の発現および分布とリンパ節転移の有無との関連を統計学的に検討する。

(4) 早期胃がんを用いた免疫組織化学の施行と統計学的解析

早期大腸がんではリンパ節転移陽性群と陰性群の間で有意な差を認めた分子の発現を、早期胃がんにも応用する。早期胃がんにおけるリンパ節転移陽性群66例、リンパ節転移陰性群66例を用い([Fujimoto A. Am J Clin Pathol])と同一症例群)、免疫組織化学染色を施行する。目的分子の発現および分布とリンパ節転移の有無との関連を統計学的に検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト早期大腸がん(sm浸潤がん)の形態学的特徴とリンパ節転移との関係の統計学的解析

早期大腸がん(sm浸潤がん)111例(リンパ節転移陽性症例36例、陰性症例75例)を用い、組織形態学的項目13項目、免疫組織化学染色を用いた脈管侵襲の同定2項目について、検討した。

リンパ節転移陽性群と陰性群を比較し、腫瘍の発育様式、浸潤部の粘膜筋板の性状、浸潤距離、主となる組織型、浸潤先進部の組織型、Tumor buddingの有無、腫瘍胞巣内好中球浸潤の有無、がん間質の線維化における形態学的分類、Crohn's-like lymphoid reaction、浸潤先進部における好中球の集簇の有無、リンパ管侵襲が、両群において統計学的に有意な差を認めた。

(2) がん浸潤先進部における蛋白発現程度とリンパ節転移との関係の統計学的解析

(1)で用いた症例と同様の症例群を用いて免疫組織化学染色を施行した。MT1-MMP1、MMP1、MMP2、MMP7、CXCR7、CXCL12、CCR7、ANGPTL4など、文献的に消化器がんにおいてリンパ節転移に関わると報告される抗体で、入手可能な抗体を多数選出した。MT-MMP1、MMP1、MMP2は腫瘍の一部に染色されたが、リンパ節転移との関連は認めなかった。CXCR7、CCR7においては、免疫組織化学染色において、評価可能な陽性像を確認することはできなかった。MMP7は、腫瘍細胞の、特に浸潤先進部のtumor buddingの部分にほぼ一致して強い陽性像が確認された。CXCL12は、腫瘍細胞に様々な割合で陽性像を認め、MMP7ほどではないが、同様に浸潤先進部のtumor buddingの部分に強い陽性像を認めた。ANGPTL4はCXCL12と類似する分布であるが、CXCL12よりは発現する腫瘍細胞が少なかった。それぞれのカットオフ値は、MMP7は文献で報告のある30%、CXCL12は過去の検討と同様30%、ANGPTL4は20%として比較した。いずれの3項目も、統計学的にリンパ節転移の有無との有意な相関を認めた。

(3) 統計学的にリンパ節転移の有無と関連のあった項目を用いた多変量解析

リンパ節転移との関係が統計学的に認められた発育様式、浸潤部の粘膜筋板の性状、浸潤距離、主となる組織型、浸潤先進部の組織型、Tumor buddingの有無、腫瘍胞巣内好中球浸潤の有無、がん間質の線維化における形態学的分類、Crohn's-like lymphoid reaction、浸潤先進部における好中球の集簇の有無、リンパ管侵襲と共に、上記の MMP7、CXCL12、ANGPTL4 の腫瘍における発現を加え、計 13 項目を用いて多変量解析を施行した。その結果、腫瘍胞巣内好中球浸潤の有無、リンパ管侵襲の有無、MMP7 の発現程度の 3 項目が、早期大腸がんにおけるリンパ節転移の有無に関して独立した因子であることがわかった。

Table 3. Multivariate logistic regression analysis

Parameter	OR	95% CI	P-value
Status of muscularis mucosae (SMM)	1.9113	0.2623-13.9275	0.5227
Depth of cancer invasion	1.0627	0.8046-1.4034	0.6685
Histopathological type (well and moderately differentiated type versus others)	0.6943	0.1833-2.6297	0.5913
Histopathological type at the invasive front (well and moderately differentiated type versus others)	0.7566	0.1513-3.7835	0.7342
Tumour budding (x200)	1.9686	0.5589-6.9336	0.2917
Fibrotic cancer-stroma type (type 3 versus others)	2.5325	0.5684-11.2839	0.2229
Crohn's-like reaction (CLR)	4.1979	0.5192-33.9389	0.1785
Neutrophil infiltration in cancer cells (NIC)	5.2893	1.3793-20.2828	0.0151
Microscopic abscess formation (MAF)	1.4492	0.1338-15.7017	0.7602
Lymphatic invasion	15.6775	3.1576-77.8389	0.0008
MMP-7 immunostaining (<30% versus ≥30%)	4.4068	1.3219-14.6914	0.0158
CXCL12 immunostaining (<30% versus ≥30%)	1.3731	0.3120-6.0420	0.6749
ANGPTL4 immunostaining (<20% versus ≥20%)	1.8492	0.5860-5.8359	0.2944

ANGPTL4, ANGPTL4, angiotensin-like-4; CXCL12, CXC chemokine ligand-12; MMP-7, matrix metalloproteinase-7; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

(4) 大腸がん浸潤先進部におけるがん間質の発現解析

ヒト大腸がん組織の切片より、浸潤先進部でのがん細胞周囲の間質を、レーザーマイクロダイセクションにて切り出し、RNA の抽出を行った。(3) でリンパ節転移の有無との間で有意な差を認めた所見である、浸潤先進部のがん細胞の MMP7 発現の高い症例と低い症例を約 10 例選出し、レーザーマイクロダイセクションを施行した。早期がん病変では、病変が小範囲であるため、RNA の採取量が少なく解析が困難な症例が多かった。統計学的検討までは至っていないが、さらに症例を増やし、検討中である。

(5) 免疫組織化学染色による大腸がん浸潤先進部の解析

(3) でリンパ節転移の有無との間で有意な差を認めた所見である腫瘍胞巣内好中球浸潤が目立つ症例と目立たない症例を比較するために、免疫組織化学染色を施行した。レーザーマイクロダイセクション法では好中球の混在が多く、純粋ながん細胞の相違を検討できないことから、組織構築と共に検討できる免疫組織化学染色を選んだ。好中球の遊走に関わるとされるインターロイキン 8 の発現を免疫組織化学染色にて観察した。一部の

症例において、主に浸潤先進部の tumor budding を来しているがん細胞においてインターロイキン 8 の強発現が観察された。腫瘍胞巣内好中球浸潤が目立つ症例にも比較的強い発現を認めたが、明らかな差は認められなかった。しかし、興味深い分布を示しており、今後詳細な観察が必要と考える。

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 1 件)

Akishima-Fukasawa Y, Ishikawa Y, Akasaka Y, Uzuki M, Inomata N, Yokoo T, Ishii R, Shimokawa R, Mukai K, Kiguchi H, Suzuki K, Fujiwara M, Ogata K, Niino H, Sugiura H, Ichinose A, Kuroda Y, Kuroda D, Ishii T. Histopathological predictors of regional lymph node metastasis at the invasive front in early colorectal cancer. *Histopathology*. 査読有り 59(3): 470-481, 2011.
DOI:10.1111/j.1365-2559.2011.03964.x.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 深澤 由里, 石井 隆雅. 早期大腸がんにおけるリンパ節転移規定因子の解析. 東邦医学会総会. 2011年6月. 東京
- ② 深澤 由里, 石川 由起雄, 赤坂 喜清, 宇月 美和, 下川 伶子, 向井 清, 木口 英子, 藤原 美恵子, 鈴木 高祐, 一瀬 晃洋, 緒方 謙太郎, 新野 史, 杉浦 仁, 石井 壽晴. 早期結腸癌におけるリンパ節転移の組織学的規定因子. 第99回日本病理学総会. 2010年4月. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 由里 (FUKASAWA YURI)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：90392331

(2) 研究分担者

なし