

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501302

研究課題名(和文) 大腸癌先進部に着目した分子発現の検討 組織マイクロアレイを用いた網羅的解析

研究課題名(英文) Area-specific prognostic values of various markers in colorectal cancer: a tissue-microarray based approach

研究代表者

長谷 和生 (HASE, Kazuo)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・教授)

研究者番号：50511268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：stage II 大腸癌約300例を対象とし、粘膜下層先進部、漿膜下層先進部、中央部、周堤部から採取した直径2mmの円柱状組織から組織マイクロアレイのブロックを作成、免疫染色により、浸潤・細胞接着・細胞増殖・細胞周期・アポトーシス・癌幹細胞・間質の組成・リンパ球に関するマーカーなど、タンパク発現について評価を行った。結果、CD133, laminin-5, mesothelin, CD44, beta-catenin, E-cadherin, SLXの先進部における発現性が予後因子として重要であることが示された。今後これらの分子が標的治療の対象となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We used a tissue microarray (TMA) construction method particular about sampling areas and investigated prognostic value of various marker expressions in colorectal cancer (CRC) patients. Using sections of 300 patients with stage II CRC, we took 4 core specimens from the submucosal invasive front, subserosal invasive front, central area and rolled edge in each tumor and constructed TMA blocks. Using these TMA sets, various marker expressions was surveyed immunohistochemically. Analyses of survival revealed that various marker expressions, such as CD133, laminin-5, mesothelin, CD44, beta-catenin, E-cadherin, SLX, showed significant prognostic values in submucosal invasive front or in subserosal invasive front. We concluded that TMA analysis disclosed the prognostic significance of various marker expressions in invasive front, and these markers seem to be promising targeted molecules for antibody therapy.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学 腫瘍診断学

キーワード：大腸癌 組織マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1)我々は、癌先進部における分化度の低下に着目しており、大腸癌浸潤先進部の間質内に存在する単一の癌細胞もしくは5個未満の癌細胞の小塊を簇出(budding)と定義し、その密度から低分化傾向の程度を評価する方法を提唱し、悪性度規定因子としての意義について報告してきた。さらに、我々は癌細胞の細胞質を染色する cytokeratin 免疫染色にて確認できる簇出周囲の核を伴わない cytokeratin 陽性の微小な癌細胞片に注目、連続切片により綿密に検討したところ、その多くは簇出を形成する癌細胞へ連続することを確認した。すなわち、cytokeratin 陽性の微小な癌細胞片は癌細胞による周囲組織への接着や浸潤のための突起あるいは偽足(cytoplasmic podia)を示していると解釈でき、能動的遊走性の指標になると考えた。

(2)組織マイクロアレイ(TMA)は多数の組織包埋ブロックから微小円柱状に組織を採取し、新しいパラフィンブロックに配列することで、新たなTMAブロックを作成、その切片を使用し同時に大量の結果を得る方法として紹介された。しかし大腸癌における有用性の報告は少なく、これは、大腸癌は腫瘍の大半を占める中央部の組織所見より浸潤先進部における所見が腫瘍の生物学的悪性度を反映するにもかかわらず、TMA作成にあたり、組織採取部位が勘案されていないためと推測できる。そこで、浸潤先進部から採取した組織によりTMAを作成することで、利用価値の高いTMAを作成することが可能であると考え、我々は組織採取部位を明確にしたTMA作成法(area-specific TMA)を考案し、その有用性を証明している。area-specific TMAというhigh throughputなツールを用い、癌先進部のあらゆる特徴を明らかにすべく、今回の検討を企画した。

2. 研究の目的

300例の大腸癌症例を対象とし、area-specific TMAを用い、広くタンパク発現を検討することで癌先進部の特徴や臨床的意義を明らかにすることを目的とする。大腸癌組織のheterogeneityを勘案しつつ、癌の先進部や中央部など、部位別に各々のタンパク発現の悪性度規定因子としての重要性を明確にすることが可能と考える。

3. 研究の方法

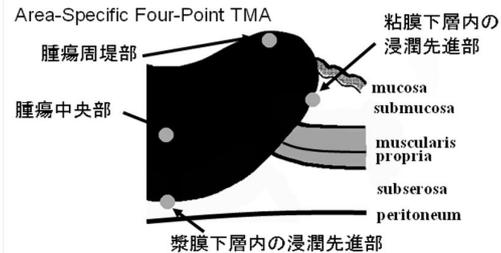
(1)stage II大腸癌で3年以上の経過が観察できている約300例を対象とし、先進部における低分化傾向の指標である簇出およびcytoplasmic podiaの評価を行う。

(2)4部位(粘膜下層内(SM)における浸潤先進部、漿膜下層内(SS)における浸潤先進部、腫瘍中央部、腫瘍周堤部)から採取した直径2mmの円柱状組織からarea-specific four-point TMAのブロックを作成する。

(3)TMAの切片を用い免疫組織化学染色の手

法により、浸潤・細胞接着・細胞増殖・細胞周期・アポトーシス・癌幹細胞・間質の組成・リンパ球に関するマーカーなど、広くタンパク発現について評価を行う。

(4)それぞれのタンパクの発現率、悪性度規定因子としての意義について部位別に分析することで癌先進部の重要性・特殊性を明らかにするとともに、先進部低分化傾向との関連性を調べることで、癌浸潤に密接に関連する分子を選別する。

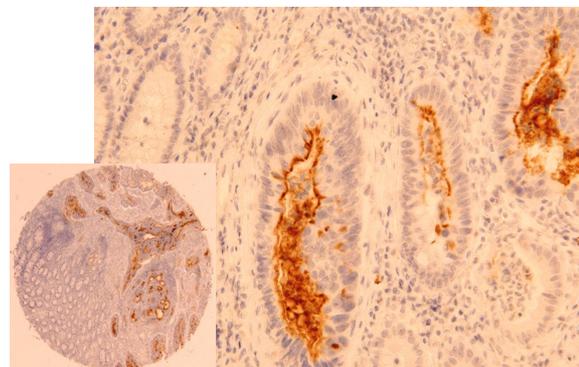


4. 研究成果

(1)簇出およびcytoplasmic podia
cytoplasmic podiaと簇出には強い相関が認められた(一致率72.9%、 $p = 0.0015$)。cytoplasmic podiaと簇出が共に高度(H/H群)、cytoplasmic podiaのみ高度(H/L群)、簇出のみ高度(L/H群)、共に軽度(L/L群)の4群の5年生存率(disease-specific)は88.6%、97.0%、94.4%、95.7%であり、H/H群はそれ以外の3群(5年生存率96.0%)に比べ不良であった($p < 0.0001$)。両者を組み合わせることで予後をより正確に予測できる可能性が示唆された。

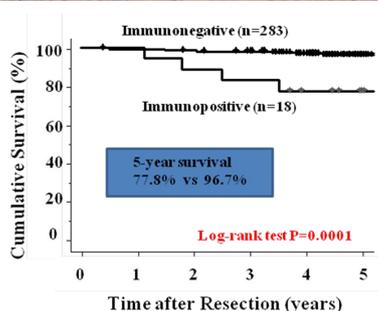
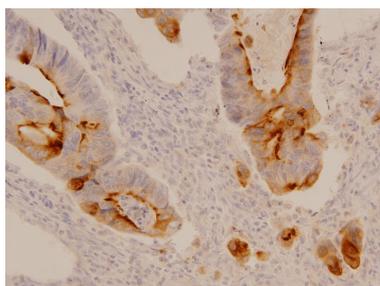
(2)癌幹細胞マーカーCD133の検討

SM先進部、SS先進部、中央部、周堤における陽性割合は16%、11%、12%、18%であり有意差は認められなかった。一か所以上で陽性を示す症例は、全個所で陰性の症例に比べ有意に予後不良であった(5年生存率:89.7% vs 76.5%, $P=0.04$)。部位別の検討では、SM先進部(86.0% vs 77.8%, $P=0.05$)およびSS先進部(87.2% vs 71.4%, $P=0.07$)において陽性を示す症例で予後不良となる傾向を認めしたが、中央部および周堤における発現に意義は認められなかった。CD133発現は、特に先進部近傍における発現に予後因子としての意義があることが示唆された。



(3) 浸潤マーカー Laminin5(LN-5)の検討
陽性率は SM 先進部、SS 先進部、中央部、周堤でそれぞれ 23, 17, 14, 10%であり、先進部で高率であった。SM 先進部、SS 先進部、中央部では、簇出の程度と有意な相関を認めた。SM 先進部、SS 先進部、中央部のいずれか 1カ所で陽性の症例を LN-5 高発現(LN5-H)群 (n=93)、いずれも陰性の症例を LN-5 低発現(LN5-L)群 (n=208)と規定すると、単変量解析で LN-5 発現性 (p=0.0173)、簇出の程度 (p=0.0245)、静脈侵襲の程度 (p=0.0223)、リンパ管侵襲の程度 (p=0.0214) が無再発生存に関する有意な予後因子であった。5 年無再発生存率は LN5-H 群: 82.4%, LN5-L 群: 92.7%であった。上記 4 因子を共変量とした多変量解析から、LN-5 発現性およびリンパ管侵襲が独立した予後因子として選択された。LN-5 の発現性は独立した再発予測因子としての意義が示された。

(4) 中皮マーカーメソテリンの検討
SM 先進部、SS 先進部、中央部、周堤における陽性割合は 6, 6, 5, 6%であり有意差は認められなかった。部位別の予後の検討では、SM 先進部 (97% vs 78%, P=0.0001)、SS 先進部 (96% vs 78%, P=0.001)、中央部 (95% vs 80%, P=0.04)、周堤部 (96% vs 77%, P=0.02) において陽性を示す症例で予後不良であった。多変量解析では SM 先進部における発現が独立した予後因子として選択された (HR 5.9, P=0.0007)。メソテリン発現と予後に有意な相関が認められ、特に SM 先進部における発現に予後因子としての意義があることが示唆された。



(5) 接着分子 E-cadherin(Ecad) および -catenin(cat)の検討
無再発生存の部位別検討では、単変量解析から、SS 先進部 cad 減弱 (P=0.019)、SM 先進部 cad 減弱 (P=0.029)、SS 先進部 Ecad 減

弱 (P=0.0034)、SM 先進部 Ecad 減弱 (P=0.032)、周堤 Ecad 減弱 (P=0.027) の有意性が示された。多変量解析から、SS 先進部での Ecad 減弱もしくは cad 減弱 (HR:2.4, P=0.025) がリンパ管侵襲、術前 CEA 値とともに独立した再発予測因子として選択された。Stage II 大腸癌において SS 先進部における Ecad、cat の発現性の組み合わせは再発予測因子となりうることを示された。

(6) 糖鎖分子 SLA および SLX の検討
TMA 中の蛋白発現から SLA 高発現群は 34%, SLX 高発現群は 22%に認められ、いずれも血清値と強い相関を示した (SLA:p=0.001, SLX:p=0.002)。SLA 蛋白発現は簇出と相関認めず。SLX は、高発現群で有意に深達度 T4 (39% (高発現) vs 15% (低発現), p=0.002)、静脈侵襲 v2/3 (42% vs 24%, p=0.042)、簇出 G2/3 (33% vs 17%, p=0.037) が高率であった。SLX 高発現群では肝再発 (15% vs 3%, p=0.013) が有意に高率であった。SLX 蛋白発現程度は、Stage 大腸癌の高悪性度症例選別に利用できる可能性が示唆された。

(7) サイトケラチン (CK7/CK20) の検討
大腸癌では一般的に CK7 は低発現、CK20 は高発現するとされる。今回の検討では CK7 高発現群が 35 例 (11%), CK20 低発現群は 159 例 (51%) に認められた。CK7 と CK20 の間に染色性の相関は認められなかった。分化型腺癌 (tub1/tub2) の割合は CK7 高発現群で低率であり (P=0.02)、CK20 低発現群で低率であった (P=0.004)。また、CK7 高発現群は深達度の進行した症例が高率 (P=0.04) で、簇出高度症例が高率 (P=0.09) であった。

(8) 粘液形質の検討
粘液形質 MUC1・MUC2・MUC5AC・MUC6・CD10 の発現を検討、すべての粘液形質発現は、年齢、性別、占居部位、リンパ節転移、壁深達度と相関を示さなかった。MUC1 陽性症例は簇出中等度以上が高率の傾向を示した (p=0.071)。MUC5AC 陽性例では組織型において低分化腺癌や粘液癌が高率 (p=0.014)。MUC2、MUC6、CD10 については病理組織学的因子との相関は認められなかった。また MUC1 陽性例が陰性例に比し有意に予後不良で (p=0.012) あった。

(9) 癌幹細胞マーカー CD133 と CD44 の検討
CD44 と CD133 の先進部における染色性に相関は認められない。CD44 陽性例が陰性例に比し、CD133 陽性例が陰性例に比し生存率が不良であった。組合せによる検討では、CD44 陽性 / CD133 陽性の症例で著しく生存率が不良であった。

(10) CD56 陽性リンパ球の検討
CD56 陽性リンパ球は抗腫瘍の役割を果たす

NKT細胞とされる。CD56陽性リンパ球浸潤の部位別陽性率はSM先進部、SS先進部、中央部、周堤でそれぞれ2,5,5,8%であった。CD56発現と簇出の間に相関は認めなかった。CD56-高度群の5年無再発生存率(5yr-DFS)は93.3%、CD56-軽度群は88.8%であり、有意差を認めなかった。簇出-高度群は有意に予後不良であるが、簇出-高度であってもCD56-高度の症例では再発がなく、簇出高度かつCD56軽度の症例で予後不良症例を選別できる(5yr-DFS:78.4%)可能性が示唆された。(簇出軽度もしくはCD56高度群の5yr-DFS:92.3%, p=0.0023)。CD56発現リンパ球の腫瘍内密度は簇出と組み合わせることで、高悪性度症例を抽出できる可能性が示唆された。

(11)CD8陽性およびFOXP3陽性リンパ球の検討

CD8陽性リンパ球は細胞傷害性Tリンパ球、FOXP3陽性リンパ球は制御性Tリンパ球とされる。先進部において、CD8陽性リンパ球浸潤高度かつFOXP3陽性リンパ球浸潤高度の症例では、CD8またはFOXP3軽度の症例に対し簇出高度の割合が有意に低率であったが、リンパ管侵襲・静脈侵襲との相関は認められなかった。全生存率の検討から、先進部においてCD8高度かつFOXP3高度の症例では、その他の症例と比較し、予後良好の傾向を認めた(p=0.09)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計19件)

Sikina A, Shinto E(2/10番目), Ueno H(4/10番目), Hase K(10/10番目). Differential clinical benefits of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for patients with stage III colorectal cancer according to CD133 expression status. *Jpn J Clin Oncol*. 2014 Jan;44(1):42-8. 査読有. doi: 10.1093/jjco/hyt168

Ueno H(1/18番目), Hase K(2/18番目), Shinto E(16/18番目). Novel risk factors for lymph node metastasis in early invasive colorectal cancer: a multi-institution pathology review. *J Gastroenterol*. 2013. 査読有

Okamoto K, Ueno H(4/9番目), Shinto E(5/9番目), Hase K(9/9番目). Lack of Preoperative Enteral Nutrition Reduces Gut-Associated Lymphoid Cell Numbers in Colon Cancer Patients: A Possible Mechanism Underlying Increased Postoperative Infectious Complications During Parenteral Nutrition. *Ann Surg*. 2013 Dec;258(6):1059-64. 査読有. doi: 10.1097/SLA.0b013e31827a0e05

Ueno H(1/12番目), Shinto E(4/12番目), Hase K(12/12番目). Objective criteria for

crohn-like lymphoid reaction in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2013 Apr;139(4):434-41. 査読有. doi: 10.1309/AJCPWHUEFTGBWKE4

Hashiguchi Y, Hase K, Kotake K, Ueno H, Shinto E, Mochizuki H, Yamamoto J, Sugihara K. Evaluation of the seventh edition of the tumour, node, metastasis (TNM) classification for colon cancer in two nationwide registries of the United States and Japan. *Colorectal Dis*. 2012 Sep;14(9):1065-74. 査読有. doi: 10.1111/j.1463-1318.2011.02917.x.

Hashiguchi Y, Hase K(2/9番目), Ueno H(3/9番目), Shinto E(4/9番目). Impact of race/ethnicity on prognosis in patients who underwent surgery for colon cancer: analysis for white, African, and East Asian Americans. *Ann Surg Oncol*. 2012 May;19(5):1517-28. 査読有. doi: 10.1245/s10434-011-2113-5

Ueno H(1/20番目), Hase K(14/20番目). Optimal colorectal cancer staging criteria in TNM classification. *J Clin Oncol*. 2012 May 1;30(13):1519-26. 査読有. doi: 10.1200/JCO.2011.39.4692

Ueno H(1/19番目), Hase K(14/19番目); Study Group for Tumor Deposits without Lymph Node Structure in Colorectal Cancer projected by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. Multicenter study for optimal categorization of extramural tumor deposits for colorectal cancer staging. *Ann Surg*. 2012 Apr;255(4):739-46. 査読有. doi: 10.1097/SLA.0b013e31824b4839

Ueno H(1/12番目), Kajiwar Y, Shimazaki H, Shinto E(4/12番目), Hashiguchi Y, Nakanishi K, Maekawa K, Katsurada Y, Nakamura T, Mochizuki H, Yamamoto J, Hase K(12/12番目). New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2012 Feb;36(2):193-201. 査読有. doi: 10.1097/PAS.0b013e318235edee

Hase K, Hashiguchi Y, Shinto E, Ueno H, Yamamoto J, Mochizuki H. [Chemoradiation combined with total mesorectal excision for patients with locally advanced rectal cancer]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 2011 Sep;112(5):313-7. 査読無

Shinto E(1/8番目), Ueno H(3/8番目), Hase K(8/8番目). Pretreatment CD133 and cyclooxygenase-2 expression as the predictive markers of the pathological effect of chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Dis Colon Rectum*. 2011 Sep;54(9):1098-106. 査読有. doi: 10.1097/DCR.0b013e3182218155

Hashiguchi Y, Hase K, Ueno H, Mochizuki H, Shinto E, Yamamoto J. Optimal margins

and lymphadenectomy in colonic cancer surgery. Br J Surg. 2011 Aug;98(8):1171-8. 査読有. doi: 10.1002/bjs.7518

Kajiwar Y, Ueno H(2/7 番目), Shinto E(4/7 番目), Hase K(7/7 番目). Expression of I1 cell adhesion molecule and morphologic features at the invasive front of colorectal cancer. Am J Clin Pathol. 2011 Jul;136(1):138-44. 査読有. doi: 10.1309/AJCP63NRBNGCTXVF

Ueno H(1/19 番目), Hase K(1/19 番目). Actual status of distribution and prognostic impact of extramural discontinuous cancer spread in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2011 Jun 20;29(18):2550-6. 査読有. doi: 10.1200/JCO.2010.33.7725

Kajiwar Y, Ueno H, Hashiguchi Y, Shinto E, Shimazaki H, Mochizuki H, Hase K. Heterogeneity of metalloproteinase expression in colorectal cancer - relation of molecular findings to basic morphology. Anticancer Res. 2011 May;31(5):1567-75. 査読有

〔学会発表〕(計 35 件)

神津慶多、大腸癌 stageII 症例における CK7/CK20 染色性の臨床病理学的意義、第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014/4/3-5、京都

山寺勝人、大腸癌における Calciumsensing receptor 発現と術前血清 Calcium(Ca) 値の相関および臨床的意義、第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014/4/3-5、京都

深澤智美、大腸癌の癌先進部における Laminin_2 発現の予後因子としての意義
タンパク発現および RNA 発現からみた検討、第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014/4/3-5、京都

白石壮宏、大腸癌先進部における CD44 および CD133 の発現とその臨床的意義、第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014/4/3-5、京都

神藤英二、StageII 大腸癌におけるメソテリン発現の予後因子としての意義、第 72 回日本癌学会学術総会 2013/10/3-5、横浜

山寺勝人、StageII 大腸癌先進部における SLA および SLX 発現とその臨床的意義、JDDW 2013 第 21 回日本消化器関連学会週間、2013/10/9-12、東京

深澤智美、進行大腸癌における Laminin-3 発現の臨床的意義に関する検討、JDDW 2013 第 21 回日本消化器関連学会週間、2013/10/9-12、東京

深澤智美、Stage 大腸癌における Laminin-5 発現の budding との相関および再発予測因子としての意義、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013/7/17-19、宮崎

山寺勝人、大腸癌先進部における SLA および SLX 発現とその臨床的意義、第 68 回日本

消化器外科学会総会、2013/7/17-19、宮崎
深澤智美、Stage 大腸癌における budding と CD56 発現 NK 細胞の腫瘍内密度の予後因子としての意義に関する検討、第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13、福岡

神藤英二、Stage 大腸癌における N-cadherin 発現および cyto-plasmic podia の予後因子としての意義および抗癌剤治療抵抗性との相関、第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13、福岡

山寺勝人、大腸癌における粘液形質発現とその臨床的意義、第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 和生 (HASE, Kazuo)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授
研究者番号：50511268

(2) 研究分担者

上野 秀樹 (UENO, Hideki)
防衛医科大学校・病院・講師
研究者番号：90597535

松原 修 (MATSUBARA, Osamu)
公益財団法人がん研究会・その他部局・研究員
研究者番号：40107248

(3) 連携研究者

神藤 英二 (SHINTO, Eiji)
防衛医科大学校・病院・講師
研究者番号：30626619