

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591979

研究課題名(和文)リンパ節転移を予測する新規大腸癌マーカーの機能解析

研究課題名(英文)Identification of novel biomarkers for predicting lymph node metastasis in colorectal cancer

研究代表者

竹之下 誠一(Takenoshita, Seiichi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10167489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は網羅的遺伝子発現解析を用いて、大腸癌の個別化医療のためのバイオマーカーとなりうる遺伝子の同定を目的としている。我々は独自の解析技術により、2つの候補遺伝子、DPEP1、TBX19に着目した。これらの発現は非癌組織に比して癌組織で高く、さらにリンパ節転移陽性症例において有意に高かった。タンパクレベルにおいても、癌部での発現上昇や大腸癌細胞株における発現を確認した。さらに免疫組織化学的検討により、組織内および細胞内での局在や発現パターンが、分化度などの特定の臨床病理学的特徴に相関することを見出した。今後のさらなる解析により大腸癌における機能的・臨床的意義の解明が望まれる。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to identify novel biomarkers for personalized cancer management in colorectal cancer by a comprehensive gene expression analysis. We focused on two candidate genes that were obtained from analyses of our own microarray platform. The expression of those genes, including DPEP1 and TBX19, was upregulated in cancer tissues compared to non-cancer tissues. It is worth noting that they were significantly highly expressed in cancer tissues with lymph node metastasis. Their expression in protein levels was also confirmed in tumor specimens as well as colorectal cancer cell lines. In addition, immunohistochemical analyses demonstrated specific patterns of expression in tissues that were associated with clinicopathological characteristics, including tumor differentiation. Further analyses would be required to clarify the functional and clinical significance of these two genes, DPEP1 and TBX19, in colorectal cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 リンパ節転移 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

近年の大腸癌診療における診断・治療の進歩は目覚ましく、転移・再発症例でも集学的治療により治療可能な時代となり、個々の患者の病態に合わせた個別化医療の推進が望まれている。そのためには、診断や治療方針策定の指標となる有効なマーカー分子が必要であり、国内外の多くの研究グループから様々なバイオマーカー候補が報告されてきた。例えば cetuximab, panitumumab の効果予測のための KRAS 変異, irinotecan の副作用予測のための UGT1A1 の遺伝子多型などはすでに実臨床で用いられており治療選択上の有用な情報をもたらしている。一方、Stage II-III 症例に対する術後補助化学療法を一律に実施すべきか否かなど、依然として議論が分かれる領域も多く残されており、現状では個別化医療を行うための十分なバイオマーカーが揃っているとは言い難い。

申請者らは本学トランスレーショナルリサーチセンターと連携し、網羅的遺伝子発現解析により日本人大腸癌で高発現する遺伝子を探索してきた。本解析システムは (1) ランダムプライム法を採用し、PCR 過程はないこと、(2) 癌組織サンプルの処理過程から厳格に設定された画一的なプロトコルを採用、実践していること、(3) 共通レファレンスを用いており、新たなデータを過去のデータと比較解析することが可能、といった特徴を有しており、他の網羅的遺伝子発現解析プロジェクトとは異なる遺伝子を抽出できる。この手法により申請者らは新規のバイオマーカー探索と検証を行っている。

### 2. 研究の目的

同解析法を用いて、大腸癌で高発現する遺伝子群を抽出し、さらに文献調査などを経て、いくつかの新規マーカー遺伝子候補をリストアップした。本研究では、この中でもリンパ節転移に関連のある 2 遺伝子、「DPEP1」と「TBX19」に焦点を絞る。これらの mRNA・タンパクレベルでの発現の検証、局在や臨床情報との相関を明らかにし、癌病態における分子機能を解析する。さらにバイオマーカーとしての意義に迫ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

- ・大腸癌に対し手術を施行された症例の凍結癌組織および非癌組織由来の RNA の抽出
- ・上述の独自の技術を用いた網羅的発現解析
- ・大腸癌組織、大腸癌細胞株由来の RNA に対する定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現解析
- ・大腸癌組織、大腸癌細胞株由来のタンパクに対するウェスタンブロット法によるタンパク発現解析
- ・大腸癌組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学的検討
- ・遺伝子発現と臨床病理学的因子や予後との関連についての統計学的解析

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸癌の網羅的遺伝子発現解析

大腸癌の癌部と非癌部で発現差の大きい遺伝子群を抽出しクラスター解析を行った (図 1A)。さらに大腸癌で高発現する遺伝子クラスター (図 1B) に含まれる TBX19 および DPEP1 に着目した。

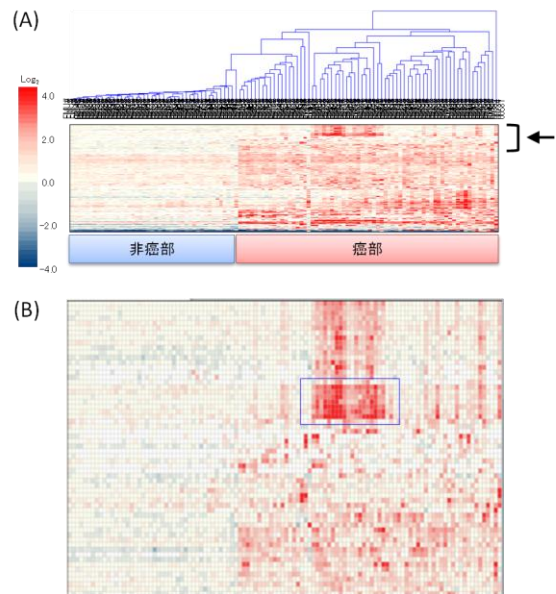


図 1

#### (2) TBX19 についての検討

##### ①大腸癌における TBX19 mRNA の発現

網羅的遺伝子発現解析から得られた TBX19 の発現値をプロットし、癌部 (cancer) と非癌部 (non-cancer) で比較した結果、TBX19 の発現は非腫瘍部より腫瘍部の方が有意に高かった ( $P < 0.001$ ) (図 2)。

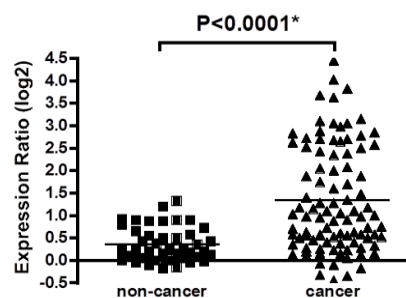


図 2

##### ②TBX19 発現と臨床病理学的因子および予後との関連についての検討

臨床病理学的因子と TBX19 発現との相関について検討した。性別、年齢、組織型、壁深達度、同時性遠隔転移の有無、TNM stage、リンパ管侵襲、静脈侵襲と TBX19 の発現の間には有意な相関は認められなかった。リンパ節転移に関しては、リンパ節転移陽性例で TBX19 の発現が有意に上昇していた ( $p < 0.05$ )。リンパ節転移の有無が Stage II と III の決定に関わり、また治療方針も大きく異なるため Stage II と III との TBX19 の発現を比較し

てみたが、有意差は認められなかった (p=0.2182)。

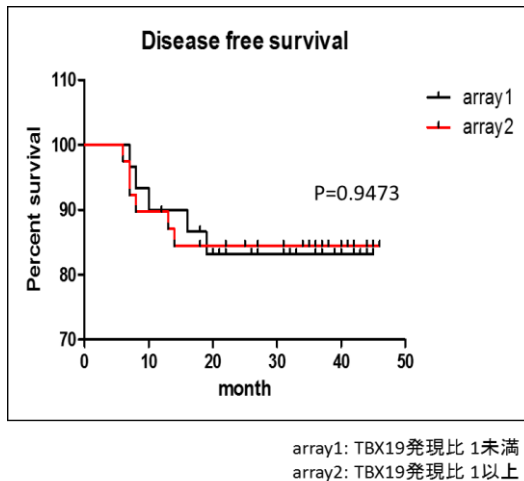


図 3

また TBX19 発現比と無再発期間の解析では、非癌部において TBX19 発現比が 1 未満のものが 95.6%と大部分を占めるため、この発現比を境として癌部を 2 群に分け(1 未満:計 30 例、再発 5 症例; 1 以上:計 39 例、再発 6 症例)、無再発期間の差を検定したところ 2 群間に有意な差は認められなかった(図 3 ; p=0.9473)。

### ③大腸癌細胞株における発現解析と臨床検体のウェスタンブロット法

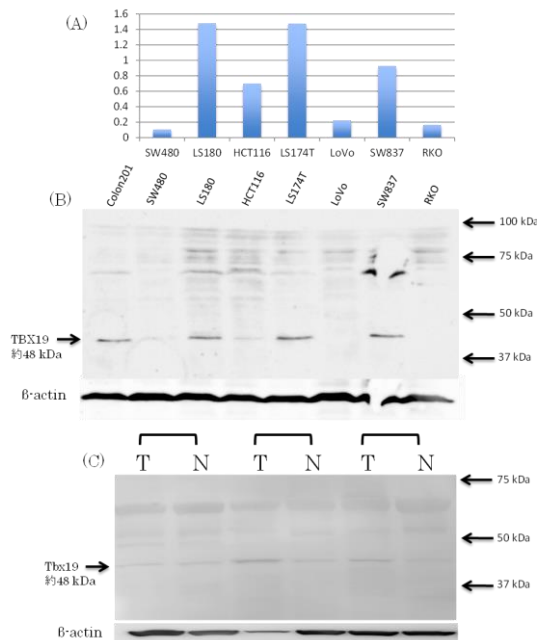


図 4

大腸癌由来の細胞株である SW480, LS180, HCT116, LS174, LoVo, SW837, RKO において、TBX19 の発現を qRT-PCR 法とウェスタンブロット法を用いて比較した(図 4 A)。qRT-PCR 法では、LS180 および LS174 で他の細胞株より発現の上昇を認めた。またウェスタンブ

ロット法では、Colo201, LS180, LS174T と SW837 で TBX19 タンパク発現を示す強いバンド(約 48kDa)が認められ、また HCT116 でも弱いバンドを認めた(図 4 B)。この結果は、タンパク質レベルの発現が mRNA レベルの発現傾向を反映することを示唆する。次に臨床検体の 3 症例について TBX19 のタンパク質発現をウェスタンブロット法で調べた(図 4 C)。その結果、TBX19 を示すバンドが癌部と非癌部にて認められ、その強さは非癌部より癌部に強かった。

### ④免疫組織化学的検討

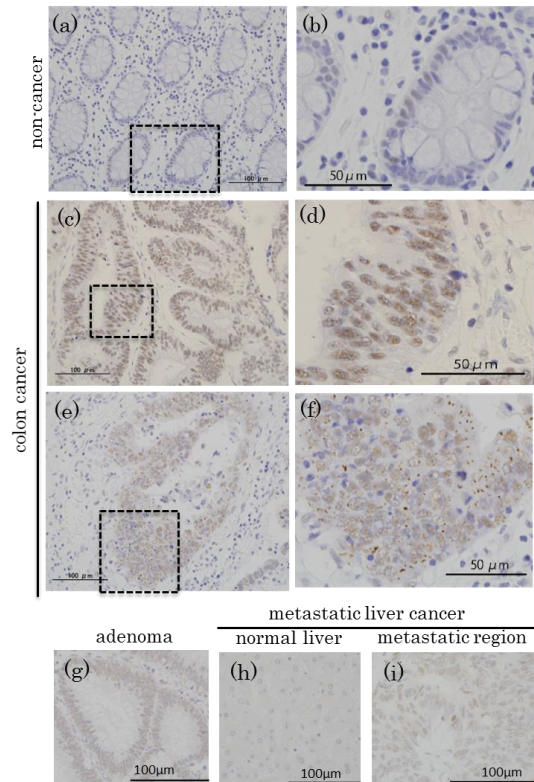


図 5

非癌部と癌部の両者で細胞の核が染色された(図 5)、非癌部より癌部のシグナル強度が強く、陽性細胞数が多い傾向にあった。また、大腸癌 54 症例中の 15 例(27.4%)では一部の組織領域に限定して、核シグナルに加えて細胞質に顆粒状のシグナル(cytoplasmic granular signal)も認められた(図 5 e, f)。この細胞質の顆粒状の染色は正常大腸組織では認められなかった。大腸腺腫 3 例を調べた結果、大腸癌と同様に強い染色性を示した(図 5 g)。転移性肝癌では転移巣が大腸癌と同様の染色性を示し、正常肝細胞の核は染色されなかった(図 5 h, i)。核の染色性の強度や陽性細胞の占める割合は症例ごとに異なるため、一定面積における陽性細胞数の比率を算出し、癌部と非癌部をより定量的に比較した。その結果、非癌部(51.9%)より癌部(88.4%)の方が有意に高かった(図 6)。また癌部における陽性細胞率と細胞質顆粒の有

無について臨床病理学的因子との関連性について検討した。陽性細胞率については臨床病理学的因子との有意な関連性は認められなかった。一方、細胞質顆粒が認められる確率は tub1/tub2 以外の組織型 (muc, por1, adenosquamous carcinoma) を含む症例で有意に高いことが示された ( $p=0.0115$ )。

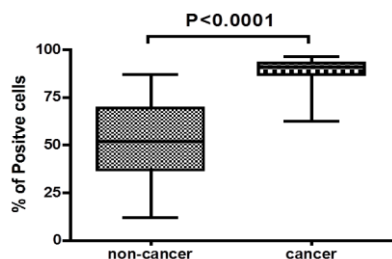


図 6

### (3) DPEP1 についての検討

#### ①大腸癌における DPEP1 mRNA の発現

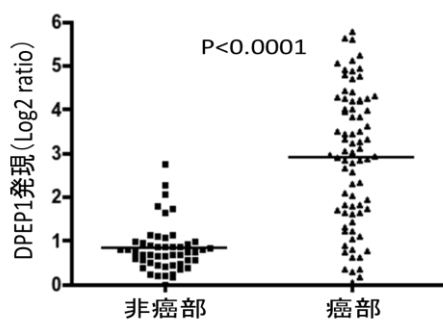


図 7

78 例について網羅的遺伝子発現解析法に基づいた癌部と非癌部における DPEP1 発現値の比較を行ったところ、癌部では非癌部に比べて有意に ( $p < 0.0001$ ) DPEP1 の発現が高かった (図 7)。

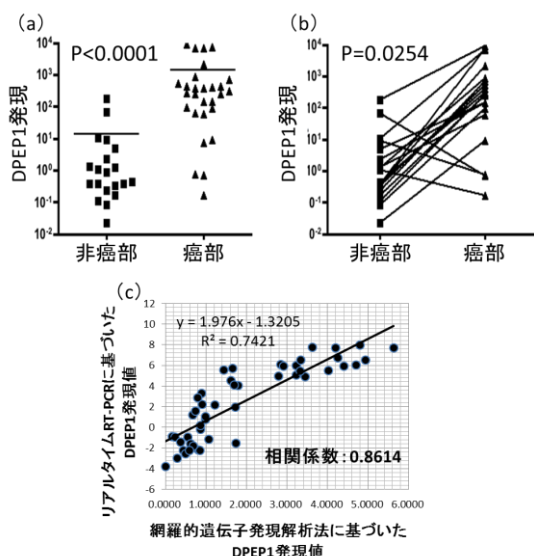


図 8

また、78 症例からランダムに抽出した 28 例について qRT-PCR を用いて DPEP1 発現値を比

較したところ、癌部では非癌部に比べて有意に ( $p < 0.0001$ ) DPEP1 の発現が高値であった (図 8 a)。さらに、癌部と非癌部の両者のサンプル調整が可能であった 19 例でも、有意に ( $p = 0.0254$ ) DPEP1 の発現が高値であった (図 8 b)。このうち 3 例のみで非癌部が癌部と比較して発現が高く、網羅的遺伝子発現解析法でも同様の結果を示した。同 3 例は、リンパ節転移が陰性であった以外は臨床学的な共通点はみられず、後述の免疫組織化学法において、3 例とも陰性であった。

qRT-PCR を用いた DPEP1 発現値と網羅的遺伝子発現解析法に基づいた DPEP1 発現比において、強い正の相関 (相関係数: 0.8614) がみられた (図 8 c)。

#### ②DPEP1 発現と臨床病理学的因子との検討

性別、年齢、腫瘍径、遠隔転移においては、DPEP1 の mRNA 発現との間に有意差はみられなかった。しかし、リンパ節転移陽性症例は陰性症例に比べ有意に ( $p = 0.0236$ ) 高く、中分化～低分化癌は高分化癌に比べ有意に高値 ( $p = 0.0011$ ) であった。高分化癌、中分化～低分化癌において、それぞれリンパ節転移の有無につき統計解析を行ったが、高分化癌 ( $p = 0.8907$ )、中分化～低分化癌 ( $p = 0.0863$ ) と、有意差はみられなかった。さらに、大腸癌進行度においては、ステージ I とステージ II、ステージ II とステージ III との比較では有意な差はみられなかったが、Stage III は Stage I に比べ有意に高値 ( $p = 0.0161$ ) であった (図 9)。すべての進行度 (ステージ I からステージ IV) の検討では有意差はみられなかった。

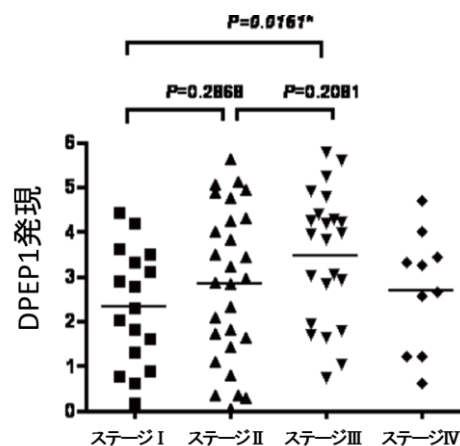


図 9

#### ③DPEP1 タンパク発現の検討

網羅的遺伝子発現解析の結果、DPEP1 発現の高かった 5 例についてウエスタンブロット解析を行った。

いずれの症例も、癌部において DPEP1 を示す単一のバンド (約 61kDa) が認められ、そのシグナルは非癌部より強かった (図 10)。DPEP1 は二量体を形成するとの報告があるが 40)、120kDa 近傍には明らかなバンドはみられなかった。

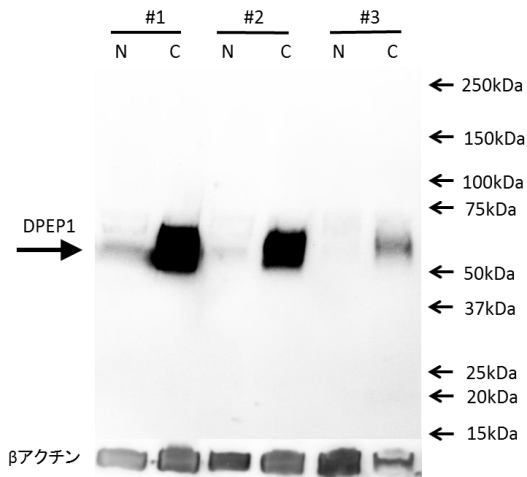


図 1 0

④免疫組織化学的検討

小腸では、apical 側（内腔）が明瞭に染色された（図 1 1 a）。非癌部組織において粘膜上皮細胞は全例陰性であり、固有層にはまれに陽性細胞が認められた（図 1 1 b）。腺腫は 3 例中 2 例において陽性であり、陽性であった 2 例は共に上皮細胞膜の apical 側（内腔）が明瞭に染色された（図 1 1 c）。高分化型腺癌や中分化型腺癌の管腔形成部では、上皮細胞の apical 側が明瞭に染色されるものが多く、一部の細胞では細胞質がびまん性に染色されたり、側底面の細胞膜が強く染まるパターンが見られた。一方、細胞の極性が乱れる低分化型腺癌を示す部位においては、細胞膜全周が染色されるパターンが見られた。

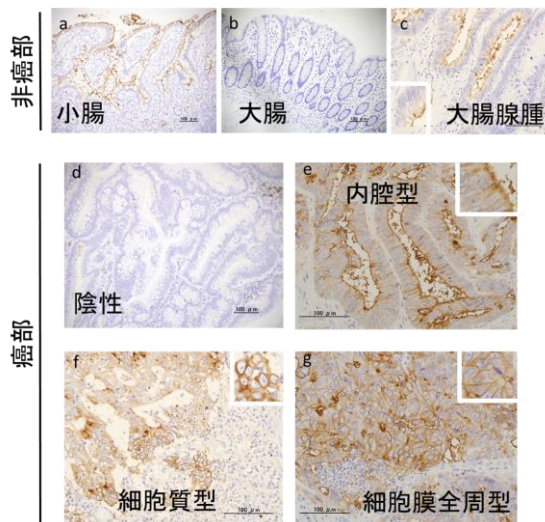


図 1 1

癌細胞中、陽性細胞の占める割合が約 10%以上の症例を陽性と判定したところ、陽性率は 82% (45/55)、陰性率は 18% (10/55)であった。次に染色パターンを①apical 側（内腔）が優位に染色されるパターン（内腔型；図 6e）、②細胞質がびまん性に染色されるパターン（細胞質型；図 1 1 f）、および③細胞膜

全周が染色されるパターン（細胞膜全周型；図 6g）に分類して解析した。癌部位では DPEP1 の局在異常（細胞質型、細胞膜全周型）が生じると考え、癌部において、細胞質型または細胞膜全周型に染色される割合を計測し、臨床病理学的因子との統計解析を行ったところ、年齢、性別、リンパ節転移、遠隔転移では有意差はみられなかった。しかし、高分化癌は中分化～低分化癌に比べ有意に DPEP1 の染色割合が低く (p=0.0066；図 1 2 a)、ステージ I 症例はステージ II およびステージ III 症例と比較し有意に低かった (p=0.0246；図 1 2 b)。

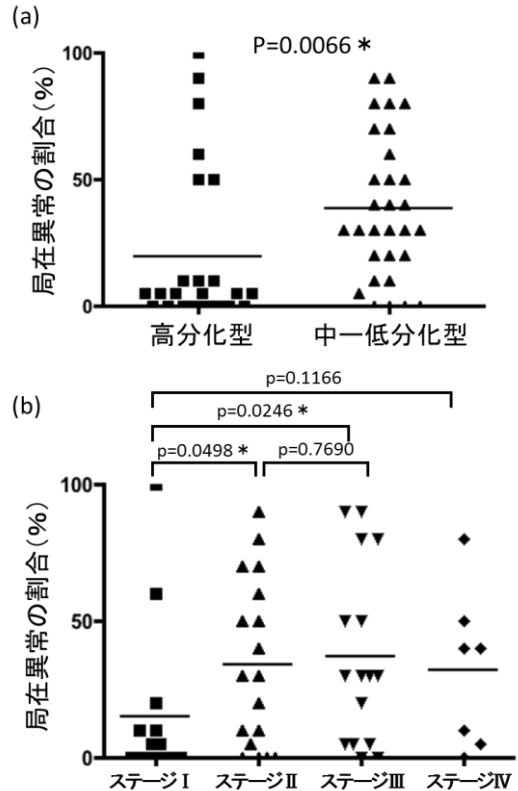


図 1 2

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 0 件）

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① 安藤仁、和栗聡、岩館学、竹之下誠一ら：大腸癌における TBX19(T-box19)の臨床病理学的検討。第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11 日-13 日：福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
- ② 竹之下誠一：TGF-β から医療機器まで。第 76 回日本臨床外科学会総会、2014 年 11 月 20 日-22 日：郡山市民文化センター（福島県・郡山市）

- ③ 竹之下誠一：医産連携福島モデルにいたる癌治療の軌跡. 第 52 回日本癌治療学会学術集会、2014 年 8 月 28 日-30 日：パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
- ④ Nagai C, Uemura T, Sawada N, Yamamoto M, Takenoshita S, Waguri S: Functional analyses of dipeptidase-1 (DPEP1) using a colon/gastric cancer-derived cell line, HCC56. 第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21-23 日：神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）
- ⑤ 永井千晴, 澤田直樹, 渡辺慎哉, 竹之下誠一, 和栗聡：ヒト胃癌/大腸癌細胞株における Dipeptidase-1 の機能、局在解析. 第 73 回日本癌学会学術総会：2014 年 9 月 25-27 日：パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
- ⑥ 永井千晴, 植村武文, 山本雅哉, 澤田直樹, 竹之下誠一, 和栗聡：ヒト大腸癌由来細胞株における Dipeptidase-1 (DPEP1) の局在解析. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 3 月 28-30 日：サンポートホール高松・かがわ国際会議場（香川県・高松市）
- ⑦ 永井千晴, 植村武文, 山本雅哉, 澤田直樹, 竹之下誠一, 和栗聡：ヒト大腸癌細胞株における Dipeptidase-1 の機能局在解析. 日本解剖学会第 58 回東北・北海道連合支部学術集会、2012 年 9 月 22-23 日：山形大学医学部（山形県・山形市）
- ⑧ 竹之下誠一：がん治療における福島モデル. 第 6 回京都在がん化学療法フォーラム、2014 年 2 月 7 日：京都府立医大（京都府）
- ⑨ 竹之下誠一：ふくしま国際医療科学センターについて. 第 1 回シンポジウムゲノム創薬・医療フォーラム、2014 年 9 月 16 日：東京大学（東京都・文京区）

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/home/trc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹之下 誠一 (TAKENOSHITA Seiichi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10167489

### (2) 研究分担者

和栗 聡 (WAGURI Satoshi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30244908

岩舘 学 (IWADATE Manabu)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00381393

中村 泉 (NAKAMURA Izumi)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80423804

### (3) 連携研究者

渡辺 慎哉 (WATANABE Shinya)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251444

### (4) 研究協力者

立花 和之進 (TACHIBANA Kazunoshin)

安藤 仁 (ANDOH Jin)