

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890209

研究課題名(和文)大腸癌のCEACAM1 isoformの変化と癌の形態および間質に関する研究

研究課題名(英文)CEACAM1 isoform balance affects morphogenesis and stromal reaction of colorectal cancer

研究代表者

家田 淳司(Ieda, Junji)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：50637907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円、(間接経費) 420,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はCEACAM1 isoform balanceの違いにより転移や浸潤に関するメカニズムを解明することを目的として、大腸癌のCEACAM1 isoform balanceと癌間質との関係についての研究を行った。CEACAM1-longを優位に発現する大腸癌間質ではb2-integrinが有意に強く発現していた(p=0.03)。また、b2-integrinが発現しているものでは、有意にリンパ節転移、血行性転移が多くみられた(p=0.0004, p=0.0001)。CEACAM1-long優位な発現がb2-integrinを介して癌の転移や浸潤に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the mechanism of metastasis and invasion of colorectal cancer. We studied about the relationship between CEACAM1 isoform balance and stroma of colorectal cancer.

The colorectal cancer with CEACAM1-long dominant expression was associated with b2-integrin expression in stroma of cancer (p=0.03). The patients with b2-integrin expression were associated with lymph node metastasis and hematogenous metastasis (p=0.0004, p=0.0001). CEACAM1-long dominant expression may enhance cancer invasion and metastasis through an interaction with b2-integrin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：大腸癌 間質 悪性度

1. 研究開始当初の背景

近年、化学療法の進歩や分子標的治療薬の開発により大腸癌の死亡率はやや低下している。しかし、大腸癌の罹患率は増加しており、今後さらなる治療の進歩が必要と考えられる。

当教室では接着分子のひとつである carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) の発現に着目し、大腸癌の悪性度に関する検討を続けてきた。CEACAM1 とは、immunoglobulin superfamily, CEA family に属する接着分子であり、上皮細胞や血管内皮細胞、血球系細胞などに幅広く発現する I 型膜貫通型糖蛋白である。

CEACAM1 には、細胞内 domain のアミノ酸配列の違いにより CEACAM1-long と CEACAM1-short の2種類の isoform が存在する。これまで、大腸癌においては CEACAM1 の発現強度よりも isoform balance の違いが浸潤、転移などの悪性度に関与するということ (Ieda et al. Int J Cancer, 2011)、CEACAM1 isoform balance の違いにより癌浸潤先進部において中空を伴う球体形成を認め、それがリンパ節転移や血行性転移と関連すること (Tamura et al. BMJ open, 2011) を報告してきた。

しかし、CEACAM1 isoform の違いにより癌浸潤先進部で癌の形態が変化するメカニズムや、浸潤・転移が増加するメカニズムに関しては明らかにされていない。これらのメカニズムが解明されれば、大腸癌の浸潤や転移を抑制することができる新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまで当教室では大腸癌において CEACAM1 発現の isoform balance の違いにより癌浸潤先進部の形態変化を生じ、転移や浸潤などの悪性度に関与するということを報告してきた。本研究は臨床検体および培養細胞を用いて大腸癌の CEACAM1 isoform balance と癌間質との関係について基礎的研究を行い、CEACAM1 isoform balance の違いにより転移や浸潤に関するメカニズムを解明することを目的とする。

乳癌細胞や前立腺癌細胞では CEACAM1 isoform balance の違いにより、CEACAM1 short

の発現が強くなると管腔形成がみられることが報告されている (Kirshner et al. J Biol Chem, 2003)。また、乳癌細胞においてプラスチック上での培養では、CEACAM1 short 優位の発現で管腔形成がみられるが、細胞外マトリックスの成分を多分に含むマトリゲルを使用した 3D 培養下では CEACAM1 long 優位の発現で管腔を形成することが報告されている (Yokoyama et al. Oncogene, 2007)。

乳癌細胞においては NOD/SCID mouse を用いて CEACAM1 isoform balance の違いにより癌間質の線維芽細胞が筋線維芽細胞へと分化誘導されるという報告はされている (Yokoyama et al. Oncogene, 2007)。筋線維芽細胞は、創部治癒や癌の浸潤部に多くみられる間質細胞で、Epithelial-Mesenchymal Transition のマーカーの一つとされている。大腸癌において、癌間質の筋線維芽細胞の発現が強くなると、転移と関連し、生存率に関して予後不良となることが報告されている (Tsuji no et al. Clin Cancer Res, 2007)。

しかし、乳癌以外の癌細胞や臨床検体においては CEACAM1 isoform balance の変化による癌細胞の形態変化と癌間質の形態変化の関係について検討した報告はない。そこで、本研究では大腸癌培養細胞を用いて基礎的検討を行い、さらに大腸癌の臨床検体を用いて、CEACAM1 isoform balance の違いによる癌浸潤先進部の形態変化と癌間質の変化および臨床病理学的因子との関連を検討する。

本研究により、大腸癌の転移、浸潤に関するメカニズムが解明されることにより、大腸癌の浸潤、転移を抑制することができる新たな治療の開発へとつながる可能性が考えられる。

3. 研究の方法

(1) 臨床的研究

すでにパラフィン包埋保存されている大腸癌検体から薄切切片を作成し、免疫組織化学染色にて CEACAM1 の発現と、癌間質の線維芽細胞が発現する α -smooth muscle actin や vimentin などの発現の関係について検討する。

さらに、癌浸潤先進部での中空を伴う球体構造などの形態変化と、癌間質の関係、癌の転移や生存率との関係について検討する。

HT29 と LS174T の2種類の大腸癌培養細胞に CEACAM1-L, CEACAM1-S を遺伝子導入し、CEACAM1 isoform balance を変化させる。そのうえで、各細胞を線維芽細胞とともに培養し、線維芽細胞を α -smooth muscle actin や vimentin などのマーカーを用いて細胞染色を施行し、CEACAM1 isoform balance の線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化への影響について検討する。また、培養液を用いて ELISA を施行し、培養液中の TGF- β や b-integrin などの因子のシグナル伝達因子の測定を行い、線維芽細胞の分化のメカニズムについて検討する。

<対象>

病理学的に腺癌と診断された大腸癌手術症例100例

<方法>

- 1) パラフィン包埋保存された標本から薄切標本を作成する。
- 2) xylene および ethanol にて脱パラフィンを施行し、121 20 分間加熱処理したのちに methanol 処理し PBS で洗浄する。
- 3) Dako protein block serum-free を用いて室温で 20 分間かけてプロテインブロックを行い、一次抗体 CEACAM1 long or short isoform specific polyclonal antibody (John E. Shievely Ph.D.から提供), を 4 over night で処理する。同様にして、 α -smooth muscle actin, vimentin, b-integrin, FAK に対する抗体を用いて間質を染色する。
- 4) PBS で 3 回洗浄後、二次抗体として HistFine を室温で30分処理し、PBS で洗浄。室温で 10 分間 DAB 発色を行った後、Hematoxylin で染色する。その後、カバーガラスをマウントしプレパラートを観察する。
- 5) CEACAM1 isoform balance の評価に関しては正常粘膜や血管内皮の染色強度を internal control とし、2 種類の抗体をそれぞれ

れ、internal control と癌腺腔との染色強度の差で比較する。間質の α -smooth muscle actin や vimentin などの発現強度を 0~4 段階に分類する。CEACAM1 isoform balance と癌間質のシグナル伝達物質の発現を含めた臨床病理学的因子(年齢、性別、腫瘍占拠部位、腫瘍深達度、脈管侵襲、リンパ節転移、血行性転移、生存率)を単変量解析、多変量解析を施行する。単変量解析としては 2乗検定を使用する。多変量解析として multiple regression logistic analysis を施行する。

病理医を含めた3人以上で各プレパラートを検討し、大腸癌浸潤先進部での中空を伴う球体構造を Grade 分類する。中空を伴う球体構造と間質の関係についても単変量解析、多変量解析を施行して検討する。

(2)基礎的研究

<材料>

HT29 と LS174T の2種類の大腸癌培養細胞を用いる。HT29 は CEACAM1-L (long) および CEACAM1-S (short) をどちらも中等度発現する大腸癌細胞であり、LS174T は CEACAM1-L を特に強く発現する大腸癌細胞であることが報告されている。

<方法>

HT29 と LS174T の2種類の大腸癌培養細胞にリポフェクション法により CEACAM1-L, CEACAM1-S を遺伝子導入し、CEACAM1 isoform balance を変化させる。遺伝子導入の結果および各 CEACAM1 isoform の発現に関しては RT-PCR および Western blot により確認する。

各培養細胞を、細胞外マトリックス成分を多く含むマトリゲル(BD Bioscience, USA)を用いてた 3D culture にて培養し、その上清中の VEGF や TGF- β などの間質との interaction に関与すると思われる因子に関して ELISA を施行し、CEACAM1 発現癌細胞の間質細胞へ作用するサイトカイン分泌能について検討する。

また、同様に各細胞を線維芽細胞とともに培養し、線維芽細胞を α -smooth muscle actin や vimentin などのマーカーを用いて細胞染色を施行し、CEACAM1 isoform balance の線維芽細胞

の筋線維芽細胞への分化への影響について検討する。また、細胞を培養したメディウムを用いて ELISA を施行し、培養液中の TGF- β や b-integrin などの因子のシグナル伝達因子の測定を行い、線維芽細胞の分化のメカニズムについて検討する。

また、in vivo の検討において、各培養細胞を線維芽細胞とまぜて NOD/SCID mouse の直腸内に注入し、直腸癌モデルを作成する (Yokoyama S et al. Oncogene, 2007)。8週間後に腫瘍を採取し、腫瘍径や直腸壁への浸潤の程度、転移の有無を確認する。H.E.染色により癌の形態および癌間質の形態について観察する。また、免疫組織化学染色を施行して、癌間質線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を評価、検討する。さらに、b-integrin や FAK, TGF- β などの因子に関しても免疫組織化学染色を施行し、各細胞間の変化を比較検討する。直腸壁内への注入による直腸癌モデルのみでは有意な結果が得られなかった場合は、肝転移モデルや腹膜播種モデルの作成も考慮する。

4. 研究成果

(1) 臨床的研究

大腸癌臨床検体を用いて、CEACAM1 isoform balance と癌浸潤先進部の形態変化、癌間質の変化について検討した。64 例の症例で筋線維芽細胞のマーカーである vimentin, a-smooth muscle actin に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を施行し、リンパ節転移や血行性転移との関連について検討を行った。vimentin の発現と転移については有意な関連を認めなかった ($p=0.18$)。a-smooth muscle actin の発現と血行性転移については有意な関連は認められなかったが ($p=0.06$)、a-smooth muscle actin が発現している症例は有意にリンパ節転移が多かった ($p=0.04$)。このことから、癌浸潤先進部での筋線維芽細胞の発現は、リンパ節転移に関与することが示唆された。また、b2-integrin の発現とリンパ節転移、血行性転移に関する検討を行った。b2-integrin が発現しているものでは、有意にリンパ節転移、血行性転移が多くみられた ($p=0.0004$, $p=0.0001$)。各マーカーの発現と

生存率に関する検討を log rank test にて行った。a-smooth muscle actin の発現は生存率に有意な差は認めなかったが ($p=0.22$)、b2-integrin を発現している症例は生存率が不良であった ($p=0.006$)。各マーカーと CEACAM1 isoform balance の関連について検討した。CEACAM1-long 優位であるものと vimentin, a-smooth muscle actin の発現には有意な関連は認められなかった ($p=0.46$, $p=0.55$)。しかし、CEACAM1-long 優位であるものと、b2-integrin の発現には有意な関連を認めた ($p=0.03$)。

(2) 基礎的研究

HT29 と LS174T の2種類の大腸癌培養細胞を使用した。大腸癌培養細胞に CEACAM1-L, CEACAM1-S を遺伝子導入し、CEACAM1 isoform balance を変化させた。各培養細胞を、マトリゲルを用いた 3D culture にて培養し、その上清で ELISA を施行し、癌細胞の間質細胞へ作用するサイトカイン分泌能について検討した。HT29 に CEACAM1-L を強制発現させた細胞の培養液上清では vector control と比較し、TGF- β の発現は低下した ($p=0.002$)。また、CEACAM1-L を強制発現させて細胞の培養液上清は CEACAM1-S を強制発現させたものと比較して TGF- β は低下した ($p=0.0045$)。CEACAM1-S を強制発現させた細胞の培養液上清では vector control と比較して TGF- β の発現の低下を認めたが有意な差は認めなかった ($p=0.07$)。HT29 に CEACAM1-L を強制発現させた細胞の培養液上清では vector control と比較して VEGF の発現に有意な変化は認めなかった ($p=0.82$)。HT29 に CEACAM1-S を強制発現させた細胞液上清でも vector control と比較して VEGF の発現に有意な変化は認めなかった ($p=0.13$)。しかし、CEACAM1-L を強制発現させたものと CEACAM1-S を強制発現させたものを比較すると、CEACAM1-L を強制発現させた方が VEGF の発現増加がみられた ($p=0.0025$)。

本研究により CEACAM1-isoform balance

の変化が TGF- β や VEGF の発現に関与し、腫瘍の悪性度が変化する可能性が示唆された。

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)

[学会発表](計 4件)

家田淳司、堀田 司、瀧藤克也、横山省三、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、水本有紀、山上裕機

高齢者総合的機能評価(CGA)を用いた高齢大腸癌患者の腹腔鏡手術の安全性に関する検討

第 114 回外科学会、2014 年 4 月 5 日、京都

家田淳司、堀田 司、瀧藤克也、横山省三、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、水本有紀、山上裕機

術前化学放射線療法が著効し腹腔鏡補助下手術が可能となった腸重責を伴う巨大直腸癌の 1 例

第 75 回臨床外科学会、2013 年 11 月 29 日、名古屋

家田淳司、堀田 司、瀧藤克也、横山省三、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、岩本博光、山上裕機

高齢大腸癌患者における化学療法の安全性と有効性に関する検討

第 68 回 消化器外科学会、2013 年 7 月 17 日、宮崎

家田淳司、堀田 司、瀧藤克也、岩橋 誠、中森幹人、中村公紀、横山省三、松田健司、奥 喜全、山本直之、岩本博光、山上裕機

高齢大腸癌患者における化学療法に関する検討

第 113 回 外科学会、2013 年 4 月 11 日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家田 淳司 (Ieda, Junji)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：50637907