

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462012

研究課題名(和文)リンパ節転移抑制剤開発による新規固形癌治療戦略

研究課題名(英文)Strategy for the development of inhibitor of lymph node involvement in solid cancer

## 研究代表者

本山 悟 (Motoyama, Satoru)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60292372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：C反応性タンパク(CRP)の癌細胞進展および転移抑制効果を検証した。マウスリンパ節転移モデルにおいてCRPは有意にリンパ節転移を抑制した。また、腫瘍内リンパ管新生を抑制した。腫瘍内の腫瘍関連マクロファージ(TAMs)総数を増やし、M2マクロファージの割合を有意に減少させ、腫瘍内血管数を減少させた。さらに上皮間葉移行(EMT)における転写因子であるZEB-1を抑制し、EMTマーカーであるN-cadherinの発現を抑制した。CRPは癌の進展や転移を抑制し、将来の癌治療薬候補となると思われる。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that host CRP directly inhibits cancer progression or metastasis. We inoculated subcutaneously NR-S1M metastatic cells into the backs of mice. Concurrently, recombinant mouse CRP were injected subcutaneously for 5 weeks, after which the mice were killed for evaluation. Immunohistochemical analysis confirmed inguinal lymph node metastasis in 70% (14/20) of control mice, but in only 30% (3/10) of mice in the CRP group. Tumoral lymphangiogenesis was decreased in the CRP group. On the other hand, the F4/80+ macrophage (total macrophages) in the tumor count to be significantly larger in the CRP group, while the relative number of CD206+ anti-inflammatory M2 macrophages was significantly reduced. Furthermore, CRP suppresses expression of N-cadherin, a mesenchymal marker of EMT, and ZEB-1, an EMT-related transcription factor. CRP may thus be a potentially useful tool for preventing cancer progression.

研究分野：消化器外科

キーワード：C反応性タンパク リンパ節転移

## 1. 研究開始当初の背景

固形癌のリンパ節転移に対する診断および治療は未だ発展途上にある。C 反応性蛋白(以下、CRP)は肝臓で産生される蛋白で、古くから急性および炎症性マーカーとして広く臨床で用いられてきた。2009年、我々はこのCRP遺伝子多型が食道癌リンパ節転移と密に関連するという新知見を発表した(Motoyama et al, Ann Surg Oncol, 2009)。癌自体でなく、宿主因子がリンパ節転移と密に関わることを示した画期的な知見である。ここからCRPによるリンパ節転移抑制に関する研究を提案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、CRPの持つ癌進展抑制機序について解明し、臨床応用展開可能な新規リンパ節転移抑制剤を開発することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 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細胞)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 $\mu$ gを皮下注射した群(CRP群、n=10)とPBSを皮下注射した群(コントロール群、n=20)を作製した。両群間で、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。

(2) 上記モデルを用いて、コントロール群、CRP群における腫瘍関連マクロファージ(TAMs)およびM2マクロファージをF4/80、CD206免疫組織化学染色により同定し、両群で比較検討した。

(3) マウス大腸癌細胞株(MCA-38)にCRP 50 $\mu$ g/mlを加えた群とコントロール群に分け

癌細胞遊走能を比較した。また、C57BL/6Jマウスの背部皮下にMCA-38を移植し、recombinant CRP 1 $\mu$ gを皮下注射する群(CRP群)とPBSを投与する群(コントロール群)に分け、3日おきに計9回の投与を行い、腫瘍を摘出した後、腫瘍体積・腫瘍重量を計測した。さらに、EMTに關与する間葉系細胞のマーカー(N-cadherin, E-cadherin)や、シグナル(Snail, SLUG, TWIST, ZEB-1)の発現を、Western blotting・免疫組織化学染色で検討した。

## 4. 研究成果

(1) 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( $P < 0.05$ )。また、リンパ節転移率はコントロール群では14/20匹(70%)、CRP群では3/10匹(30%)と、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( $P = 0.0411$ )。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( $P = 0.0488$ )。

(2) CRP群においてTAMs総数が有意に多く( $P = 0.0028$ )、M2マクロファージの割合が有意に減少していた( $P = 0.0091$ )。また、CD31免疫組織染色により腫瘍内血管を同定し、腫瘍内血管数を両群で比較検討した結果、腫瘍内血管数はCRP群で有意に少なかった( $P = 0.0028$ )。また、M2マクロファージに關連するCSF-1の腫瘍内mRNA発現量が、CRP群で有意に少なかった( $P = 0.0376$ )。

(3) EMTにおける転写因子ZEB-1がCRP群で有意に発現が抑制されていた( $p < 0.05$ )。また、EMTのマーカーN-cadherinの発現がCRP群で有意に抑制されていた( $p < 0.05$ )。

## 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5件)

Kudo S, Saito H, Motoyama S, Sasaki T, Imai K, Sato Y, Konno H, Takashima S, Atari M, Minamiya Y. C-reactive protein inhibits expression of N-cadherin and ZEB-1 in murine colon adenocarcinoma. *Tumor Biol* 2015; 36: 7035-43. (査読あり)

Terata K, Motoyama S, Kamata S, Hinai Y, Miura M, Sato Y, Yoshino K, Ito A, Imai K, Saito H, Minamiya Y. Evaluation of the potential for lymph node metastasis using CRP 1846C>T genetic polymorphism in invasive breast cancer. *Tumor Biol* 2014; 35: 5931-5. (査読あり)

Kuribayashi K, Motoyama S, Sasaki T, Sato Y, Yoshino K, Wakita A, Imai K, Saito H, Minamiya Y. C-reactive protein reduces the relative number of tumor-associated M2 macrophages and intratumoral angiogenesis in mice. *Tohoku J Exp Med* 2014; 233: 249-55. (査読あり)

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* 2013; 154: 1087-92. (査読あり)

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* 2013; 20: 1978-84. (査読あり)

[学会発表](計9件)

佐々木智彦, 本山悟, 佐藤雄亮, 吉野敬, 脇田晃行, 劉嘉嘉, 工藤智司, 南谷佳弘. シンポジウム 食道がんの集学的治療とその個別化を目指して, 食道癌個別化治療へ向けた新たなリンパ節転移リスク診断 CRP 遺伝子多型診断. 第53回日本癌治療学会学術集会; 2015年10月29日; 京都.

本山悟, 佐藤雄亮, 吉野敬, 佐々木智彦, 脇田晃行, 齋藤礼次郎, 南谷佳弘. 食道癌 ESD の適応拡大を目指したリンパ節転移リスク診断 CRP 遺伝子多型. 第68回日本食道学会; 2015年7月3日; 横浜.

栗林邦明, 本山悟, 佐々木智彦, 佐藤雄亮, 吉野敬, 脇田晃行, 南谷佳弘. CRP の抗腫瘍効果—腫瘍関連マクロファージと腫瘍内血管新生に関して—. 第115回日本外科学会; 2015年4月18日; 名古屋.

工藤智司, 齊藤元, 本山悟, 佐藤雄亮, 佐々木智彦, 今野隼人, 高嶋祉之具, 齋藤芳太郎, 中麻衣子, 南谷佳弘. CRP 投与による ZEB1 および EMT の抑制効果. 第115回日本外科学会; 2015年4月18日; 名古屋.

佐々木智彦, 本山悟, 佐藤雄亮, 吉野敬, 脇田晃行, 南谷佳弘. シンポジウム T1bN0 食道癌の診断と治療, CRP 遺伝子多型を用いた T1b 食道癌リンパ節転移リスク診断の精度とそれを支える根拠. 第68回日本食道学会; 2014年7月4日; 東京.

寺田かおり, 本山悟, 鎌田収一, 伊藤亜樹, 南谷佳弘. CRP 1846C>T 遺伝子多型による浸潤性乳管癌のリンパ節転移リスク診断. 第22回日本乳癌学会; 2014年7月3日; 大阪.

佐々木智彦, 本山悟, 佐藤雄亮, 吉野敬, 栗林邦明, 長岐雄志, 小川純一. CRPは腫瘍内リンパ管新生およびリンパ節転移を抑制する. 第68回日本消化器外科学会; 2013年7月19日; 宮崎.

本山悟, 森和彦, 亀井尚, 佐々木智彦, 佐藤雄亮, 吉野敬, 栗林邦明, 南谷佳弘. ワークショップ がん形質の不安定性-遺伝子解析-, 患者 CRP 遺伝子多型を用いた食道癌リンパ節転移リスク診断. 第22回日本がん転移学会; 2013年7月11日; 松本.

本山悟, 佐々木智彦, 佐藤雄亮, 吉野敬, 栗林邦明, 森和彦, 瀬戸泰之, 亀井尚, 宮田剛. シンポジウム 食道癌に対する進行度診断の問題点-精度の向上に向けて, 食道癌リンパ節転移診断能の現状と患者 CRP 遺伝子多型補助診断付加による精度向上. 第67回日本食道学会; 2013年6月14日; 大阪.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(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: 国立大学法人秋田大学

種類: 特許

番号: 特許第5713306号

取得年月日: 平成27年3月20日

国内外の別: 国内

〔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・特任教授

研究者番号: 60292372

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: