

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462073

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析による大腸癌リンパ節外転移の診断法確立と新たな転移関連因子の検索

研究課題名(英文) Assessment of molecular marker for diagnosis of extramural tumor deposit and distant metastasis

研究代表者

野田 雅史 (Masafumi, Noda)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30309463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ節外転移・リンパ節外浸潤は大腸癌の予後因子とされるが、その診断法は確立しているとは言えない。そこでこれらを診断する新しい方法の確立を試みた。

1. 当科で治癒切除を行ったT3-4, N0-2の大腸癌においてリンパ節外転移を脈管侵襲型と結節型に分類し、リンパ節外浸潤と共に評価しその結果をBMC Cancer(2015) 15:859に発表した。

2. リンパ節外転移陽性例の中で、遠隔転移のある4例と、転移再発の無い14例の原発巣での遺伝子発現をマイクロアレイで比較検討した。その結果p53関連のパスウェイが阻害されており、CD82が低下していた。更にCD274も関係している結果が示された。

研究成果の概要(英文)：Extramural tumor deposits (TDs) have been considered as prognostic factor for colorectal cancer. Here we tried to establish the diagnosis of TDs, which has been under discussion for years.

1. We classified EX into two type (invasive-type and nodular-type). Then we reviewed 385 patients with T3-4, N0-2, M0 who received curative resection by TDs and extracapsular lymph node involvement. iTD was a significant independent adverse prognostic factor for DSS in rectal cancer, metastasis to the liver in colorectal cancer, and distant LN metastasis in colon cancer. ECLN1 was a significant independent prognostic factor for RFS in colon cancer. (BMC cancer 2015 15:859)

2. We compared the gene expression of the patients with TDs alone and those with TDs and distant metastasis by microarray. The pathway analysis showed p53 pathway has been most influenced. Gene expressions of CD82, CD274, DACH1, CXCL3, and FGF9 were significantly different between the two groups.

研究分野：腫瘍学

キーワード：リンパ節外転移 大腸癌 分子マーカー

1. 研究開始当初の背景

リンパ節外転移 (Extramural tumor deposits; EX) ・リンパ節外浸潤 (Extracapsular lymph node involvement; ECLNI)は以前から大腸癌において予後因子と認識されている。このうち EX は TNM 分類 (第 5 版から現在第 7 版まで) 本邦の大腸癌取扱い規約 (現在の第 8 版から) で病期診断に用いられている。しかしながらその定義は定まっておらず、TNM 分類では改訂の度にその定義が異なっている (以前の版では形あるいは大きさで深達度診断あるいはリンパ節転移に含まれていた)。また ECLNI は未だ TNM 分類、大腸癌取扱い規約どちらにも採用されていないが、予後不良因子とされている。

2. 研究の目的

- (1) EX と ECLNI は病理診断が困難な場合があるにも関わらず、両者を同時に検討した報告は少ないため、両者の予後に与える重要性を当科の症例で示す。
- (2) EX を介して遠隔転移を起こす転移関連の分子マーカーを見出す。

3. 研究の方法

- (1) 対象は 2006 年から 2012 年に当科で治療切除を行った大腸がん患者 385 名 (結腸癌 289 名、直腸癌 96 名、T3-4, N0-2), EX を脈管 (血管あるいはリンパ管) 侵襲を伴う浸潤型 (iTd: invasive-type TD) と脈管侵襲を伴わない結節型 (nTD: nodular-type TD) に分け、ECLNI も同時に評価し予後に関する重要性を検討した。
- (2) リンパ節外転移の存在は、遠隔転移の存在を示唆するものの、全ての症例で遠隔転移を示すわけでは無い。そこでリンパ節外転移を示す症例で多発遠隔転移を示した症例と遠隔転移を示さなかった症例を比較することで、遠隔転移に関係する分子マーカーを見出すことが出来ると考え実験を行った。リンパ節外転移を示す症例のうち遠隔転移の無い 4 例と、遠隔転移のある 4 例の原発巣から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。

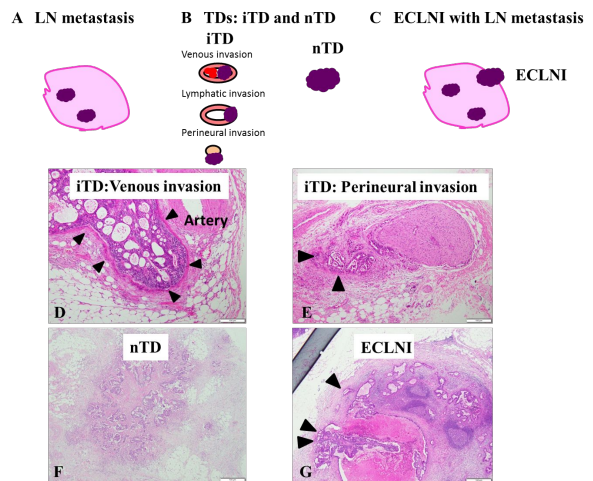
患者	年齢	部位	pT	pN	遠隔転移
C1	75	S	4a	2a	無し
C2	75	S	3	1a	無し
C3	50	C	3	2a	無し
C4	66	S	3	2a	無し
A1	82	R	3	1b	肺、肝、皮膚、淋巴结LN
A2	35	R	3	1b	肺、肝、卵巣
A3	38	R	4a	2b	肝
A4	64	R	3	1a	肺、肝、大動脈周囲LN

4. 研究成果

(1) リンパ節外転移は iTD, nTD 共にリンパ節転移が無い場合は 2 - 3% の症例で見られるが、リンパ節転移がある場合は iTD, nTD, ECLNI はそれぞれ 31%, 22%, 34% に見られた。iTd, nTD, ECLNI は全て直腸癌においては無再発生存率と有意に相関しており、腫瘍深達度、リンパ節転移、リンパ節転移率に相関していた。iTd は直腸がんにおいて癌による死亡率に有意に相関しており、どちらの癌においても肝転移再発に、結腸癌では遠隔リンパ節転移に有意に相関していた。ECLNI は結腸癌において無再発生存に有意に相関していた。以上のことから EX を分類し ECLNI も同時に評価することで癌の再発をより正確に診断出来る可能性が示された。この結果は BMC Cancer (2015 15:859) 「Prognostic significance of classified extramural tumor deposits and extracapsular lymph node invasion in T3-4 colorectal cancer: a retrospective single-center study」で発表している (Open access)。

図

iTD, nTD, ECLNI のシエマと病理写真



(2) パスウェイ解析では p 値が 0.01 未満のものは p53 signaling pathway のみで p 値は 0.0031 で、遠隔転移に伴い減少していた。コントロール群 (リンパ節外転移のみ) に比べ、遠隔転移群で有意に変化していた遺伝子は、発現上昇: CD274, GCG, FGF9、発現減少: CD82, EDN1, CCND2, ING4, BBC3, DACH1, CXCL3 であった。この中で CD82, CCND2, BBC3 は p53 signal pathway に含まれていた。アレイ解析の結果分子マーカー候補と考えられた CD274, CD82, ING4, FGF9, CXCL3, EDN1 の遺伝子発現を大腸がん患者 (転移・再発群と無再発群) でリアルタイム PCR で比較 (腫瘍の正常粘膜に対する発現比を、GAPDH を基準に計算) した。CD274 は転移・再発群でやや低い傾向 (P=0.1675) が見られマイクロア

レイとは異なる結果であった。CD82 は転移・再発群で有意に低い傾向がみられ (P=0.0065)、マイクロアレイと同じ結果であった。一方、同じ p53 signal pathway である ING4 では有意差が見られなかった (P=0.4941)。その他 FGF9、CXCL3、EDN1 では有意差が見られなかった。EX 有の患者に絞って比較しても CD274 では転移・再発で有意な発現変化は無いものの、CD82 では転移・再発群で有意に低下していた。その他の遺伝子でも転移・再発で変化しているものは無かった。遺伝子解析の結果 CD82 と CD274 を候補遺伝子として、大腸癌原発巣の免疫染色を行った。CD82 の発現低下 (染色低下) は遺伝子発現の結果と相関が見られ、遠隔転移を起こしているサンプルで発現低下が見られた。一方で CD274 の発現は原発巣では見られず間質組織で見られた。CD274 は別名 PDL-1 であり近年免疫チェックポイント機構として注目を集めているが、当科での免疫染色では原発巣での発現は低い結果であった。

予後不良群で低下しているパスウェイ

Rank	pathway	p-value
1	p53 signaling pathway	0.0031
2	Cell cycle	0.0163
3	FoxO signaling pathway	0.0239
4	Endometrial cancer	0.0242
5	Fanconi anemia pathway	0.0258
6	Glycerolipid metabolism	0.0290
7	Legionellosis	0.0290
8	Basal cell carcinoma	0.0290
9	Wnt signaling pathway	0.0294
10	Acute myeloid leukemia	0.0326

(3) これまでの結果で EX を認める腫瘍は転移を起こす可能性が高く悪性度が高いことが確認された。原発巣の遺伝子発現解析では CD82 の発現低下が転移・再発のマーカーとして有用である可能性が示された。しかし EX に対する遺伝子発現解析、免疫染色はまだ行っていない。リンパ節転移の有無を確認するための検体を用いた CD82、CD274 などのマーカーを用いた免疫染色の報告は無く、新しい診断法となる可能性があるため今後行っていく予定である。

#### 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 2 件)

Yamano T, Yoshimura M, Kobayashi M, Beppu N, Hamanaka M, Babaya A, Tsukamoto K, Noda M, Matsubara N, Tomita N. Malnutrition in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy is common and associated with treatment tolerability and anastomotic leakage. Int J Colorectal Dis. 査読有、2016 Apr;31(4):877-84. doi: 10.1007/s00384-016-2507-8.

Yamano T, Semba S, Noda M, Yoshimura M, Kobayashi M, Hamanaka M, Beppu N, Yano A, Tsukamoto K, Matsubara N, Tomita N. Prognostic significance of classified extramural tumor deposits and extracapsular lymph node invasion in T3-4 colorectal cancer: a retrospective single-center study. BMC Cancer. 査読有、2015 Nov 6;15:859. doi: 10.1186/s12885-015-1885-6.

[学会発表](計 3 件)

山野智基 他、大腸癌においてリンパ節外転移・遠隔転移の関与する遺伝子の検索、第 70 回日本大腸肛門病学会、2015 年 11 月 13 日、名古屋観光ホテル、愛知県・名古屋市

山野智基 他、浸潤型リンパ節外転移は T3-4、NO-2 大腸癌の予後因子である、第 53 回日本癌治療学会、2015 年 10 月 29 日、京都国際会館、京都府・京都市

山野智基 他、大腸癌治癒切除症例におけるリンパ節外転移、リンパ節外進展の検討、2015 年 4 月 18 日、名古屋国際会議場、愛知県・名古屋市

[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：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 雅史 (NODA, Masafumi)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30301463

(2) 研究分担者

富田 尚裕 (TOMITA, Naohiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00252643

(3) 連携研究者

山野 智基 (YAMANO, TOMOKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00599319