

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861206

研究課題名(和文)大腸癌におけるVSNL-1発現亢進の機能的意義の解明

研究課題名(英文)Role of VSNL-1 overexpression in colorectal cancer patients

研究代表者

赤木 智徳 (Akagi, Tomonori)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80572007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌Stage I～IIIを53例を対象とした癌組織・正常組織からサンプルを採取しレクチンマイクロアレイを行った。癌組織では正常組織と比し12種のT/N比が有意に上昇。レクチンHHL、ABAのみ遠隔再発の有無と有意に関連する因子であった。レクチンHHL、ABA高値群は低値群と比し無再発生存率が有意に低かった。ABAが遠隔再発の有無と有意に関連する因子であった。レクチンABA高値群は低値群に比し無再発生存率が有意に低かった。癌部におけるレクチンABAの高発現は大腸癌における悪性度を反映していると考えられた。レクチンマイクロアレイ法を用いて、大腸癌遠隔再発予測因子としてレクチンABAを同定した。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the clinical benefits of novel predictive markers for distant recurrence with colorectal cancer using lectin microarray analysis of cell surface glycan modifications. Glycoproteins were extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor specimens and normal epithelium from 53 consecutive curatively resected stage I-III colorectal cancer cases and then subjected to lectin microarray to obtain lectin-glycan interaction (LGI) values. LGI values for Agaricus bisporus (ABA) lectin, prominent in cancer tissues, were statistically associated with distant recurrence. This ABA tumor/normal LGI ratio may be a new predictive biomarker for distant recurrence of curatively resected colorectal cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リンパ節転移 術後再発 遠隔転移 糖鎖 分子生物学的解析

1. 研究開始当初の背景

リンパ節転移は大腸癌の予後を規定する最も重要な臨床病理学的因子の一つである。したがって、リンパ節転移のメカニズムを分子レベルで解明できれば、大腸癌の予後を劇的に改善しうる新規の治療法が開発されることが予想される。これまで、大腸癌のリンパ節転移と相関して発現変動する遺伝子がいくつか報告されているが、いずれも臨床応用には至っていない。

私は、大腸癌のリンパ節転移に関わる遺伝子を同定するために、大腸癌 24 例の原発巣を用いて網羅的発現解析を施行した。

24 例を病理学的リンパ節転移陽性群 13 例と陰性群 11 例に分けて比較検討したところ、リンパ節転移陽性群で有意に発現が亢進する遺伝子として VSNL-1 の同定に成功した (Akagi et al. Int J Cancer 2012:1307-1317)。さらに、臨床病理学的検討にて VSNL-1 の発現亢進は大腸癌の独立予後因子であることを証明した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、VSNL-1 が大腸癌の悪性化に関わる分子であることを、大腸癌細胞株を用いて証明するとともに、大腸特異的に VSNL-1 を過剰発現するマウスを作製して、VSNL-1 の個体レベルでの機能を解明することである。

まず大腸癌細胞における糖鎖に着目し、再発・リンパ節転移・リンパ管侵襲や遠隔転移に関連する糖鎖研究を行った。癌化した細胞では細胞表面の糖鎖が変化を生じることが明らかになっている。糖鎖に特異的に結合するレクチンを用いることで、従来は困難であった糖鎖の網羅的解析が可能となった。

現在、実地臨床で大腸癌再発高リスク群を予測する有用なバイオマーカーはないため、今回我々は、大腸癌のバイオマーカーとしてのレクチンに注目した。

3. 研究の方法

1997 年から 2010 年までに当科で根治切除術を施行した大腸癌 Stage ~ 53 例 (以下、実験群) および実験群とは異なるコホートとして Stage 55 例 (以下、検証群) を対象とした。

ホルマリン固定切除標本の癌組織・正常組織からサンプルを採取してレクチンマイクロアレイ法を行い、45 種のレクチンと糖鎖の反応の強さを、レクチンシグナルとして数値化した。検証項目は以下のとおりである。

45 種類のレクチンシグナルの癌組織/正常組織比 (=T/N 比) を算出した。臨床病理学的因子およびレクチンシグナルの T/N 比の単変量・多変量解析を行い、遠隔再発の有無と関連のある因子を同定した。なお、単変量・多変量解析において、各々のレクチンシグナルの T/N 比のカットオフ値は ROC 曲線を用いて設定

し、高値群と低値群の 2 群に分類した。Kaplan-Meier 法を用いて無再発生存曲線を作成し、log-rank 検定を行った。同定された因子 (=レクチン HHL, ABA) が実際に遠隔再発の予測マーカーとなり得るか確認するため、検証群を対象に妥当性確認試験を行った。妥当性確認試験で同定された遠隔再発予測因子 (=レクチン, ABA) による免疫化学組織法にて、組織内での発現を検討した。

4. 研究成果

癌組織では正常組織と比較して、12 種のレクチンシグナルの T/N 比が有意に上昇し、11 種において低下を認めた (図 1 a, b)。

レクチン	特異的糖鎖構造	T/N比	P値
PSA	mono/biantennary N-type with Core Fuc [a1-6]	1.17	<0.005
SNA	NeuAc a2-6Gal, NeuAc a2-6GalNAc	1.75	<0.005
SSA	NeuAc a2-6Gal	1.46	<0.005
TJA-I	NeuAc a2-6Gal, (H5O3)-6Gal b1-4GlcNAc	1.15	0.024
NPA	monoantennary N-type (galacto & agalacto), Core Man	1.54	<0.005
ConA	High Man with tetramannosyl Core [Man a1-2Man a1-6(Man a1-3)Man b-1]	1.28	0.005
GNA	Core Man [Man a1-6(Man a1-3)Man], Man (3 to 6), monoantennary N-type with Core Man	1.68	<0.005
HHL	Core Man [Man a1-6(Man a1-3)Man], monoantennary N-type	1.6	<0.005
ABA	Gal b1-3GalNAc a- [T antigen]	1.34	<0.005
PWM	GlcNAc b1-4GlcNAc	1.34	<0.005
MPA	GalNAc a- [Tn antigen]	1.16	0.016
Calsepa	Galactosylated biantennary N-type with bisecting GlcNAc	1.27	<0.005

図 1 a. 癌組織においてシグナル強度が有意に増加するレクチン

レクチン	特異的糖鎖構造	T/N比	P値
PHA(L)	GlcNAc b1-6Man [mainly tetraantennary N-type]	0.72	<0.005
ECA	Galactosylated N-type, Gal b1-4GlcNAc	0.79	<0.005
RCA120	Galactosylated N-type, Gal b1-4GlcNAc	0.81	<0.005
PHA(E)	Bisecting GlcNAc (GlcNAc b1-4Man) in galactosylated N-type	0.86	<0.005
ACG	(Gal b1-3Gal)N, NeuAc a2-3Gal (sialylated N-type),	0.81	<0.005
BPL	Gal b1-4GlcNAc (galactosylated tri/tetraantennary N-type), Gal b1-4(Fuc a1-3)GlcNAc [Lewis x],	0.87	<0.005
TJA-II	Fuc a1-2Gal [H Antigen, Lewis y]	0.83	<0.005
WFA	GalNAc b1-4Gal b1-4Glc [GA2], *GalNAc b1-4(NeuAc a2-3)Gal b1-4Glc [GM2]	0.66	<0.005
VVA	GalNAc- [Tn antigen]	0.72	<0.005
DBA	*GalNAc a1-3GalNAc b1-3Gal a1-4Gal b1-4Glc	0.57	<0.005
SBA	*GalNAc a1-3GalNAc b1-3Gal a1-4Gal b1-4Glc, Tn antigen, GalNAc b1-4Gal	0.66	<0.005

図 1 b. 癌組織においてシグナル強度が有意に減少するレクチン

単変量解析にて、直腸癌、リンパ節転移 (N2 以上) レクチン HHL、ABA が遠隔再発の有無と有意に関連のある因子であった。多変量解析の結果、レクチン HHL (p=0.001) ABA (p=0.011) のみが遠隔再発の有無と有意に関連する因子であった。無再発生存曲線を作成した結果、レクチン HHL、又は ABA 高値群は低値群と比較して無再発生存率が有意に低かった (p=0.001)。

レクチン HHL、ABA のうち、妥当性確認試験の結果、ABA のみが遠隔再発の有無と有意に関連する因子であった（図 2 a ; $p=0.029$ ）。レクチン ABA 高値群は低値群に比べ無再発生存率が有意に低かった（図 2 b ; $p=0.003$ ）。

Factors	Category	Recurrence (-) (n = 43)	Recurrence(+) (n = 12)	Univariate analysis Pvalue
Age, mean \pm SD (range)		70.3 \pm 10.0 (49-93)	74.0 \pm 10.4 (53-89)	0.266
Sex	Male	23	9	0.182
	Female	20	3	
CEA (ng/mL)	<5	35	7	0.129
	\geq 5	8	5	
CA19-9 (U/mL)	<37	40	12	1.000
	\geq 37	3	0	
Ileus	No	39	10	0.602
	Yes	4	2	
Adjuvant chemotherapy	No	43	11	0.218
	Yes	0	1	
Site	Colon	42	12	1.000
	Rectum	1	0	
Tumor invasion	pT3	42	12	1.000
	pT4	1	0	
Lymphatic invasion	ly-	25	5	0.311
	ly+	18	7	
Venous invasion	v-	36	8	0.230
	v+	7	4	
Histology	tub /hub2	40	11	1.000
	por/muc	3	1	
HHL	<4.00	28	6	0.503
	\geq 4.00	15	6	
ABA	<2.180	42	9	0.029
	\geq 2.180	1	3	

図 2 a. 妥当性確認試験による遠隔再発予測因子の同定
ABA は遠隔再発の有無と有意に関連する因子である ($p=0.029$)

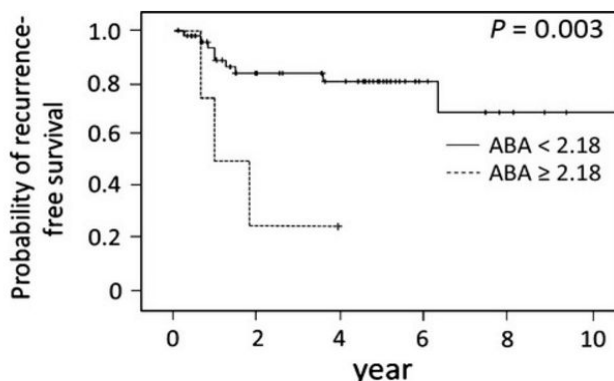


図 2 b. 無再発生存率
レクチン ABA 高値群の無再発生存率は低値群に比べ有意に低い ($p=0.003$)

免疫化学組織法により、レクチン ABA の発現は、癌組織では細胞質と apical surface に認められ、正常組織では supranuclear region に認められた（図 3 a,b）。

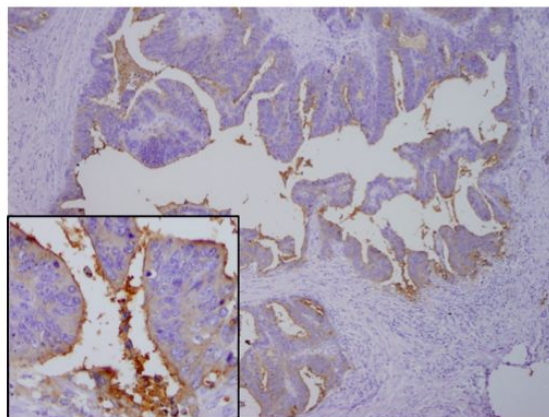


図 3 a. 大腸癌組織断面図
レクチン ABA の発現は細胞質及び apical surface に認められた

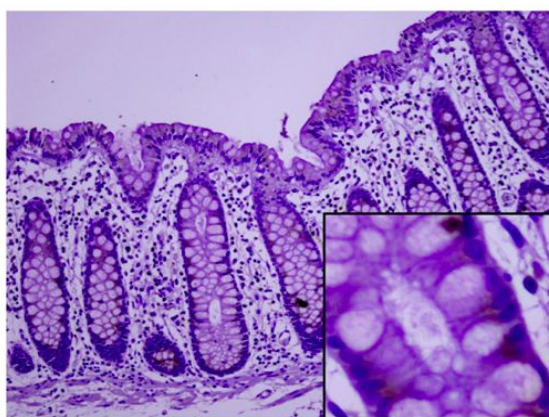


図 3 b. 大腸正常組織断面図
レクチン ABA の発現は supranuclear region に認められた

今回同定されたレクチン ABA は、Thomsen-Friedreich 抗原と N-acetylgalactosamine という 2 つの結合部位を有する。特に Thomsen-Friedreich 抗原の高発現は種々の癌で悪性度との関連が報告されており、癌部におけるレクチン ABA の高発現は大腸癌における悪性度を反映していると考えられた。さらにレクチン ABA は Stage 症例において独立した予後不良因子であったため、術後補助化学療法の適応決定に有用であることが示唆された。レクチンマイクロアレイ法を用いて、大腸癌遠隔再発予測因子としてレクチン ABA を同定した。本研究の最終目的であるリンパ節転移の機序や再発・遠隔転移の有無とリンパ管新生との関連の解明はまだ最終解析までにはいたっていない。最終年をこえても引き続き本研究を行い、リンパ節転移やリンパ管侵襲の発生機序の解明をめざす予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Kentaro Nakajima, Tomonori Akagi, et al.
Establishment of novel predictive
markers for distant recurrence of
colorectal cancer using lectin
microarray analysis
第53回日本癌治療学会総会
2015/10/30
国立京都国際会館(京都府京都市)

二日市啄良, 赤木智徳ら
レクチンマイクロアレイを用いた胃癌再
発予測因子レクチンBPLの同定
第115回日本外科学会定期学術集会
2015/04/18
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

赤木 智徳 (AKAGI, Tomonori)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 80572007

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: