

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893013

研究課題名(和文) Cripto-1を標的とした大腸癌個別化治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Cripto-1 targeting therapy for colorectal cancer

## 研究代表者

唐澤 秀明 (KARASAWA, Hideaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30547401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：予後情報が明らかである大腸癌切除検体103例の大腸癌切除標本の免疫染色を行った。その結果、49例(48%)で陽性を示し、全生存期間との関連をカプランマイヤー法にて検討したところ、Cripto-1陽性例は有意に予後が悪かった( $p=0.0112$ )。HT29, colo205に、Cripto-1発現を抑制するmiRNA発現ベクターを導入した。その結果、Empty Vectorと比較して約10分の1に発現が低下していることを確認した。機能解析を行っているが、Cripto-1発現抑制細胞株で細胞増殖能が低下している結果が得られている。最終的には移植実験を行い、増殖・転移能の変化を観察する予定である。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancer specimens were obtained from 103 patients who underwent surgery at Tohoku University Hospital, from 2000 to 2006. Immunoreactivity for Cripto-1 was graded as positive, if >10% of cancer cells were stained. The association between Cripto-1 expression and the clinicopathological features was statistically analyzed. Cripto-1 was expressed in 49 cases. In clinicopathological features, Cripto-1 expression was positively associated with tumor size. Furthermore overall survival was significantly shorter in patients with positive expression of Cripto-1. In addition, Cripto-1 stable knockdown cell lines were generated using BLOCK-iT<sup>2</sup> miR RNAi Expression Vector Kits for in vivo experiments. The Cripto-1 stable knockdown cell lines decreased cell proliferation, compared to the parental cells.

研究分野：大腸癌

キーワード：Cripto-1 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

本邦における大腸癌の罹患数は約 10 万人、死亡数は約 4 万人であり、それぞれ、2 番目、3 番目に多いがんである。近年の外科治療法の改良、切除不能・再発大腸癌に対する集学的治療の進歩は目覚ましいものがあるが、死亡数は現在も増加傾向にあり、その治療成績はいまだ満足できるものではない。治療成績のさらなる向上には大腸癌の転移（リンパ節、肝、肺、その他）の制御・既存の抗がん剤に付加しうる新規治療薬の開発等が必要である。

Cripto-1 は 1989 年にクローニングされた 188 アミノ酸よりなるタンパク質であり、Nodal シグナル伝達系の co-receptor（共存受容体）として、胚葉分化に重要な機能を持っている（Cripto-1 ノックアウトマウスは胎生致死である）。成体になると、ほとんど発現が認められないのに対し、乳癌・大腸癌等の多くの癌組織で非常に高発現していることがわかっており、近年、新規癌治療標的として注目されてきている。

癌細胞において、Cripto-1 は TGF-family、Notch、Wnt/ -catenin シグナル伝達系に作用し、腫瘍増殖に関わっている。しかしながら、癌研究においてはまだ新しい分野であり、取り組んでいる施設が限られるのが現状である。その中で、私が 2010 年から 3 年間留学していた米国国立癌研究所、David Salomon 研究室では、1990 年代から世界に先駆けて Cripto-1 の癌研究を開始しており、蓄積された数々のノウハウを習得し、また全世界における Cripto-1 研究の現状を把握することができた。現在、癌分野において Cripto-1 研究を行っている研究室は、他に Hendrix 研究室（ノースウェスタン大学、シカゴ）、Gray 研究室（ソーク研究所、カリフォルニア）など数える程しかなく、それぞれ、悪性黒色腫、前立腺癌を中心に研究している。Salomon 研究室では、乳癌とともに大腸癌を

主な研究対象にしているが、細胞株を用いた基礎的検討が中心であるため、申請者が臨床検体を用いた検討を加えることで横断的な研究が可能となると考えている。

現在までに、大腸癌における Cripto-1 発現と臨床病理学的因子の関連としては、大腸正常粘膜に比べ、癌部で高発現している事や（70-80%）大腸癌切除標本における mRNA 高発現群は、有意に無再発生存期間が短い事などが報告されている。しかしながら、各報告とも検討症例数が少なく、臨床情報の不足などもあり、臨床応用を見据えると、更なる検討が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、申請者の 3 年間のアメリカ留学中の研究を発展させ、『新規癌治療標的 Cripto-1』をターゲットとした分子標的療法の有効性を検討し、大腸癌個別化治療として実現させることで、大腸癌の治療成績向上を目指すものである。

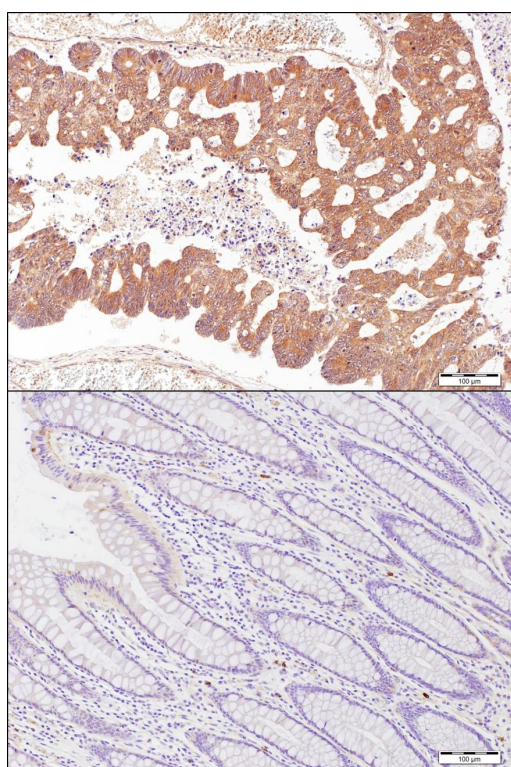
3. 研究の方法

Cripto-1 を標的とする大腸癌個別化治療の実現には、適切な症例抽出の為、Cripto-1 発現と臨床病理学的因子の関連を詳細に検討することが必要である。まず大腸癌切除標本を解析し、Cripto-1 高発現症例を標的とすることで得られるベネフィットを予測し、続いて、血液サンプルから、対象症例が抽出可能であるかを検討する。並行して、Cripto-1 安定発現抑制大腸癌細胞株を作成し、Cripto-1 による大腸癌制御機構を明らかにする。最後に、大腸癌手術検体を用いて、抗 Cripto-1 モノクローナル抗体による抗腫瘍効果、既存の抗がん剤との併用効果を明らかにし、臨床応用への可能性を探りたい。

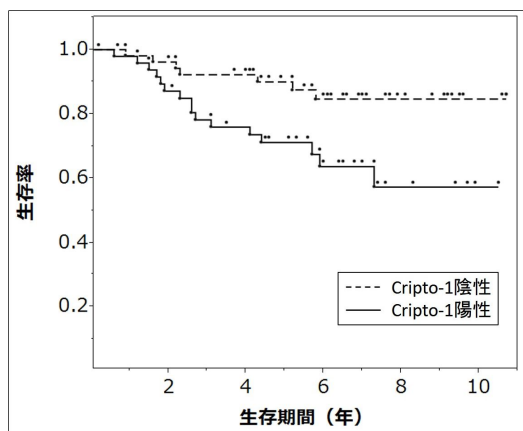
#### 4. 研究成果

##### (1) ホルマリン固定大腸癌切除標本を用いたタンパク質発現解析

現在までに 103 例の大腸癌切除標本の免疫染色を行い、典型例を下図に示すが、49 例 (48%) で陽性を示した。Cripto-1 陽性例で有意に予後が悪く、Cripto-1 陽性例を対象とし、治療戦略を再考する事で、予後の改善が見込める結果を得ている。また、予想通り、大腸正常粘膜ではほとんど染色性を認めず、治療標的としての適性も満たしていると考えられる。解析数を増やし、予後や臨床情報と



大腸癌切除標本におけるCripto-1の免疫染色  
(上: 癌部、下: 正常粘膜)

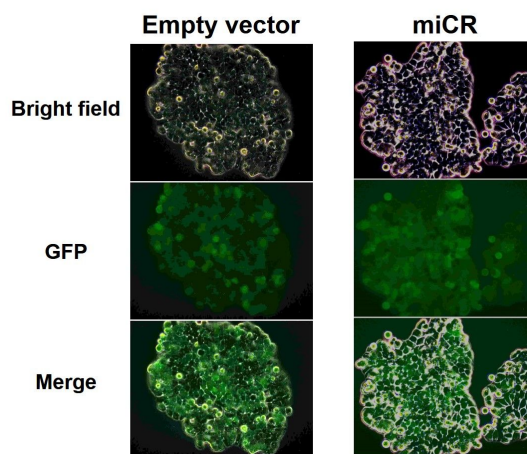


Cripto-1発現と術後生存期間

の関連を検討し、Cripto-1 高発現症例を対象に検討を進めることの是非を明らかにしたい

##### (2) Cripto-1 安定発現抑制細胞株を用いた細胞増殖能・転移能の検討

Cripto-1 の生体内での大腸癌の増殖・転移に関わる作用メカニズムの解明が必要である。そのため、in vivo 実験を見据えて、Cripto-1 高発現・高リンパ節転移細胞株である HT-29 と Colo205 に BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vectors (Invitrogen) を導入し、Cripto-1 安定発現抑制細胞株を下図の様に作成した。抗生剤にてセレクションをかけた後、限界希釈法にてシングルコロニーを採取し Cripto-1 安定発現抑制細胞株を作成した。同細胞株を empty vector 導入細胞株と比較すると、Cripto-1 発現が約 10 分の 1 に低下している事を確認した (real-time PCR)。



現在、機能解析を行っているが、Cripto-1 発現抑制細胞株で細胞増殖能が低下している結果が得られている。最終的にはマウス同所移植自然転移モデルにより、転移能・増殖能の変化を観察する。本検討により、Cripto-1 による大腸癌制御機構を解明する。

## 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 1 件 )

Castro NP, Fedorova-Abrams ND, Merchant A, Rangel MC, Nagaoka T, Karasawa H, Klauzinska M, Hewitt SM, Biswas K, Sharan SK and Salomon DS. Cripto-1 as a novel therapeutic target for triple negative breast cancer. *Oncotarget*. Accepted on May 9 2015. In press ( 査読あり )

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

Karasawa, H., Castro, N. P., Rangel, M. C. and Salomon, D. S. (2014) The Role of Cripto-1 in Cancer and Cancer Stem Cells, in Cancer Stem Cells (ed V. K. Rajasekhar), John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. doi: 10.1002/9781118356203.ch25

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.surg1.med.tohoku.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

唐澤 秀明 ( KARASAWA, Hideaki )

東北大学・大学病院・助教

研究者番号 : 30547401