

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791280

研究課題名（和文）癌間質、血清蛋白プロファイリングから検証した癌転移形成能誘導因子の同定と臨床応用

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of serum proteins associated with cancer metastasis and their clinical significance in colorectal cancer.

研究代表者

問山 裕二 (TOIYAMA YUJI)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00422824

研究成果の概要（和文）：大腸癌遠隔転移形成を誘導する液性因子のサイトカインアレイを用いた網羅的解析により、癌部ならびに癌間質の HGF 発現と血清中の HGF 濃度が有意に正の相関を認め、血清中の HGF 濃度を測定することが、大腸癌根治術後再発を規定する因子として、現在確定している因子に比べ、高い specificity と sensitivity を示した。また腫瘍局所浸潤性リンパ球に関与することが知られている複数のケモカインも新規大腸癌予後規定因子として確認され、EMT(上皮間葉移行)を誘導した。それらは遠隔転移臓器に発現しているため、そのレセプターを持つ癌細胞の臓器特異性転移に関与する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to identify novel and reliable serum markers related to the prognosis of colorectal cancer (CRC) patients and to assess the association between selected markers and clinical outcome. We identified HGF and several chemokines as novel prognostic markers in CRC patients and they significantly correlated with vascular metastasis, such as liver or lung metastasis. Serum HGF predicts poor prognosis patients in colorectal cancer with curative intent and that high expression of several serum chemokines are induced by secretion from target organs, such as liver or lung, in a paracrine fashion and showed the revelation of the metastatic destination for CRC and allows the progression of cancer cells in these metastatic sites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：消化器癌

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌、予後因子、サイトカイン、ケモカイン、遠隔転移

1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の欧米化に伴って、日本においても大腸癌による死亡者数が増加しており、女性においては悪性新生物による死亡者数で第1位となっている。このようななか、相次ぐ高価な新薬（分子標的治療薬）、さらに新レジメの承認により、大腸癌化学療法の治療成績は著しく向上しているも医療経済的には逼迫しているのが現状である。一方では診断学や外科治療の進歩により大腸癌では現在約 80%で治癒切除が行われ、治癒切除例では結腸癌で 80%、直腸癌では 75%に治癒が期待できるようになってきたが、課題も残っている。Stage III(リンパ節転移(+))結腸

療成績は著しく向上しているも医療経済的には逼迫しているのが現状である。一方では診断学や外科治療の進歩により大腸癌では現在約 80%で治癒切除が行われ、治癒切除例では結腸癌で 80%、直腸癌では 75%に治癒が期待できるようになってきたが、課題も残っている。Stage III(リンパ節転移(+))結腸

癌の 25%、直腸癌では 35%に再発を認めるため、より強力な補助化学療法のリジメの開発が急務である一方、化学療法の費用対効果を考慮すると、化学療法の恩恵を受ける Stage III 大腸癌は約 10%であり、それ以外の 90%の患者はただ化学療法の副作用を経験し、術後生活の QOL を極端に低下至らしめているにすぎないことになり、医療経済の観点からも症例の選択が必要となる。

2. 研究の目的

消化器癌患者の末梢血中あるいは腫瘍組織中から検出される多くのバイオマーカーの研究により、従来の病理学的因子を凌駕する予後・悪性度の新たな予測因子として報告されてきている。われわれも予後がわかっている大腸癌 300 症例より解析し、多くの再発規定因子を同定してきたが、真に転移を有する患者の同定に関しては specificity, sensitivity から検討すると十分ではなく、複数のバイオマーカーの combination による検討が必要となる。一方、基礎癌研究においては自己複製能を有する癌幹細胞の研究が盛んとなり、遠隔転移に関しても、癌幹細胞が上皮間葉移行することにより多臓器への遠隔転移を形成する概念も登場してきている。上皮間葉移行を誘導因子として、癌周囲 stroma が産生する液性因子が報告されているが、単一因子に依存するのではなく、複数の因子が融合的に関係し癌に好条件の転移機構を構築している可能性が示唆される。今回の研究の目的は、この液性因子の網羅的解析により、術後再発を来たしてくる患者の究極的な選別方法を確立することにある。つまり、それらの因子が末梢血中にいかに反映されているか？さらに、それらを術前に検出可能であれば、術後再発を来す患者のみに抗癌剤治療を施行することが可能で、医療経済的にも大きな貢献が可能で、さらには抗癌剤治療を必要としない患者の QOL 向上が期待できる。

3. 研究の方法

末梢血におけるサイトカイン、ケモカイン発現の検討

当外科学講座にて大腸癌と診断され、術後遠隔転移再発を認めた症例と遠隔転移再発を認めない患者の摘出標本の末梢血を使用し、Human Cytokine Antibody Array にて特異的に再発症例で発現の高い液性因子を同定した。

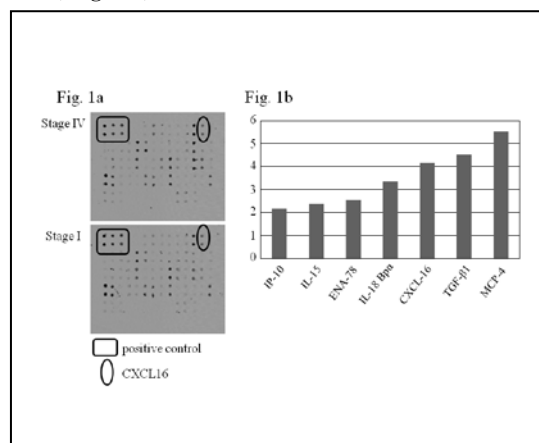
1. RayBio® Human Cytokine Antibody Array G series (RayBiotech, Inc.) を利用し、glass chip 上に sample を apply し、incubation した。

2. カクテルされた Biotin-Ab を apply し、incubation した。

3. さらにラベリングされた streptavidin を apply し incubation した。

4. Axon GenePix にて signal を解析し、RayBio® Analysis Tool にてデータ解析を施行。(Fig. 1a)

再発群で 2 倍以上に発現の高い液性因子を同定した。(HGF, CXCL10, CXCL16, ENA78) (Fig. 1b)



臨床病理学的因子と網羅的に検討して選択された液性因子との関連の検討

さらにすでに 300 症例の予後が判明している症例の血清にて、今回 pick up できた再発を規定する液性因子に関し、300 症例を超える大規模数の血清 sample で独立した再発規定因子としての意義ならびに臨床病理学的因子との関係も検討した。

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 法)

臨床サンプルから選出された液性因子が癌細胞株にどのような影響を与えるかの検討を行った。

大腸癌細胞株

Human colon cancer cell line (HT29, Lovo, caco-2, DLD-1, Widr) を東北大学から受託。

EMT 関連遺伝子、蛋白の変化

Pick up した液性因子を投与することで、培養細胞における現在知られている上皮間葉移行関連の上皮細胞マーカーである E-cadherin ならびに間葉系マーカーである Vimentin の発現も Real time PCR, Western blotting にて確認した。

In Vitro 解析

1. Proliferation Assay
2. Migration Assay
3. Invasive Assay

免疫染色検査

癌ならびに遠隔転移巣さらに転移臓器である肝、肺部の発現を検討した。

(HGF, CXCL10, CXCL16, ENA78)

4. 研究成果

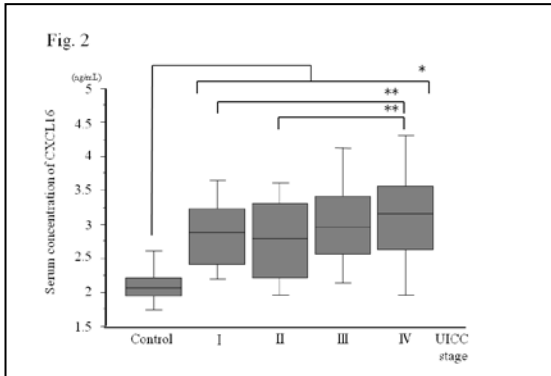


Fig. 2: 血清 CXCL16 は大腸癌患者で有意に高く、stage が進行するに伴い高値を示した。

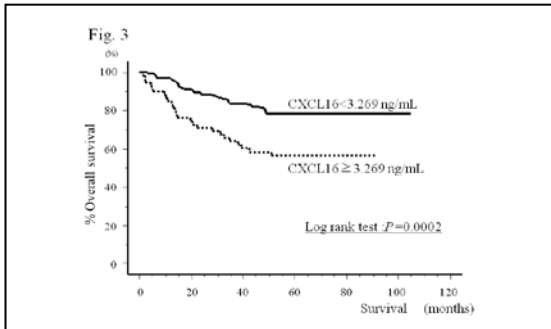


Fig. 3: 血清 CXCL16 が高値群では有意に予後不良で、その他の予後を規定する因子(T, N, M 因子、腫瘍マーカー(CEA)との検討では独立予後規定因子であった。

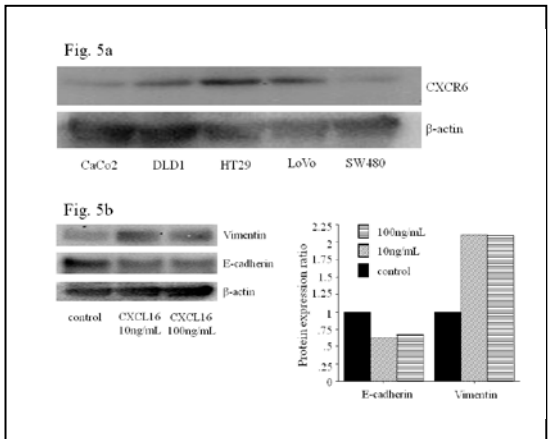


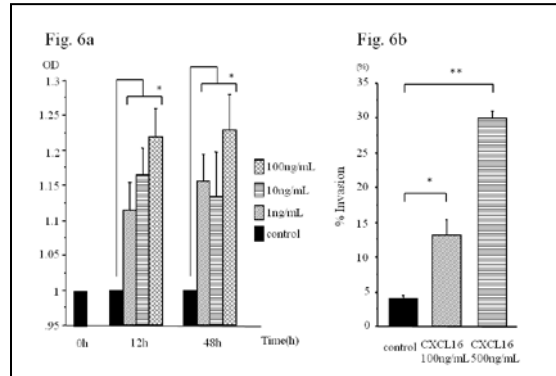
Fig. 5: CXCL16 は CXCR6 陽性大腸癌細胞株に対しては、Vimentin 蛋白は増加し、E-cadherin 蛋白は低下し、EMT(上皮間葉移行)の現象を認めた。

さらに CXCL16 が CXCR6 陽性大腸癌細胞株にどのような影響を与えるかの検討を以下の assay で行った。

増殖能ならびに浸潤能の検討

Fig. 6a は癌細胞増殖能を検証したものであるが、CXCL16 濃度依存的に細胞増殖能の亢進を認めた。さらに Fig. 6b は癌細胞浸潤能を検証したものであるが、CXCL16 濃度依存的に

細胞浸潤能の亢進を認めた。



また、CXCL16 は CXCR6 陽性大腸癌細胞株に対して、濃度依存的に細胞移動能の亢進を認めた。

免疫染色の結果から、CXCL16 は大腸癌高頻度転移部位である肝臓に発現が高いことを証明した。

以上より CXCL16 は新たな大腸癌予後規定因子であることが確認され、このケモカインは大腸癌細胞株に対して EMT ならびにケモタキシスを誘導することで、臓器特異的転移を誘導している可能性が示唆された。

今回の検討項目である、大腸癌治癒切除後の有効な再発マーカーの検討であるが、血中 HGF は有意に癌患者で高値を示し、大腸癌 stage が進むに伴い高値を示した。大腸癌治癒切除後の血中 HGF の興味深い知見として、Fig. 7 で示すように術後補助的な抗癌剤投与を必要とされていない大腸癌 Stage II 患者において、術前血中 HGF 高値群では有意に予後不良で、独立予後規定因子であったことである。さらに術後補助的抗癌剤治療が必須と言われている Stage III 大腸癌患者においても、術前血中 HGF 高値群では有意に予後不良で、独立予後規定因子であった。

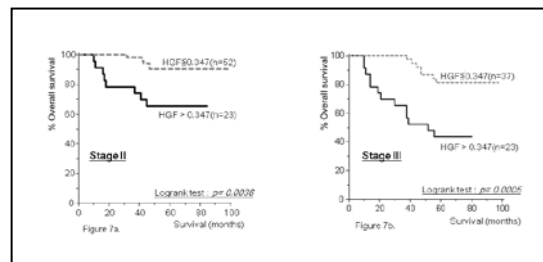


Fig. 7a

この結果は、今後の大腸癌治癒切除後の患者の抗癌剤投与において、術前血中 HGF を測定し、評価することで適切な患者選択が可能であることを示唆している。

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 5 件）

1. Okugawa Y, Miki C, Toiyama Y et al. Loss of tumoral expression of soluble IL-6 receptor is associated with disease progression in colorectal cancer. Br J Cancer. 2010 Sep 7;103(6):787-95.
2. Saigusa S, Toiyama Y, et al. Stromal CXCR4 and CXCL12 expression is associated with distant recurrence and poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. Ann Surg Oncol. 2010 Aug;17(8):2051-8.
3. Toiyama Y, Miki C, et al. Loss of tissue expression of interleukin-10 promotes the disease progression of colorectal carcinoma. Surg Today. 2010;40(1):46-53.
4. Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Okugawa Y, Tanaka K, Kusunoki M. Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients. Int J Cancer. 2009 Oct 1;125(7):1657-62.
5. Okugawa Y, Miki C, Toiyama Y, et al. Serum level of soluble vascular cell adhesion molecule 1 is a valuable prognostic marker in colorectal carcinoma. Dis Colon Rectum. 2009 Jul;52(7):1330-6.

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Matsushita K, Toiyama Y et al, ASCO GI cancer meeting. Use of serum CXCL16 to predict liver metastasis and prognosis in colorectal cancer patients. San Francisco. 2011.1.22
2. Kawamura M, Toiyama Y et al, ASCO GI cancer meeting. Evaluation of serum CXCL5 as a serum marker for prognosis of colorectal cancer patients. San Francisco. 2011.1.22
3. Toiyama Y et al, ASCO GI cancer meeting. Serum hepatocyte growth factor as a potent prognostic marker for colorectal cancer patients undergoing surgery with curative intent. San Francisco. 2009.1.17.

〔図書〕（計 1 件）

1. 問山裕二ら 大腸疾患 NOW 2011, 日本メデ
ィカルセンター, 2011 年 1 月 p65-74.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

問山 裕二 (TOIYAMA YUJI)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00422824