

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591723

研究課題名（和文）化学放射線療法後の直腸癌遠隔転移誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of distant recurrence in rectal cancer patients after preoperative chemoradiotherapy

研究代表者

井上 靖浩（Inoue Yasuhiro）

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20324535

研究成果の概要（和文）：直腸癌化学放射線療法後の遠隔転移誘導メカニズムをさまざまな角度から in vivo、in vitro で検証した。① 抗癌剤耐性関連因子、② Angiogenesis 関連因子、③ Stem cell 関連因子、④ ケモカイン関連因子、⑤ 上皮間葉移行(EMT)関連因子、⑥ 間質関連、⑦ その他について解析を行った結果、これらすべてにおいて、直腸癌遠隔転移再発に関与することが示唆された。すなわち、直腸癌化学放射線療法後の生存率向上にはより一層の多面的アプローチによるトランスレーショナルリサーチが必要である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism of distant recurrence in rectal cancer patients after preoperative chemoradiotherapy to improve the prognosis of patients with advanced rectal cancer further. The mechanism were analyzed from several viewpoints including 1) anti-cancer agents, 2) angiogenesis, 3) stemcell, 4) chemokines, 5) epithelial-mesenchymal transition(EMT), 6) cancer-stromal interaction, et al. Our study suggested that these all factors were associated with distant recurrence with several interactions. Therefore, we need to investigate the mechanism from various angles further, to control distant recurrence in rectal cancer patients after preoperative chemoradiotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器外科学（腫瘍学）

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：直腸癌、化学放射線療法、遠隔転移

1. 研究開始当初の背景

直腸癌の術前化学放射線療法の目的は 1. 局所再発の抑制、2. ダウンサイジングによる自然肛門温存率の向上、3. 生存率向上への寄与であるが、圧倒的な局所再発抑制効果と比較して、生存率向上への寄与はいまだ十分証明されていない。すなわち術後遠隔転移再発

の抑制が残された課題であり、現在まで有意に遠隔転移を抑制し、生存率向上を証明できたものはない。

2. 研究の目的

直腸癌に対する術前補助療法前後の臨床サンプルを分子生物学的アプローチで検証することで、治療感受性や、とくに遠隔転移

再発に関わる因子を検索する。さらに培養細胞での検証も加え、これらメカニズムのネットワークを解明することで、直腸癌集学的治療におけるテーラーメイド化を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化学放射線による修飾を受けた直腸癌臨床サンプルのマイクロダイセクションによる腫瘍・間質の RNA 抽出、標的遺伝子発現測定をおこなう。

(2) In vivo, In vitro による下記因子と、化学放射線療法後の遠隔転移再発との関連を検討する。

- ① 抗癌剤耐性関連因子
(TS, DPD, OPRT, TopI, ERCC1, TP, et al.)
- ② Angiogenesis 関連因子
(VEGF, EGFR, HGF, HIF1, et al.)
- ③ Stem cell 関連因子
(CD133, OCT4, SOX2, et al.)
- ④ ケモカイン関連
(CXCL12, CXCR4, et al.)
- ⑤ 上皮間葉移行 (EMT) 関連因子
(Ecadherin, Vimentin, FN1, Snail, Slug, Twist, et al.)
- ⑥ 間質関連
(CAF, GLUT-1, et al.)

4. 研究成果

① 直腸癌化学放射線療法施行後のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから癌細胞と間質細胞を摘出し RNA を抽出後、cDNA を合成し real time PCR 法を用いて標的遺伝子の発現を測定する方法を確立した。

それにより、化学放射線療法による癌細胞と間質細胞の反応を分けて検討することが可能となった。また、化学放射線療法前後の癌細胞の標的遺伝子発現を正常細胞のコンタミネーションなしで比較検討できるようになった。すなわち、上記手法を確立することで標的遺伝子発現測定の精度が向上し、それに伴い得られた結果の精度も上がり信頼できるものとなった。

その上で、平成 21 年度では、化学放射線療法で放射線増感剤として用いる 5-fluorouracil (5-FU) 代謝関連酵素である TS, DPD が化学放射線療法後の癌細胞で高発現している患者は遠隔転移再発する可能性が高いことを証明した。(参考文献⑨)

すなわち、a) 化学放射線療法に併用する化学療法関連因子が遠隔再発に関与することを明らかにした。

② これまで、血管新生に関わる VEGF や EGFR が化学放射線療法前後では発現パターンが変化することや、化学放射線療法の 1 次効果予測因子になり得る可能性を報告してきた。

今回、大腸癌幹細胞マーカーの一つと考えられている CD133 の発現に着目し、これら血管新生因子との比較検討を行った。結果、化学放射線療法後の癌細胞で CD133 発現が高いと遠隔転移再発をきたす可能性が高いことを証明した。さらに放射線療法により CD133 はその線量依存的に発現が上昇することを in vitro の実験で証明した。また化学放射線療法後の CD133 発現部位と、再発に関与するとされる低酸素環境因子、HIF1 α 発現を免疫染色で評価し、重要な関連があることを示唆することができた。(参考文献⑩⑪)

図 CD133 と HIF1 α 発現の実際

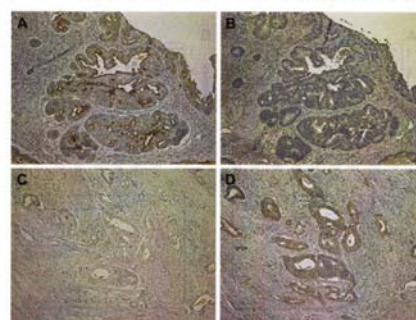
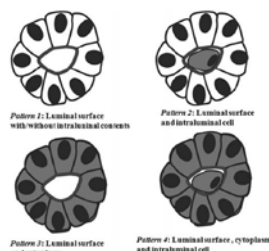


Fig. 5. CD133 and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression in immunohistochemistry. CD133 and HIF-1 α expression was observed at the luminal surface and in the cytoplasm, respectively. Residual cancer cells strongly expressed CD133 (A) and lacked HIF-1 α expression (B). Inversely, residual cancer cells without CD133 expression (C) strongly expressed HIF-1 α (D). Original magnification $\times 200$ (A-D).

すなわち、b) 化学放射線療法後の幹細胞関連因子が hypoxia を介して遠隔再発に関与する可能性を明らかにした。

このように CD133 発現が、直腸癌化学放射線療法後の遠隔転移再発に関与する可能性を見出したが、CD133 蛋白発現が、luminal surface, cytoplasm, intraluminal cells の関係で 4 パターンに存在し、発現部位が病理組織学的効果と関連することも発見した。(参考文献⑦)

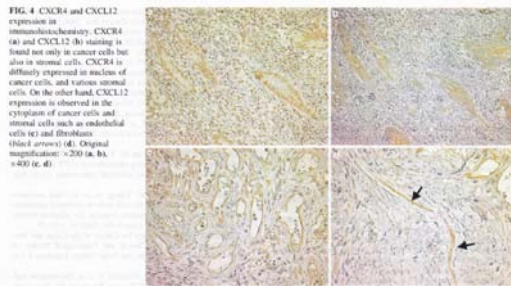
図 CD133 発現 4 パターン



③ 最近癌の増殖、血管新生、遠隔転移にかかわるとして注目されているケモカインに着目し、臨床サンプルを癌・間質にマイクロダイセクションしたうえで、ケモカイン CXCL12 およびレセプターである CXCR4 の発現と予後を検討した。直腸癌化学放射線療法後の遠隔転移再発、無増悪生存には CXCL12、CXCR4 遺伝子の高発現が関与していることが示され、その詳細を報告した。(参考文献⑧)

様々な腫瘍・間質関連因子が、直腸癌化学放射線療法後の予後に関わるとする仮説から、この他にも主に Cancer-associated fibroblast (CAFs) 由来であるとされる間質由来のケモカイン CXCL12 は、EMT (上皮間葉移行) とも関連し、直腸癌化学放射線療法後の再発と関連する結果を得た。(参考文献③⑧)

図 CXCR4 および CXCL12 発現



また、ケモカイン CXCL12 の発現もあって癌の増殖、浸潤能に関与するとされる Cancer-associated fibroblast (CAFs) においても、直腸癌化学放射線療法後の予後に関与することを報告した。(参考文献③)

平成 22 年度から放射線照射自体が大腸癌細胞に EMT 誘導を来すかどうかの検証も in vivo、in vitro で行ってきたが、細胞株、臨床検体どちらにおいても形態的に EMT 誘導が放射線で惹起されることを報告した。(参考文献⑤)

すなわち、c) 化学放射線療法後の間質関連因子では、CAF から由来するケモカイン CXCL12 や EMT 誘導を介して遠隔再発に関与する可能性を明らかにした。

④化学放射線療法の治療抵抗性は hypoxia 環境が大きく影響されることもあり、我々は hypoxia 関連因子である GLUT1 (glucose transporter-1) の発現と直腸癌化学放射線療法後の予後についても検討した。化学放射線療法後の GLUT-1 高発現は遠隔転移再発に関与し、予後に関与することが示唆された。(参考文献①)

同様に癌増殖、浸潤、転移などに重要な役割をはたす HGF および受容体である cMET のシグナル伝達系と直腸癌化学放射線療法後の再発との関連を検討したところ、HGF/cMET を抑制することが、根治術後の遠隔転移再発抑制につながる可能性を見出すことができた。(参考文献②)

すなわち、d) 化学放射線療法後の遠隔転移再

発には HGF pathway や Hypoxia 関連の GLUT1 も関与する可能性を明らかにした。

このようにいくつかのアプローチから化学放射線療法後の直腸癌遠隔転移誘導メカニズムのヒントを多く得ることができた。今後のさらなる研究へと継続中である。

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 11 件)

①Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Okugawa Y, Fujikawa H, Matsushita K, Uchida K, Inoue Y, Kusunoki M. Prognostic significance of glucose transporter-1 (GLUT1) gene expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. Surg Today 42; 460-9, 2012 査読有り

②Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Fujikawa H, Matsushita K, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Inhibition of HGF/cMET expression prevents distant recurrence of rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. Int J Oncol 40; 583-91, 2012 査読有り

③Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Fujikawa H, Matsushita K, Kawamura M, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Cancer-associated fibroblasts correlate with poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. Int J Oncol 38; 655-663, 2011 査読有り

④Saigusa S, Mohri Y, Ohi M, Toiyama Y, Ishino Y, Okugawa Y, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M. Podoplanin and SOX2 expression in esophageal squamous cell carcinoma after neoadjuvant chemo-radiotherapy. Oncol Rep 26; 1069-1074, 2011 査読あり

⑤Kawamoto A, Yokoe T, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Radiation induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. Oncol Rep 27; 51-57, 2011 査読あり

⑥Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Koike Y, Fujikawa H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Clinical Significance of CD133 and Hypoxia Inducible Factor-1 α Gene Expression in Rectal Cancer after Preoperative Chemoradiotherapy. Clin Oncol (R Coll Radiol) 20; 1-10, 2010 査読有り

⑦Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T,

Okugawa Y, Kawamoto A, Yasuda H, Morimoto Y, Fujikawa H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Immunohistochemical features of CD133 expression: association with resistance to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 24 ; 345-50, 2010 査読有り

⑧Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Kawamoto A, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Stromal CXCR4 and CXCL12 expression is associated with distant recurrence and poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 17 ; 2051-2058, 2010 査読有り

⑨Inoue Y, Tanaka K, Yokoe T, Saigusa S, Toiyama Y, Miki C, Kusunoki M. Microdissection is essential for gene expression analysis of irradiated rectal cancer tissues. *Oncol Rep* 22;901-906, 2009 査読有り

⑩Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Koike Y, Okugawa Y, Yokoe T, Kawamoto A, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 22;709-717, 2009 査読有り

⑪Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, Miki C, Kusunoki M. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Sug Oncol* 16; 3488-3498, 2009 査読有り

[学会発表] (計4件)

① Inoue Y, Saigusa S, Hiro J, Toiyama Y, Tanaka K, Mohri Y, Kusunoki M. Clinical and molecular comparison between short- and long-course preoperative radiotherapy for rectal cancer. *American Society of Clinical Oncology*. シカゴ・米国, 2011年6月3日~6月7日, 誌上発表 Abstr e14093

② 井上靖浩, 三枝 晋, 沖上正人, 川本 文, 廣 純一郎, 間山裕二, 小林美奈子, 田中光司, 三木誓雄, 楠 正人. 直腸癌術前化学放射線療法における至適照射スケジュールの検討. 第48回日本癌治療学会総会. 2010年10月28日, 京都 第48回日本癌治療学会総会. 2010年10月28日, 京都

③ 三枝晋, 田中光司, 間山裕二, 横江毅, 奥川喜永, 小池勇樹, 藤川裕之, 岩田崇, 松下航平, 井上靖浩, 三木誓雄, 楠 正人. 直腸癌術前化学放射線療法後 CD133, HIF-1 α 発現

の臨床病理学的検討. 第48回日本癌治療学会総会. 2010年10月28日, 京都 第48回日本癌治療学会総会. 2010年10月28日, 京都
④ Tanaka K, Yasuda H, Okita Y, Araki T, Saigusa S, Toiyama Y, Yokoe T, Kawamoto A, Ioue Y, Miki C, Kusunoki M. CD133, OCT4, and NANOG in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *AACR 100th Annual Meeting 2009*. April 21, 2009, Denver, CO, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 靖浩 (Inoue Yasuhiro)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 20324535

(2) 研究分担者

楠 正人 (Kusunoki Masato)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 50192026

三木 誓雄 (Miki Chikao)
三重大学・大学院医学系研究科・客員教授
研究者番号 : 50242962