

授与番号	甲第 1927 号
------	-----------

論文内容の要旨

Differential expression in the tumor microenvironment of mRNAs closely associated with colorectal cancer metastasis

(大腸癌転移と関連する癌微小環境における messenger RNA の発現)

(伊藤 一洋, 刑部 光正, 杉本 亮, 山田 峻, 佐藤 綾香,
上杉 憲幸, 柳川 直樹, 鈴木 拓, 菅井 有)

(Annals of surgical oncology 30 巻, 2 号 令和 5 年 2 月掲載)

I. 研究目的

大腸癌は、欧米諸国や日本における癌死亡の主な原因である。世界保健機関 (WHO) は、年間 945,000 人が新規に罹患し、492,000 人が死亡していると推定している。大腸癌の転移は、患者の生命予後に重大な影響を及ぼす因子である。癌の転移は、癌細胞周囲に充満する線維芽細胞や炎症細胞から構成される癌微小環境からの影響を受けることが知られている。癌微小環境の中心となるのは、癌関連線維芽細胞 (Cancer Associated Fibroblast: CAF) であり、種々のサイトカインや成長因子を産生し、癌細胞の増殖や浸潤、転移に影響を及ぼす。また、癌細胞由来の messenger RNA (mRNA) や micro RNA (miRNA) が、転移臓器の微小環境に作用し、転移巣の形成が促進されると報告されている。転移の機構の解明が、大腸癌死亡率の改善に重要である。本研究では、大腸癌および癌周囲間質に発現する RNA を明らかにすることで、大腸癌転移の分子機構を解明することを目的とした。

II. 研究対象ならび方法

対象：① 癌組織について：The Cancer Genome Atlas-colon adenocarcinoma (TCGA-COAD) 及び rectum adenocarcinoma (READ) プロジェクトのデータセット (<http://portal.gdc.cancer.gov/>) の中から TCGA biolinks v2.22.41 を用いて非 microsatellite instability (MSI) 型 377 例 (転移例 186 例, 非転移例 191 例) を抽出し対象とした。次に, GDCRNA Tools v1.14.02 を用いて遺伝子発現データをダウンロードし, DESeq2 v1.34.03 を使用して, 大腸癌非転移例に対する転移例での発現変動している mRNA の fold change (FC) を求めた。

② 癌周囲間質について：2019 年 12 月から 2021 年 7 月に当院で外科的に切除された大腸癌症例 17 例 (転移例 9 例, 非転移例 8 例) を対象とした。大腸癌新鮮検体から、癌部および粘膜下層を含むように採取し、腺管分離法により癌周囲間質を実体顕微鏡下で採取した。採取した分離間質は、HE 染色標本作製し形態の確認を行った。確認後に RNA を抽出し、Clariom S array を用いて網羅的 mRNA 解析を行った。解析ソフト: Transcriptome Analysis Console (TAC) を用いて、大腸癌非転移例に対する転移例での発現変動している mRNA の FC を求めた。

Gene-set enrichment analysis (GSEA) :①および②で得られた結果から GSEA を行い、解析結果から、着目した特定の pathway と関連性を示す mRNA を転移に関わる mRNA とした。GSEA には、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway を遺伝子データセットとして用いた。

Validation cohort: 2009 年 2 月から 2016 年 8 月に当院で外科的に切除された大腸癌症例 259 例 (pStage II 145 例, pStage III 114 例) を対象とした。Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) ブロックから tissue micro array (TMA) を作成し候補 mRNA の免疫染色を行った。免疫染色の染色強度は、陰性 (score 0), 弱陽性 (score 1), 中等度陽性 (score 2), 強度陽性 (score 3) に分類し評価した。また、染色面積を 0% (score 0), 1-25% (score 1), 26-50% (score 2), 51-100 (score 3) に分類し評価した。免疫染色強度と染色面積のスコアの和から、3 以上を陽性とした。免疫組織化学の結果は、JMP Pro 16.2 を用いて解析した。臨床病理学的変数 (性別, 部位, 進行病期および組織型) は Fisher の正確検定を用いて分析した。

多変量解析: 全生存期間と無病生存期間を予測する mRNA の同定のために、Cox 比例ハザードモデルを用いて単変量および多変量解析を行った。また、同定した mRNA と全生存率および無病生存率との関連について検討した。

本研究は岩手医科大学倫理委員会 (承認番号: MH2018-042) によって承認された。

III. 研究結果

癌組織について: GSEA により有意に相関する遺伝子セット (KEGG pathway) のうち、大腸癌と密接に関連する“ECM-受容体相互作用経路”に着目した。ECM-受容体相互作用経路に含まれる mRNA の中で、enrichment score の高い tenascin-C, SPP1, laminin を癌組織における転移に関連する mRNA とした。

癌周囲間質について: GSEA により有意に相関する遺伝子セット (KEGG pathway) のうち、癌の増殖や進行との関連が指摘されている嗅覚伝達経路に着目した。嗅覚伝達経路に含まれる mRNA の中で、既知の報告で大腸癌の進行との関連が示されている olfactory receptor family である OR11H1, OR11H4 を癌周囲間質における転移に関連する mRNA として着目した。

Validation cohort: Tenascin-C, SPP1, laminin, OR11H1 および OR11H4 の発現を免疫染色で検討した。癌組織では転移症例のうち、tenascin-C は 55 例 (48.3%) ($p < 0.0001$), SPP1 は 104 例 (91.2%) ($p < 0.0001$), laminin は 35 例 (30.7%) ($p = 0.1576$) で陽性像を認めた。癌周囲間質においては、転移例のうち OR11H1 は 109 例 (95.6%) ($p < 0.0001$), OR11H4 は 101 例 (88.6%) ($p < 0.0001$) で陽性像を認めた。

多変量解析: Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析により、年齢、進行病期 (II 期 vs. III 期), tenascin-C, OR11H4 の 4 因子が大腸癌患者の全生存期間と有意に関連していた。また、これらの因子は多変量解析においても全生存期間と有意に関連していた (tenascin-C: $p = 0.0410$, OR11H4: $p = 0.0315$)。Kaplan-Meier 法による生存期間分析を行うと、癌組織における tenascin-C の発現と癌周囲間質における OR11H4 の発現が有意に予後不良であった (tenascin-C: log-rang test < 0.0001 , OR11H4: log-rang test < 0.0001)。

IV. 結 語

本研究において、癌組織に発現する tenascin-C, 癌周囲間質に発現する OR11H4 が大腸癌転移に関連する mRNA の候補になる可能性が示唆された。また、tenascin-C と OR11H4 の発現上昇が大腸癌患者の予後因子となり得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 佐藤 孝 (病理診断学講座)

副査 講師 八重樫 瑞典 (外科学講座)

副査 准教授 柳川 直樹 (病理診断学講座)

大腸癌は日本における癌死亡の大きな原因であり、早期発見・治療は死亡率の改善に重要である。一方で、転移は患者の生命予後に重大な影響を及ぼし、その分子機構の解明は予後予測因子として重要である。

本研究では、大腸癌手術標本を用いて、癌組織での転移に関わる遺伝子発現データの解析に加えて、癌微小環境を構成する細胞の一つである、cancer associated fibroblast(CAF)に着目しその mRNA プロファイルの解析を行った。その結果、リンパ節転移を起こしている症例では、転移の無い症例と比較して、癌組織では SPP1, laminin, tenascin C が、CAF では olfactory receptor(OR) 11H4, 52H5, 11H1 が 転移に関わる重要な因子として挙げられた。さらに免疫染色を用い蛋白レベルでの発現について多変量解析を行ったところ、癌組織では、tenascin C が、CAF では OR11H4 の発現が予後不良因子となることを解明した。また、その発現はそれぞれ独立していることも明らかにした。本研究の成果は、大腸癌の新たな予後予測因子を提供すると共に、転移予防の創薬開発に向けて有用なデータとなることが期待され、学位に値する論文である。

試験・試問結果の要旨

大腸癌の転移機構、癌局所の微小環境に加えて、遺伝子発現データの解析手技を含めた実験手法についても試問をおこない適切な解答を得た。学位に値する学識を有している。また、学位論文の作成にあたり、剽窃・盗作等の研究不正の無いことも確認した。

参考論文

- 1) Desmoplastic reactions and epithelial-mesenchymal transition proteins in stages II and III colorectal cancer: association with and prognostic value for disease-free survival (大腸癌の予後と関連する上皮間葉転換タンパク質と腫瘍間質反応)
(橋元 麻生 他 9名と共著)
Virchows Archiv, 480 巻, 4 号 (2022): p 793-805.
- 2) Primary extraovarian granulosa cell tumor of the mesentery (腸間膜原発の卵巣外顆粒膜細胞腫)
(柳川 直樹 他 8名と共著)
Pathology International, 72 巻, 11 号 (2022): p 566-568.