

大腸癌のリンパ節転移を予測する遺伝子の同定

上尾, 裕紀

九州大学病院別府病院外科 | 九州大学大学院消化器総合外科

高野, 裕樹

九州大学病院別府病院外科

松村, 多恵

九州大学病院別府病院外科

藏重, 淳二

九州大学病院別府病院外科

他

<https://doi.org/10.15017/1440935>

出版情報：福岡醫學雑誌. 104 (12), pp.559-563, 2013-12-25. 福岡医学会

バージョン：

権利関係：

原 著

大腸癌のリンパ節転移を予測する遺伝子の同定

¹⁾九州大学病院別府病院 外科²⁾九州大学大学院 消化器 総合外科

上尾裕紀¹⁾²⁾, 高野裕樹¹⁾, 松村多恵¹⁾, 藏重淳二¹⁾, 新田吉陽¹⁾, 江口英利¹⁾,
主藤朝也¹⁾, 杉町圭史¹⁾, 佐伯浩司²⁾, 沖英次²⁾, 森田勝²⁾, 池田哲夫²⁾,
前原喜彦²⁾, 三森功士¹⁾

**Identification of Genes that Predict Lymph Node Metastasis
in Colorectal Cancer Cases**

Hiroki UEO¹⁾²⁾, Yuki TAKANO¹⁾, Tae MATSUMURA¹⁾, Junji KURASHIGE¹⁾, Yoshiaki SHINDEN¹⁾,
Hidetoshi EGUCHI¹⁾, Tomoya SUDO¹⁾, Keishi SUGIMACHI¹⁾, Hiroshi SAEKI²⁾, Eiji OKI²⁾, Masaru MORITA²⁾,
Tetsuo IKEDA²⁾, Yoshihiko MAEHARA²⁾ and Koshi MIMORI¹⁾

¹⁾*Department of surgery and science, Kyushu university beppu hospital*

²⁾*Department of surgery and science, Graduate school of medical science, Kyushu University*

Abstract

Introduction : Currently, Endoscopic mucosal resection (EMR) and laparoscopic surgery with colorectal cancer (CRC) and has been expanding rapidly. In handling of colon cancer, adaptation of EMR is determined by the depth of tumor invasion. It is important to identify genes to predict lymph node metastasis in early CRC tumors precisely in a reproducible fashion to determine the adaptation of EMR treatment. We performed the comprehensive analysis of gene expression and genomic copy number simultaneously in CRC primary tumors to identify the bona-fide indicator of lymph node metastasis.

Materials and Methods : We collected cancer cells specifically by Laser Microdissection (LMD) on 157 cases of primary colorectal cancer, and performed oligo microarrays for gene expression (GE) and aCGH for copy number aberration. As for candidate genes to be associated with lymph node metastasis, we examined reproducibility by quantitative RT-PCR using cDNA created from the RNA extracted from 172 cases of CRC. **Results :** As for the association of lymph node metastasis, we found that 240 genes and 54 genes by aCGH and by oligo GE microarray, respectively. According to database of those two arrays, 501 genes were significantly correlated (correlation coefficient > 0.7) with each other, and we found that 11 out of 501 genes were identified as lymph node metastasis related genes with copy number alteration. Of these 11 genes, we focused on *PCMI*, *MTUS1*, *ASAHI* on 8p22. Then, we confirmed that the decreased expression and genomic deletion of *MTUS1* were observed in lymph node positive cases ($p = 0.0195$) in another subset of 172 cases of CRC.

Conclusions : To measure the expression of *MTUS1* of the tumor by PCR, we can predict the presence of lymph node metastasis. We expected that the loss of *MTUS1* should be an important marker in determining the adaptation of endoscopic resection.

Key words : Colon cancer · *MTUS1* · Prognostic marker

はじめに

大腸癌の罹患率は依然高いが、早期癌の発見率も増加し、主にピットパターンなど腫瘍の表面性状から得る深達度の診断能も向上したことで内視鏡的粘膜切除術（Endoscopic mucosal resection：EMR）や腹腔鏡下手術は急速に拡大してきている。大腸癌におけるリンパ節転移は予後規定因子として重要であり治療方針決定においても重要な因子となるが、リンパ節転移の評価に広く用いられている computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI) のリンパ節転移検出の感度は決して高くない^{1)~3)}。術前病期分類を正確に判定する上で、リンパ節転移を含む遠隔転移を予測する高精度の指標が求められている。今回、大腸癌 157 例の遺伝子プロファイルからリンパ節転移を予測するマーカー遺伝子の検索を行った。遺伝子を同定する上で、その発現異常がゲノムコピー数異常に起因し、安定した発現解析が可能な遺伝子をターゲットとし、解析により同定されたマーカー遺伝子のリンパ節転移との関連と臨床的意義を検討した。

対象・方法

大腸癌に対し外科的切除を施行された 157 例の原発巣を Laser Microdissection (LMD) を用いて、腫瘍部のみを採取し、oligo microarray にて遺伝子発現量を測定し、Comparative Genomic Hybridization (aCGH) 法にて copy number aberration を調べた。病理学的診断にてリンパ節転移を認めた群と認めなかった群の両群間で発現量と DNA コピー数と有意差を認める遺伝子を検索した。aCGH および oligo マイクロアレイにおいて有意に相関のある 501 個の遺伝子（相関係数 > 0.7）を認めた。aCGH と oligo マイクロアレイそれぞれについてリンパ節転移との関連を解析し oligo マイクロアレイから 240 個、aCGH からは 54 遺伝子の有意にリンパ節転移と相関する遺伝子を同定した。これらの遺伝子群から重複する遺伝子を出したところ、11 個の遺伝子群を認めた。

同定された 11 個の遺伝子中、リンパ節転移と相関のあると報告のある⁴⁾ 8p22 上の 3 つの遺伝子、*MTUS1* (mitochondrial tumor suppressor 1), *PCMI* (Pericentriolar material 1), *ASAHI*

(N-acylsphingosine amidohydrolase acid ceramidase 1) について検討を行った。validation set として 172 例の大腸癌患者の原発巣より抽出した mRNA より作成した cDNA を用いて、quantitative RT-PCR を施行し、その遺伝子発現とリンパ節転移の相関について検討した。

結 果

リンパ節転移と遺伝子発現に相関のある 240 個の遺伝子群 ($q < 0.05$ = 有意に発現変動をした遺伝子、リンパ節転移と copy number aberration に相関のある 54 個の遺伝子群 ($q < 0.05$) を同定した。また oligo microarray と CGH のデータベースから、それら 2 群の結果が相関する 501 個の遺伝子群（相関係数 > 0.7）を同定し、これら 3 つの遺伝子群で重複する 11 個の遺伝子 pick up した（図 1）。

前述の 11 個の遺伝子のうち、これまでリンパ節転移との相関が報告されている 8p22 にクラスターを形成しゲノム領域の異常が確実な *MTUS1*, *PCMI*, *ASAHI* に着目した^{5)~7)}（図 2-1, 2-2）。

それらの 3 遺伝子の腫瘍部での発現について大腸癌患者 172 例の validation set を用いて、quantitative RT-PCR を施行した。大腸癌において腫瘍部と正常部の *MTUS1* 発現に有意差は認めなかった ($p = 0.337$, 図 3)。 *PCMI* と *ASAHI* の発現については、リンパ節転移の有無と有意差は認めなかったが (data not shown), *MTUS1* 発現はリンパ節転移陰性例にくらべ、陽性例で発現低下を認めた ($p = 0.0195$, 図 4)。

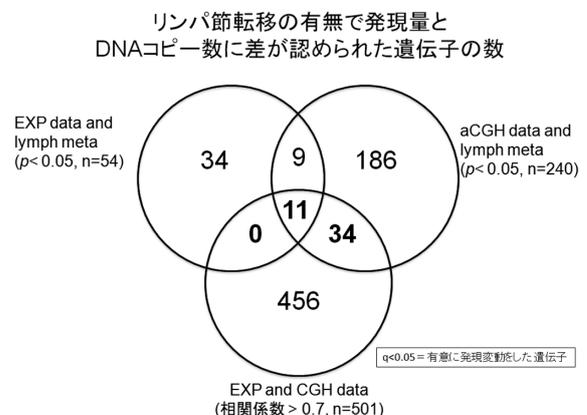


図 1 リンパ節転移の有無で発現量と DNA コピー数に差が認められた遺伝子の数

リンパ節転移の有無で発現量と DNAコピー数に差が認められた11個の遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	Cytoband	Correlation
TNKS	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	8p23.1	0.847
LONRF1	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1	8p23.1	0.784
MTUS1	microtubule (mitochondrial) associated tumor suppressor 1	8p22	0.719
PCM1	pericentriolar material 1	8p22	0.762
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	8p22	0.744
XPO7	exportin 7	8p21.3	0.754
SLC39A14	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	8p21.3	0.737
CHMP7	charged multivesicular body protein 7	8p21.3	0.826
SLC25A37	solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37	8p21.2	0.768
PPP2R2A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha	8p21.2	0.781
BX648950		8p21.1	0.776

図 2-1 リンパ節転移の有無で発現量と DNA コピー数に差が認められた 11 個の遺伝子候補

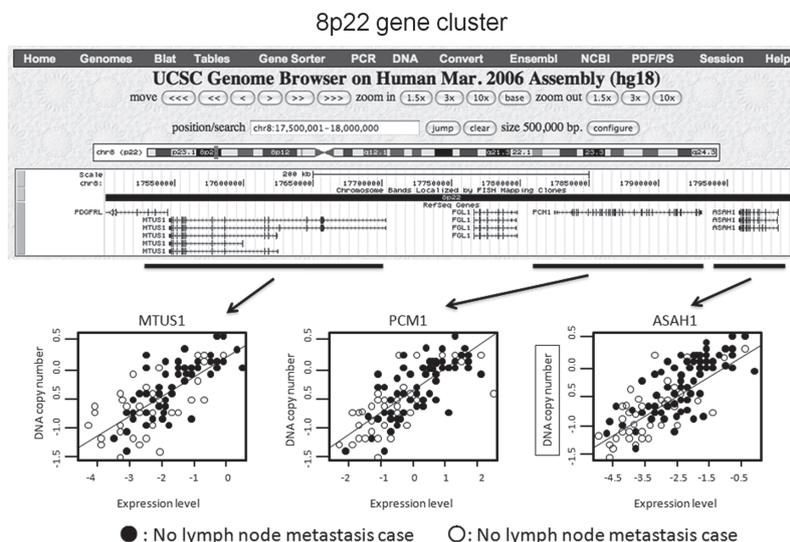


図 2-2 リンパ節転移と相関を認める 8p22 gene cluster

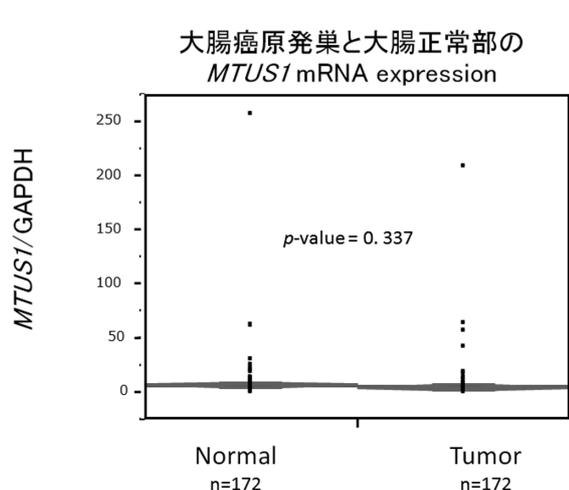


図 3 大腸癌原発巣と大腸正常部の *MTUS1* mRNA expression

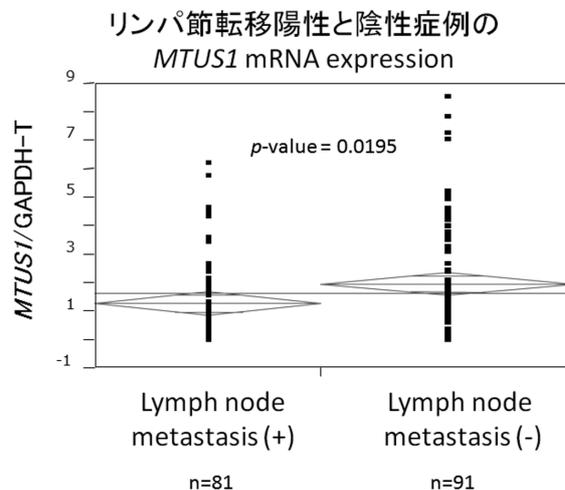


図 4 リンパ節転移陽性と陰性症例の *MTUS1* mRNA expression

考 察

大腸癌の罹患数・死亡数ともに増加しており、推計によれば早期癌を含めた総罹患数は約10万と言われ、早期癌の発見率増加に合わせEMR施行症例が増加してきている。それに伴ってEMRの限界も明らかになってきた。EMRの適応は、大腸癌取り扱い規約では、①粘膜内癌、粘膜下層への軽度浸潤癌、②最大径2cm未満、肉眼型は問わないとなっている⁸⁾。大腸癌の深達度に関しては内視鏡所見より判定可能であるが、CTやMRIによる術前画像診断では、所属リンパ節転移や微小な遠隔転移を検出するには限界があるため、術前の病期分類は正確とは言えない。大腸粘膜内癌(m癌)についてはリンパ節転移の可能性はないが、大腸粘膜下浸潤癌(sm癌)では10%にリンパ節転移を認め中間リンパ節転移も少なくない。sm癌において内視鏡的粘膜切除術が施行された場合、リンパ節転移の有無により追加腸切除を検討する必要がある。切除標本が①微小浸潤(300 μ m程度)で、②切除深部断端陰性(癌と切除深部断端の距離が500 μ m以上)③組織型が低分化あるいは未分化癌以外④脈管侵襲陰性の4条件を満たせば、転移の可能性はきわめて低く外科的追加治療の必要がないと考えられている。また症例集積と最近の研究成果から、浸潤先進部に簇出や低分化成分がなければ、脈管侵襲陰性の条件下で、sm浸潤実測値1000~1500 μ m程度までのsm癌は転移がないことが明らかになった⁹⁾。

大腸癌のリンパ節転移の危険因子としてsm浸潤度、組織型、簇出、脈管侵襲などがあげられる。P53蛋白過剰発現がリンパ節転移の危険因子であるとの報告やDNA image analysisによる核DNA量がリンパ節転移の危険因子であるとの報告もなされ、リンパ節転移予測因子について研究が進んでいる¹⁰⁾。

我々は157例の原発巣の遺伝子解析からリンパ節転移を予測し得るマーカー遺伝子として*MTUS1*を同定した。*MTUS1*は8p22上にクラスターを形成し腫瘍抑制遺伝子の一つと考えられており、有糸分裂の際の中心体の局在や細胞骨格形成に重要な役割を果たしている¹¹⁾¹²⁾。これまでに*MTUS1*が大腸癌¹³⁾、卵巣癌¹⁴⁾、膵臓癌¹⁵⁾、頭頸部癌¹⁶⁾の原発巣で低発現していることが報

告されており、*MTUS1*のsplice variantである*ATIP3*(angiotensin II receptor 2-interacting protein 3)の低発現が遠隔転移再発に重要な役割を果たすことが報告された⁷⁾。しかしこれまで*MTUS1*の大腸癌領域でのリンパ節転移について考察された報告はない。今回、我々は大腸癌患者172例のvalidation setの原発巣において*MTUS1*のゲノム欠失と低発現している症例では、有意にリンパ節転移が起こることを確認した($p = 0.0406$)。*MTUS1/ATIP3*は細胞内の微小管が細胞表面に移動することを抑制する働きを持ち、癌細胞においてその発現は運動性と遠隔転移を抑制している。*MTUS1/ATIP3*低発現の症例においては、その抑制がないことから遠隔転移が多く予後不良となることが乳癌領域で報告され、大腸癌でも同様のことが生じていることが示唆された。今回、大腸癌での*MTUS1*発現とリンパ節転移に有意な相関を見出し、腫瘍部の*MTUS1*発現からリンパ節転移の存在を予測可能であることから、*MTUS1*は内視鏡的切除や外科的切除についての治療方針適応をきめる上で重要なマーカーとなることが期待される。

参 考 文 献

- 1) Bipat, S, Glas AS, Slors FJ, Zwinderman AH, Bossuyt PM and Stoker J : Rectal Cancer : Local Staging and Assessment of Lymph Node Involvement with Endoluminal US, CT, and MR Imaging-A Meta-Analysis I. *Radiology* 232 : 773-783, 2004.
- 2) Heriot A : Grundy A and Kumar D : Preoperative staging of rectal carcinoma. *British Journal of Surgery* 86 : 17-28, 1999.
- 3) Shin SS, Jeong YY, Min JJ, Kim HR, Chung TW and Kang HK : Preoperative staging of colorectal cancer : CT vs. integrated FDG PET/CT. *Abdominal imaging* 33 : 270-277, 2008.
- 4) Molina A, Velot L, Ghouinem L, Abdelkarim M, Bouchet BP, Luissint AC, Bouhleb I, Morel M, Sapharikas E, Di Tommaso A, Honoré S, Braguer D, Gruel N, Vincent-Salomon A, Delattre O, Sigal-Zafrani B, André F, Terris B, Akhmanova A, Di Benedetto M, Nahmias C and Rodrigues-Ferreira S : ATIP3, a novel prognostic marker of breast cancer patient survival, limits cancer cell migration and slows metastatic progression by regulating microtubule dynamics. *Cancer research* 73 : 2905-2915, 2013.

- 5) Weber-Mangal S, Sinn HP, Popp S, Klaes R, Emig R, Bentz M, Mansmann U, Bastert G, Bartram C and Jauch A : Breast cancer in young women (≤ 35 years) : genomic aberrations detected by comparative genomic hybridization. *International journal of cancer* 107 : 583-592, 2003.
- 6) Knösel T, Schlüns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M and Petersen I : Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia* (New York, NY) 6 : 23, 2004.
- 7) Rodrigues-Ferreira S, Di Tommaso A, Dimitrov A, Cazaubon S, Gruel N, Colasson H, Nicolas A, Chaverot N, Molinié V, Reyat F, Terris B, Delattre O. et al. 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PloS one* 4 : e7239, 2009.
- 8) 大腸癌研究会. 大腸癌治療ガイドライン 金原出版株式会社 2010.
- 9) Tanaka S, Haruma K, Oh-E H, Nagata S, Hirota Y, Furudoi A, Amioka T, Kitadai Y, Yoshihara M and Shimamoto F : Conditions of curability after endoscopic resection for colorectal carcinoma with submucosally massive invasion. *Oncology reports* 7 : 783-791, 2000.
- 10) Morlevat F, Roinot P, Lizard-Nacol S, Brunet-Lecomte P and Lizard G : Quantification of protein p53 expression by image analysis in 58 cases of colon carcinoma. Study of correlations between sex, age, histology, Dukes stage, DNA content and lymph node invasion]. *Archives d'anatomie et de cytologie pathologiques* 45 : 13, 1997.
- 11) Di Benedetto M, Bièche I, Deshayes F, Vacher S, Nouet S, Collura V, Seitz I, Louis S, Pineau P, Amsellem-Ouazana D, Couraud PO, Strosberg AD, Stoppa-Lyonnet D, Lidereau R and Nahmias C : Structural organization and expression of human MTUS1, a candidate 8p22 tumor suppressor gene encoding a family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins, ATIP. *Gene* 380 : 127-136, 2006.
- 12) Rodrigues-Ferreira S and Nahmias C : An ATIPical family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21 : 684-690, 2010.
- 13) Loo LW, Tiirikainen M, Cheng I, Lum-Jones A, Seifried A, Church JM, Gryfe R, Weisenberger DJ, Lindor NM, Gallinger S, Haile RW, Duggan DJ, Thibodeau SN, Casey G and Le Marchand L : Integrated analysis of genome-wide copy number alterations and gene expression in microsatellite stable, CpG island methylator phenotype-negative colon cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2013.
- 14) Pils D, Horak P, Gleiss A, Sax C, Fabjani G, Moebus V, Zielinski C, Reinhaller A, Zeillinger R and Krainer M : Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma. *Cancer* 104 : 2417-2429, 2005.
- 15) Seibold S, Rudroff C, Weber M, Galle J, Wanner C and Marx M : Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21. 3-22. *The FASEB journal* 17 : 1180-1182, 2003.
- 16) Ye H, Pungpravat N, Huang BL, Muzio LL, Mariggio MA, Chen Z, Wong DT and Zhou X : Genomic assessments of the frequent loss of heterozygosity region on 8p21. 3-p22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics* 176 : 100-106, 2007.

(Received for publication October 16, 2013)