

平成 30 年度医学研究助成 報告書

2021 年 5 月 13 日

公益財団法人中国労働衛生協会

理事長 宮田 明 殿

1. 申請者

氏 名	楠本 智章 
ふりがな	くすもと ちあき 年齢 (43 歳)
所属機関	広島国際大学 保健医療学部 医療技術学科
所在地	〒739-2695 広島県東広島市黒瀬学園台 555-36
役 職	教授
電話番号	0823-70-4594
E-mail	kusumoto@hirokoku-u.ac.jp

2. 共同研究者

氏 名	所 属 機 関	役 職	研究分担事項
中山 寛尚	広島国際大学 保健医療学部 医療技術学科	講師	分子生物学的実験担当
沖本 隆司	日本鋼管福山病院 外科	外科医師	患者への IC 取得 臨床検体採取

3. 研究主題名

軸索誘導因子を用いる新規大腸癌バイオマーカーの開発と応用

4. 研究成果

大腸癌診療では、一般的に血清中の CEA や CA19-9 などの腫瘍マーカーを用いる。しかし、これらのマーカーは良性腫瘍の場合にも数値が上昇すること、あるいは癌が存在したとしても必ずしも上昇することがないため、これらのマーカーだけでは癌の存在診断を行うには不十分である。

我々はこれまでに、大腸癌の新たな血清バイオマーカーの探索と開発を行ってきた。我々が着目している軸索誘導因子（リガンドおよびそのレセプター群）は、元々は神経軸索の伸長や方向性を規定する分子として同定された。しかし、近年では腫瘍細胞の増殖・遊走・転移、血管新生制御、免疫応答など多岐に渡る機能があることが分かってきた。特に我々の研究グループでは、軸索誘導因子 netrin-1 とそのレセプターによるシグナルが脳腫瘍および小児髄芽腫の増殖、転移、血管新生、免疫応答を惹起するため、netrin-1 が『癌微小環境制御因子』であること示し、新たな治療標的としての可能性を提唱している（Nakayama H, Kusumoto C, et al. *Front Physiol.*, 2018）。そこで私はこのコンセプトを基にして、中山講師と日本鋼管福山病院の協力の下、大腸癌における netrin-1 シグナルの役割を解明するため研究を開始した（倫理委員会にて当該研究の承認済）。大腸癌細胞は非常に細胞遊走・浸潤能が高く、血管新生を強力に誘導する。臨床的にも進行大腸癌では肺、肝臓、リンパ節などに転移巣を形成しやすい。このため、大腸癌の進展に netrin-1 シグナルが影響していると考えた。そこで、大腸癌患者血清を用いて netrin-1 と腫瘍血管新生に重要な VEGF-A（Bevacizumab の標的分子）濃度を ELISA 法にて測定した。その結果、血清 VEGF-A は既報（Werther K, et al. *Br J Cancer.* 2002）のとおり大腸癌患者群で有意に上昇していたが、血清 netrin-1 は逆に低下していることが明らかとなった（図 1）。

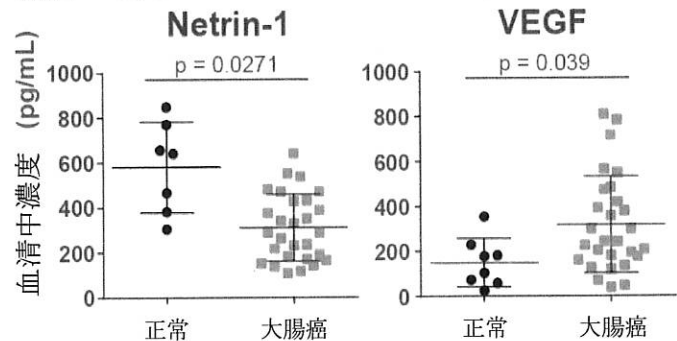


図 1：大腸癌患者における血清 Netrin-1, VEGF 濃度測定
大腸癌 (n=29) と健康被検者 (n=7-8) における血清中濃度を ELISA 法にて測定した。

さらに大腸癌細胞株および大腸癌患者の組織片における netrin-1 遺伝子発現解析を行ったところ、大腸癌では netrin-1 の遺伝子発現が強く抑制されていることが明らかとなった。これは、脳腫瘍や髄芽腫のように発現が上昇する結果とは全く異なっていた（図 2 A,B）。また、大腸癌の分子発生機序として、DNA のメチル化による癌抑制遺伝子の不活化が知られているが、大腸癌細胞株にメチル化阻害剤（5AzaD）を処理したところ netrin-1 遺伝子発現が上昇した（図 2 C）。

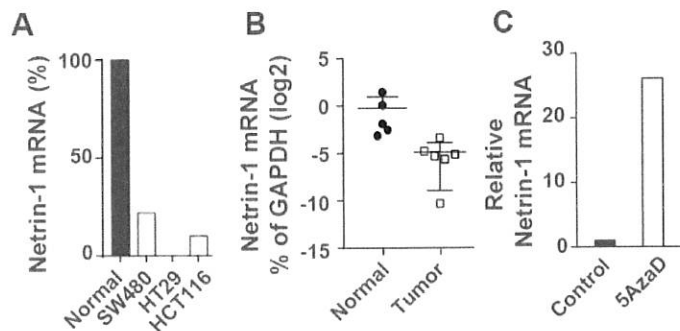


図 2：大腸癌細胞における netrin-1 遺伝子発現解析

A：正常腸管上皮細胞と大腸癌細胞株 3 種における遺伝子発現を比較検討した。B：大腸癌患者癌部 (n=6)、非癌部 (n=5) における遺伝子発現を比較検討した。C：HT29 細胞にメチル化阻害剤 (5AzaD, 10 mM) を 3 日間処理した後、遺伝子解析を行った。

よって、netrin-1 遺伝子領域が高頻度にメチル化されている可能性が示唆された。つまり、大腸癌では他の癌では見られない特異的な netrin-1 発現制御システムが存在していることが示唆された。正常腸管組織において netrin-1 は腸陰窩 crypt 周辺に発現し、幹細胞の増殖と分化を促すと考えられているが、上記の結果、netrin-1 の発現変化こそが大腸癌発生機序、または大腸癌の進展に重要な意味を持つのではないかと考えられた。現在も本研究は継続しており、今後は以下の3点を『核心的な問い』と設定し研究を遂行する予定である(図3)。

- (Q1) Netrin-1は大腸癌の多段階発癌のどの過程で発現低下していくのか。
- (Q2) Netrin-1低下メカニズムは何か。
- (Q3) 大腸癌における netrin-1 シグナルの意味(役割)は何か。

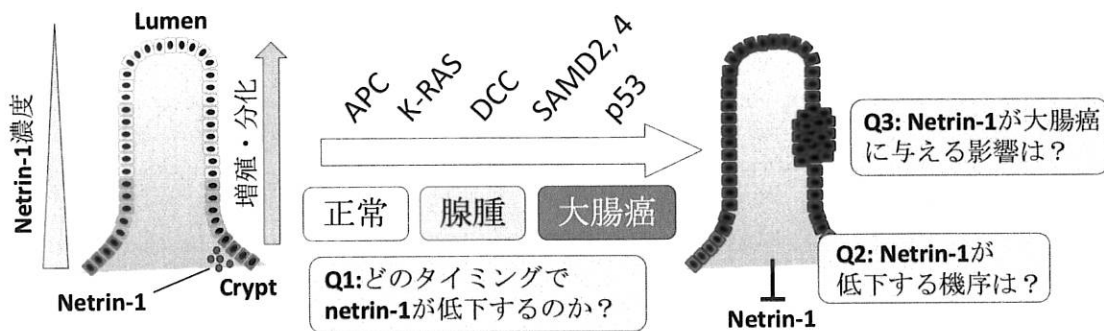


図3: 本研究における重要な問い

正常組織ではnetrin-1は腸管上皮細胞の増殖・分化に重要と考えられているが、大腸癌における役割は未知である。これらの問いを解明し、netrin-1が大腸癌治療標的・診断マーカーとして有用かどうか明らかにしたい。

本研究では、上記の3点の問いを解明することによって大腸癌における netrin-1 の役割を明らかにし、netrin-1 を標的とした新たな大腸癌診断法開発のための基礎的データを取得する。その成果を基に、発展的研究として netrin-1 シグナルを制御・適正化するための方法を開発し、新たな大腸癌治療法の開発を目指すことを最終目的とする。

上記データおよびこれまでの研究成果に関しては今年度中に学会発表および論文報告を予定している。2021年5月現在、基礎データは揃いつつあり、実験の継続と並行して発表の準備も行っている。

5. 研究報告(当協会からの助成に関わる口頭発表、紙上発表等)

【口頭発表】

1. 大腸癌細胞における軸索誘導因子 netrin-1 遺伝子発現解析

山下秀和, 楠本智章, 沖本隆司, 中原正子, 藤原 章, 中山寛尚

第13回日本臨床検査学教育学会学術大会, 札幌, 2018

【紙上発表】

無し

6. 助成金の使途

項 目	金額 (千円)	内 容 ・ 内 訳
材 料 費	0	
機械器具費	621	サーマルサイクラー (PCR 装置)
	226	解析用ノートパソコン (MacBook pro)
会 議 費	15	日本消化器関連学会週間会費
旅 費	38	日本消化器関連学会週間参加
アルバイト謝金	0	
そ の 他	100	事務的諸経費
合 計	1000	