

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10132

研究課題名(和文) miRNA発現変化を介した消化器悪性腫瘍肝転移機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of liver metastasis via alteration of miRNA expression in gastrointestinal malignancies

研究代表者

菊池 寛利 (Kikuchi, Hirotoshi)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70397389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌および消化管間質腫瘍(GIST)の腫瘍細胞やその周囲の間質におけるマイクロRNA(miRNA)発現の変化を測定し、肝転移の形成機序に関する解析を行った。大腸癌では、腫瘍周囲間質におけるmiR-198の発現低下に伴うtenascin C蛋白の発現亢進が肝転移形成に関与していることが明らかとなり、原発巣の間質におけるtenascin Cの発現強度が肝転移の新規予測マーカーとして同定された。GISTでは、原発巣におけるmiR-122の発現上昇に伴うCAT1蛋白の発現低下や、miR-133bの発現低下に伴うfascin-1蛋白の発現低下が肝転移に関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To identify mechanisms of liver metastasis, microRNA expression was analyzed in colorectal cancer (CRC) stroma and gastrointestinal stromal tumors (GISTs). In CRC, suppression of miR-198 in tumor stroma appears to form a metastasis-permissive environment that can elevate tenascin C to promote liver metastasis. Tenascin C expression in CRC stroma was identified as a novel molecular marker of CRC to predict postoperative liver metastasis. In GIST, overexpression of miR-122 and concomitant suppression of CAT1, and suppression of miR-133b and concomitant overexpression of fascin-1 protein appear to play important roles in the development of liver metastasis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：マイクロRNA 肝転移 腫瘍間質 微小環境 tenascin C

1. 研究開始当初の背景

近年の集学的治療の進歩により消化器がんの治療成績は向上したが、その克服にはさらなる基礎的研究が必要である。固形がんによる死亡は転移が原因となる事が多く、消化器がんの制圧には転移巣の制御が極めて重要である。特に消化器がんで多く見られる肝転移は死亡率低下に向け克服すべき重要な課題である。近年の抗癌剤や分子標的療法剤の開発により転移再発後の治療成績は飛躍的に向上し、外科手術を含めた集学的治療が新たなステージを迎えようとしている。しかしながら未だ肝転移は致死的な病態であり、その克服には既存の抗癌剤や分子標的薬のみでは不十分で、転移メカニズムの基礎的研究に基づいた新規治療標的の開発が必要である。

microRNA (miRNA)は18~25塩基で構成される低分子量 non-coding RNA であり、自身の配列と相補的な配列を有する標的 mRNA に結合し、翻訳抑制や mRNA の分解を促進し遺伝子発現を負に制御する。miRNA は細胞の増殖・分化・apoptosis を制御し、miRNA の発現異常が悪性腫瘍を含むヒトの様々な疾患の発症に関与しており、消化管悪性腫瘍においても発癌や悪性化過程への関与が報告されているが、肝転移過程における miRNA の役割はほとんど解析されていない。

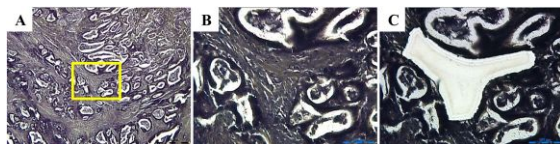
2. 研究の目的

大腸癌の腫瘍周囲間質および消化管間質腫瘍(GIST)の腫瘍細胞における miRNA 発現を解析し、肝転移形成に関与する miRNA やその標的遺伝子を同定する。臨床検体の解析に加え、培養細胞を用いた *in vitro* 解析やヒト大腸癌固形腫瘍マウス移植モデルを用いた *in vivo* 解析を行い、大腸癌および GIST の肝転移抑制を目的とした新規治療標的の同定を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌周囲間質における miRNA 発現変化を介した肝転移機構の解析

1) miRNA array: 浜松医科大学附属病院で過去15年間に切除された前治療歴のない大腸癌16症例(肝転移無し8例、異時性肝転移再発4例、同時性肝転移4例)のホルマリン固定組織標本から laser capture microdissection 法にて腫瘍間質組織を採取し、total RNA を抽出。



TaqMan miRNA Array にて miRNA 発現を測定し、miRNA 発現パターンと肝転移の有無の関係を解析した。

2) 免疫組織化学染色: 前治療歴のない原発性大腸癌139例のホルマリン固定組織標本を抗ヒト tenascin C モノクローナル抗体を用いて染色した。

3) 細胞実験: ヒト大腸癌細胞株(SW620)およびヒト大腸線維芽細胞株(CCD18-Co)をヒト miRNA-198 mimic または miR-198 inhibitor で処理し、細胞から蛋白を抽出して tenascin C 蛋白の発現量を Western blotting にて定量し、 α -tubulin 蛋白の発現量で規格化した。定量 RT-PCR (qPCR): SW620 細胞および CCD18-Co 細胞から RNA を抽出して tenascin C mRNA 発現を定量し、GAPDH mRNA で規格化した。

(2) GIST における miRNA 発現変化を介した肝転移機構の解析

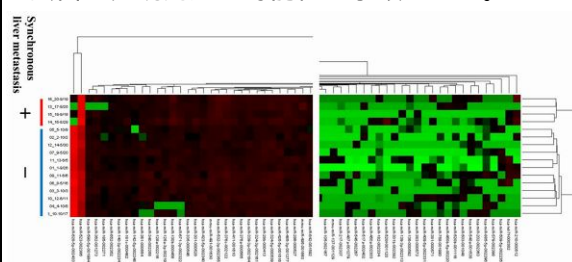
1) miRNA array: イマチニブ治療歴のない胃 GIST 原発巣10例(低リスク5例、高リスク5例)および肝転移巣6例の切除検体のホルマリン固定組織標本から腫瘍組織を採取し RNA を抽出。miRNA array を用いて miRNA 発現を比較検討した。

2) 免疫組織化学染色: GIST の原発巣と肝転移巣における cationic amino acid transporter 1(CAT1)および fascin-1 蛋白発現を免疫染色で評価した。

4. 研究成果

(1) 大腸癌周囲間質における miRNA 発現変化を介した肝転移機構の解析

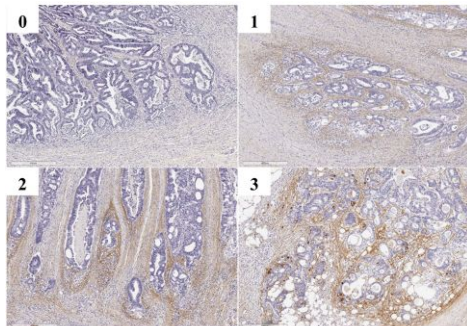
miRNA 発現のクラスタリング解析で、同時性肝転移あり群となし群(術後肝転移再発+無肝転移再発)の2群に分類された。同時性肝転移あり群で有意に発現が高い miRNA が2個であるのに対し、14個の miRNA が有意に低下しており、miRNA 発現低下に伴う転移関連蛋白の発現亢進の可能性が示唆された。



Upregulated			Downregulated		
MiRNAs	Fold change	P-value	MiRNAs	Fold change	P-value
hsa-miR-29c	954.4	0.0381 ^a	hsa-miR-302a	0	0.0053 ^b
has-miR-195	3.07	0.0071 ^b	hsa-miR-551b	0	0.0013 ^b
			hsa-miR-627	0	0.0379 ^a
			hsa-miR-628-5p	0	0.011 ^a
			hsa-miR-19a	2.00E-04	0.0374 ^a
			hsa-miR-372	2.00E-04	0.0053 ^b
			hsa-miR-302b	0.0038	0.0071 ^b
			hsa-miR-384	0.0064	0.0337 ^a
			hsa-miR-198	0.0077	0.0277 ^a
			hsa-miR-323-3p	0.0255	0.0126 ^a
			hsa-miR-15a	0.0626	0.011 ^a
			hsa-miR-28-3p	0.1836	0.0071 ^b
			hsa-miR-126	0.2731	0.0098 ^b
			hsa-miR-222	0.2782	0.0071 ^b

Abbreviation: MiRNA = microRNA.
^aP < 0.05.
^bP < 0.01.

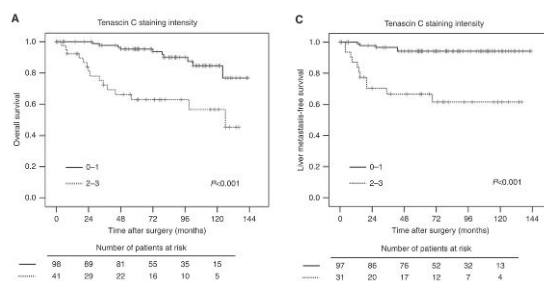
14 個の miRNA 中 10 個をオンラインソフトウェア miRDB で解析し、miR-198 の抑制的標的遺伝子候補として tenascin C を同定した。前治療歴のない大腸癌 139 例の原発巣の間質における tenascin C 蛋白の発現強度と発現範囲を免疫染色にて評価したところ、tenascin C 発現強度と同時性肝転移の有無に有意な相関を認めた ($P < 0.001$)。



Variables	Synchronous liver metastasis		P-value
	+	-	
Age			
≥70	4	57	0.600
<70	7	71	
Sex			
Male	6	76	0.755
Female	5	52	
Lesion			
C-T	3	39	0.975
D-S	4	45	
Rectum	4	44	
Depth			
T1	0	3	0.215
T2	0	21	
T3	6	76	
T4	5	28	
Lymph node metastasis			
-	2	73	0.013 [†]
+	9	55	
Differentiation			
tub1	4	81	0.098
tub2	7	41	
mac_por	0	6	
Lymphatic invasion			
-	1	37	0.157
+	10	91	
Venous invasion			
-	1	59	0.017 [†]
+	10	69	
Stage			
I	0	27	<0.001 ^{††}
II	0	45	
III	0	51	
IV	11	5	
Tenascin C staining intensity			
Negative (0)	1	44	<0.001 ^{††}
Low (1)	0	53	
Intermediate (2)	3	19	
High (3)	7	12	
Tenascin C staining relativity			
<30%	2	53	0.264
31-69%	3	32	
≥70%	6	43	

Abbreviations: C = cecum; D = descending colon; mac = mucinous adenocarcinoma; T = transverse colon; S = sigmoid colon; tub1 = well differentiated adenocarcinoma; tub2 = moderately differentiated adenocarcinoma; por = poorly differentiated adenocarcinoma.
[†] $p < 0.05$, ^{††} $p < 0.001$.

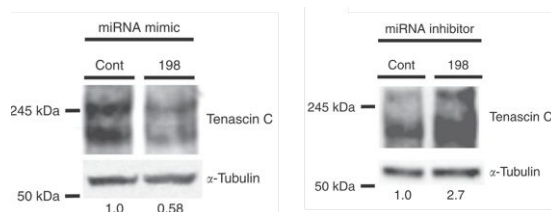
原発性大腸癌 139 例の検討において、原発巣の間質における tenascin C 発現強度が高い群で有意に予後が不良であり、同時性肝転移のない 128 例の検討では、原発巣間質における tenascin C 発現強度が高い群で有意に術後無肝転移再発期間が短かった。



Cox 比例ハザード解析にて術後全生存率、術後無肝転移再発共に、tenascin C 発現強度が独立予後不良因子として同定された (hazard ratio: 3.41, 6.02; 95% confidence interval: 1.45- 8.07, 2.04- 17.86; $P = 0.005$, $P = 0.001$)。

原発巣 139 例と肝転移巣 83 例を比較すると、化学療法の有無に関わらず原発巣に比べて肝転移巣の腫瘍間質で tenascin C 発現が高強度かつ広範囲であった。

これまでに miR-198 と tenascin C の関連に関する報告はないため、解析を行った。miRNA array に用いた 16 症例を解析したところ、miR-198 が検出感度以下の症例の間質で tenascin C 発現が強い傾向を認めた。SW620 と CCD18-Co を用いた解析にて、miR-198 mimic 処理による tenascin C 発現の抑制および miR-198 inhibitor による tenascin C 発現亢進を確認した。



以上より、大腸癌原発巣間質における miR-198 の発現低下に伴う tenascin C 蛋白の発現亢進が、癌微小環境の変化を介した肝転移形成に関与していると考えられた。大腸癌原発巣間質における tenascin C の発現強度が肝転移の新規予測マーカーとして同定された。

(2) GIST における miRNA 発現変化を介した肝転移機構の解析

原発巣と比較して肝転移巣で発現が最も高い miRNA は miR-122 であった。われわれの大腸癌における過去の検討でも miR-122 は肝転移巣で最も発現の高い miRNA として同定されており、がん種を越えて肝転移機構に関与している可能性が示唆された。miR-122 の代表的な抑制標的である CAT1 の免疫組織化学染色を施行したところ、原発巣に比し肝転移巣において CAT1 発現が有意に低かった。また、GIST 原発巣 60 例の検討で CAT1 発現強度は核分裂像、ki67 labeling index および同時性肝転移の有無と有意に逆相関していた。

一方、肝転移巣で有意に発現が低下していた miRNA として、miR-133b が同定された。miR-133b は過去の報告で悪性度の高い GIST で発現が低下し、抑制的ターゲットの fascin-1 発現が有意に亢進していることが知られている。今回の検討にて、原発巣に比べ肝転移巣で有意に fascin-1 蛋白の発現亢進を認めた。

以上より、GIST の原発巣における miR-122 の発現上昇に伴う CAT1 低下や、miR-133b の発現低下に伴う fascin-1 低下が、肝転移に関与している可能性が示唆された。

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 1 件)

Murakami T, Kikuchi H, Ishimatsu H, Iino I, Hirotsu A, Matsumoto T, Ozaki Y, Kawabata T, Hiramatsu Y, Ohta M, Kamiya K, Fukushima M, Baba S, Kitagawa K, Kitagawa M, Konno H: Tenascin C in colorectal cancer stroma is a predictive marker for liver metastasis and is a potent target of miR-198 as identified by microRNA analysis. Br J Cancer. 117(9):1360- 1370, 2-17. doi: 10.1038/bjc.2017.291.

〔学会発表〕(計 15 件)

発表年月: 2015 年 10 月

発表者: 菊池寛利、宮崎真一郎、他

発表演題: 消化管間質腫瘍における肝転移再発の予測マーカー・治療標的の探索
学会等名: JDDW2015

発表年月: 2016 年 3 月

発表者: Kikuchi H, Iino I, et al.

発表演題: Differential miRNA expressions between gastric and metastatic liver gastrointestinal stromal tumors
学会等名: 69th Society of Surgical Oncology Annual Cancer Symposium

発表年月: 2016 年 7 月

発表者: 菊池寛利、村上智洋、他

発表演題: 消化管間質腫瘍の悪性化機序の解明と新規治療標的の探索
学会等名: 第 71 回日本消化器外科学会総会

発表年月: 2016 年 7 月

発表者: 菊池寛利、村上智洋、他

発表演題: 大腸癌の周囲間質における miRNA 発現変化を介した肝転移機構
学会等名: 第 25 回日本がん転移学会総会

発表年月: 2016 年 9 月

発表者: 菊池寛利、廣津周、他

発表演題: 胃 GIST の肝転移におけるマイクロ RNA 発現変化の解析
学会等名: 第 27 回日本消化器癌発生学会総会

発表年月: 2016 年 11 月

発表者: 菊池寛利、坂口孝宣、他

発表演題: 消化器悪性腫瘍の肝転移におけるマイクロ RNA の関与
学会等名: JDDW2016

発表年月: 2017 年 4 月

発表者: Murakami T, Kikuchi H et al.

発表演題: MicroRNA expression analysis in the tumor stroma predicts Tenascin C to promote colorectal liver metastasis

学会等名: American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017

発表年月: 2017 年 4 月

発表者: 村上智洋、菊池寛利、他

発表演題: 大腸癌周囲の間質で変化する miRNA の標的遺伝子 Tenascin C は肝転移を促進している

学会等名: 第 117 回日本外科学会定期学術集会

発表年月: 2017 年 7 月

発表者: 村上智洋、菊池寛利、他

発表演題: 大腸癌周囲の間質における miRNA 発現変化と Tenascin C 発現亢進は肝転移形成に関与する

学会等名: 第 72 回日本消化器外科学会総会

発表年月: 2017 年 7 月

発表者: 菊池寛利、村上智洋、他

発表演題: 大腸癌の周囲間質における miRNA 発現変化と tenascin C 発現亢進を介した肝転移機構

学会等名: 第 26 回日本がん転移学会総会

発表年月: 2017 年 9 月

発表者: 村上智洋、菊池寛利、他

発表演題: 大腸癌周囲間質のマイクロ RNA アレイ解析によって同定された Tenascin C は肝転移の予測因子である

学会等名: 第 76 回日本癌学会学術総会

発表年月: 2017 年 10 月

発表者: 村上智洋、菊池寛利、他

発表演題: 大腸癌周囲の間質で変化する miRNA の標的遺伝子 Tenascin C は肝転移を促進している

学会等名: JDDW2017

発表年月: 2017 年 11 月

発表者: 菊池寛利、村上智洋、他

発表演題: Alteration of miRNAs and concomitant overexpression of tenascin C in colorectal cancer stroma promote liver metastasis

学会等名: 第 28 回日本消化器癌発生学会総会

発表年月: 2017 年 4 月

発表者: Murakami T, Kikuchi H, et al.

発表演題: Tenascin C in colorectal cancer stroma is a predictive marker for liver metastasis and is a potent target of miR-198 as identified by microRNA analysis

学会等名：American Association for
Cancer Research Annual Meeting 2018

発表年月：2018年4月
発表者：村上智洋、菊池寛利、他
発表演題：大腸癌間質で低下するmiR-198
は標的遺伝子 tenascin C の発現を亢進し
肝転移を促進している
学会等名：第118回日本外科学会定期学
術集会

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 寛利 (Kikuchi, Hirotochi)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70397389

(2) 研究分担者

今野 弘之 (Konno, Hiroyuki)
浜松医科大学・学長
研究者番号：00138033

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

村上 智洋 (Murakami, Tomohiro)
浜松医科大学・大学院生

石松 久人 (Ishimatsu, Hisato)

浜松医科大学・大学院生

馬場 聡 (Baba, Satoshi)
浜松医科大学・医学部附属病院・病院教授

北川 雅敏 (Kitagawa, Masatoshi)
浜松医科大学・医学部・教授

北川 恭子 (Kitagawa, Kyoko)
浜松医科大学・医学部・助教