

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07015

研究課題名(和文)内胚葉発生プロセスからみた原発性肝癌における上皮間葉転換メカニズムの解明

研究課題名(英文)The molecular mechanisms of epithelial to mesenchymal transition of primary gastrointestinal tumor from the point of view of endodermal embryology

研究代表者

石川 大地 (ISHIKAWA, Daichi)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：70633882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：消化器癌の悪性度増悪過程において初期内胚葉発生に關与するmicroRNAが果たす役割につき研究を行った。胆管癌切除例32例、及び大腸癌切除例72例の癌部miR-1263及びmiR-449aの発現を測定し臨床病理学的因子との関連を検討した。miR-1263発現は極めて少量であり比較検討は困難であった。大腸癌症例miR-449a発現は大腸癌において癌悪性度と逆相関の関係にあり、miR-449a低発現群では術後生存期間が不良であった。また標的遺伝子としてHDAC1が重要である可能性を見出した。miR-449aは内胚葉由来消化器癌の中でも大腸癌抗腫瘍因子として機能する可能性が考えられた。

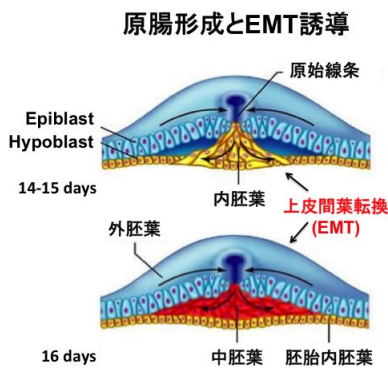
研究成果の概要(英文)：The significance of endoderm-related microRNA was investigated in gastrointestinal tumors. Using the surgically resected specimens (Cholangiocellular carcinoma: n=32, Colorectal cancer: n=72), expressions of miR-1263 and miR-449a were analyzed and correlation to clinicopathological factors was examined. miR-1263 was barely detected and there was no significant difference in the samples. miR-449a was expressed lower in the more malignant colorectal cancer. The patients with lower expression of miR-449a had worse prognosis after surgery. Furthermore, HDAC1 was inversely correlated with miR-449a expression and could be the important target gene of miR-449a. miR-449a might be tumor-suppressor gene for the tumor generated from endodermal organ, especially for colorectal cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：上皮間葉転換 原発性肝癌 microRNA

1. 研究開始当初の背景

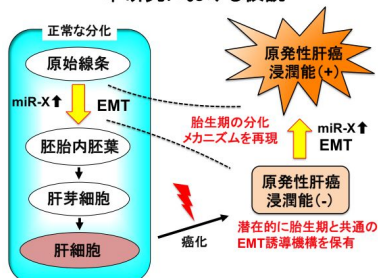
消化器癌の中でも特に肝内多発例、遠隔転移例は予後不良であり化学療法を含めて効果的な治療に乏しい。原発性肝癌とその由来である内胚葉は進展・分化の過程で共通して EMT を獲得することから、発生学の観点で得られた初期内胚葉分化における新しい microRNA の知見を癌研究に応用することは有用であると考えられ、今回、miR-1263, miR-449a により制御される内胚葉分化過程での EMT 獲得メカニズムが、潜在的に癌細胞に備わっており内胚葉由来である原発性肝癌の EMT 獲得の際に再現されるという仮説の下、新たな microRNA を介した新たな癌進展メカニズムの解明ならびに新規治療戦略を確立する目的で本研究を立案した。



2. 研究の目的

今回、初期内胚葉の発生プロセスという新しい視点から癌進展機序を解明することを主な目的とする。成熟癌細胞そのものは転移し易い状態になく上皮間葉転換 (Epithelial to mesenchymal transition: EMT) により浸潤能を獲得するが、EMT は癌進展時のみでなく個体発生時の様々な段階で観られ、特に原腸形成期において強力に EMT が誘導される際に内胚葉、中胚葉、外胚葉への分化という非常に重大な運命決定がなされる。癌は EMT によって、より幼弱な細胞へと脱分化することから、肝癌において初期内胚葉への分化に重要な役割を担う miRNA による EMT 誘導の制御機構を解明し癌進展の防止、治療不能進行癌を治療することを研究目的とする。

本研究における仮説



3. 研究の方法

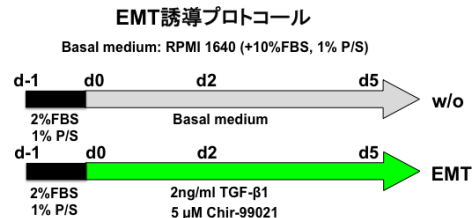
EMT 誘導時における microRNA の発現パターンの解析

(1) EMT 誘導プロトコルの確立および細胞分画の同定とセルソーターを用いた細胞分取

肝細胞癌細胞株: HepG2, Huh7、胆管癌細胞株: HuCCT1 を使用 (*in vitro*)。6-well dish (4×10^5 個/well) に細胞を播種 (day-1)、24 時間低栄養状態 (2%FBS) でプレイング。EMT は TGF- β signal、canonical Wnt signal (Chir-99021) で誘導。コントロール (w/o): Basal medium (10%FBS+1%P/S) EMT 誘導群: TGF- β 1 (2ng/ml)、Chir-99021 (5uM) を添加 EMT 誘導効率不良の場合は TGF- β を 10ng/ml まで、Chir99021 を 10uM まで増量する。Day2 および Day5 に各細胞を回収し EMT 誘導を確認。

解析項目: 細胞の形態、免疫細胞染色 (E-cadherin, Vimentin, Fibronectin)、RT-PCR (Twist1, Snail1, ZEB1)、遊走・浸潤アッセイ (boyden chamber)

表面抗原 (EpCAM, NCAM, CD24) の発現様式を Flow cytometry により解析し EMT 獲得細胞と非獲得細胞の分画を同定。また、各分画をセルソーター (FACSaria, BD Biosciences) にて分取。



(2) EMT 獲得細胞における miR の発現解析

セルソーターで分取した EMT 獲得細胞と非獲得細胞の各分画における miR 発現を測定 (RT-PCR)、EMT 関連因子 (E-cadherin, Twist1, Snail) 発現との相関を評価する。

day0 から day5 まで 24 時間毎にコントロール群、EMT 誘導群それぞれのサンプルを回収し、miR の発現動態を解析する。

miR の機能解析と標的遺伝子の同定

(1) microRNA mimic, inhibitor の EMT 誘導に対する影響を解析

(*in vitro*) EMT 誘導プロトコール day0 で miR mimic, miR inhibitor (50pmol/well) を Lipofectamine によりトランスフェクションする。細胞を day2, day5 で回収し、上記解析項目においてそれぞれの群で EMT 表現系の差を同定する。

(*in vivo*) ノードマウス脾臓に HepG2

および HuCCT1(1x10⁵ 個)を注射し、肝同所移植モデルを作成する。移植 2 日後より miR mimic あるいは miR inhibitor を invivofectamine を用いてモデルマウスに導入し 3 週間後に犠死。肝および肺を摘出し効果を解析する。

解析項目：肝での腫瘍個数、肺転移巣の個数、腫瘍径、RT-PCR(miR-1263, 449a, Twist1, Snai1)、E-cadherin 発現(免疫組織染色)

(2) miR 標的遺伝子の同定と転写制御の確認

microRNA 標的遺伝子予測システム(TargetScan, miRanda)を用いて miR の標的遺伝子の候補を抽出する。Total context++ score < -0.40(TargetScan)、miRSVR score < -1.00(miRanda)をカットオフ値とする

候補遺伝子の mRNA 発現(RT-PCR)、タンパク発現(Western blotting)を miR mimic あるいは miR inhibitor 導入細胞、非導入細胞において測定し比較検討する。

HeLa 細胞を用いて Luciferase アッセイを行い標的遺伝子の 3'UTR miR binding site への結合能と直接的な転写調節能を確認する。

臨床検体における miR-1263, miR-449a 発現の意義

胆管細胞癌 32 例、大腸癌 72 例の摘出検体を対象とする。

(1) miR の癌組織中での局在 in situ hybridization 法、in situ PCR 法により癌部組織中での miR および標的遺伝子の局在を同定する。

(2) miR 標的遺伝子の発現量と癌悪性度との関連性癌部組織の miR 発現量(RT-PCR)および標的のタンパク発現(免疫組織化学染色)を測定。臨床記録より得た臨床病理組織学的所見と比較し、miR 発現、標的遺伝子発現と癌悪性度との相関を解析する。また miR 高発現群および低発現群に分類し、群間での術後無再発生存率・全生存率を比較検討する。

4. 研究成果

消化器癌の悪性度増悪過程において初期内胚葉発生に関与する microRNA が果たす役割につき研究を行った。胆管癌切除例 32 例、及び大腸癌切除例 72 例の癌部 miR-1263 及び miR-449a の発現を測定し臨床病理学的因子との関連を検討した。miR-1263 発現は極めて少量であり比較検討は困難であった。大腸癌症例 miR-449a 発現は大腸癌において癌悪性度と逆相関の関係にあり、miR-449a 低発現群では術後生存期間が不良であった。また標的遺伝子として HDAC1 が重要である可能性を見出した。miR-449a

は内胚葉由来消化器癌の中でも大腸癌抗腫瘍因子として機能する可能性が考えられた。

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 6 件)

1. Nishi M, Shimada M, Yoshikawa K, Higashijima J, Tokunaga J, Kashiwara H, Takasu C, Ishikawa D, Wada Y, Eto S, Results of Hepatic Resection for Liver Metastasis of Gastric Cancer,

doi:10.2152/jmi.65.27

J Med Invest. 2018; 65: 27-31. (査読有)

2. Yoshimoto T, Imura S, Morine Y, Ikemoto Y, Arakawa Y, Iwahashi S, Saito YU, Takasu C, Ishikawa D, Teraoku H, Bando Y, Shimada M,

The Outcome of Sorafenib Therapy on Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Experience of Conversion and Salvage Hepatectomy, Anticancer Res.

doi:10.21873/anticancerres.12250

2018; 38: 501-507. (査読有)

3. Yoshikawa K, Shimada M, Higashijima J, Tokunaga T, Nishi M, Takasu C, Kashiwara H, Ishikawa D,

Usefulness of the Transoral Anvil Delivery System for Esophagojejunostomy After Laparoscopic Total Gastrectomy: A Single-institution Comparative Study of Transoral Anvil Delivery System and the Overlap Method.

doi: 0.1097/SLE.0000000000000495.

Surg Laparosc Endosc Percutan Tech. 2018; 28: e40-e43. (査読有)

4. Nishi M, Batsaikhan BE, Yoshikawa K, Higashijima J, Tokunaga T, Takasu C, Kashiwara H, Ishikawa D, Shimada M, High STAT4 Expression Indicates Better Disease-free Survival in Patients with Gastric Cancer,

doi:10.21873/anticancerres.12131

Anticancer Res.2017; 37: 6723-6729. (査読有)

5. Tokunaga T, Nishi M, Higashijima J, Yoshikawa K, Kashiwara H, Takasu C, Ishikawa D, Bando Y, Shimada M, Feasibility of Transanal Local Excision Following Chemoradiation for Lower Rectal Cancer.

doi:10.21873/anticancerres.11996

Anticancer Res. 2017; 37: 5617-5622. (査読有)

読有)

6. Niki M, Nakajima K, Ishikawa D, Nishida J, Ishifune C, Tsukumo SI, Shimada M, Nagahiro S, Mitamura Y, Yasutomo K. MicroRNA-449a deficiency promotes colon carcinogenesis. doi:10.1038/s41598-017-10500-0. Sci Rep.2017; 6;7(1):10696 . (査読有)

〔学会発表〕(計 6件)

1. 石川 大地、高須 千絵、柏原 秀也、徳永 卓哉、東島 潤、吉川 幸造、島田 光生、

大腸癌の発癌・腫瘍進展における microRNA-449a の役割解明、

第 51 回制癌剤適応研究会、2018 年 3 月 23 日、下呂温泉水明館 (岐阜県下呂市)

2. 石川 大地、良元 俊昭、島田 光生、吉川 幸造、東島 潤、西 正暁、柏原 秀也、高須 千絵

青色 LED 光の光受容体(opsin)を介した癌細胞増殖抑制効果の検討、

第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 日~30 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

3. Ishikawa D, Higashijima J, Takasu C, Kashihara H, Nishi M, Tokunaga T, Yoshikawa K, Shimada M,

Preoperative chemoradiotherapy for advanced lower rectal cancer using SOX+Bev regimen and role of microRNA-223 as a predictive indicator for the responder.

第 9 回日本・モンゴル国際消化器癌シンポジウム 2017 年 8 月 25 日~28 日、チンギスハーンホテル(モンゴル、ウランバートル)

4. 石川 大地、良元 俊昭、高須 千絵、柏原 秀也、東島 潤、吉川 幸造、島田 光生、

大腸癌の発癌・腫瘍進展における microRNA-449a の役割解明、第 72 回日本消化器外科学会、2017 年 7 月 20 日~22 日、ホテル日航金沢 (石川県金沢市)

5. 石川 大地、東島 潤、島田 光生、吉川 幸造、西 正暁、柏原 秀也、高須 千絵、

局所進行下部直腸癌に対する SOX+Bev レジメンによる術前化学放射線療法と効果予測因子としての miR-223 の役割、第 26 回日本癌病態治療研究会、2017 年 6 月 1 日~2 日、横浜マリントワーホール (神奈川県横浜市)

6. 石川 大地、良元 俊昭、高田 厚史、吉川 雅登、齋藤 裕、高須 千絵、岩橋 衆一、池本 哲也、居村 暁、森根 裕二、島田 光生、大腸癌の発癌・腫瘍進展にお

ける microRNA-449a の意義、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年 4 月 27 日~29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 大地 (ISHIKAWA, Daichi)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号: 70633882