

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08756

研究課題名（和文）大腸癌肝転移に関する癌細胞由来マイクロRNAの同定と制御するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Identification and elucidation of liver metastasis-associated miRNAs in primary colorectal cancer

研究代表者

徐明（XU, MING）

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：40645503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：切除不能大腸癌に対する治療はかなり改善されたが、5年生存率は10%未満といまだ不十分である。我々は治療標的となる新規分子探索のため、原発巣の間質における肝転移関連miRNAについて検討してきた。本研究では、肝転移の発生に関するmiRNAに関する知見を深めるため、原発巣の癌細胞における肝転移に関連するmiRNAを注目した。ステージII並びにIV（肝転移）大腸癌の癌細胞を採取し、ステージIV大腸癌細胞に特徴的に発現したmiRNAの網羅的解析並びにバリデーションにより、大腸癌肝転移に関連するmiRNAを同定した。更に、細胞レベルで、miRNAによる癌転移の制御機能を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は大腸癌肝転移に関する癌細胞と間質細胞間の情報伝達をより正確に検出するために、LCM法を用いて癌細胞だけを精製してmiRNAの発現を解析し、より明確に大腸癌肝転移に関わるmiRNAの同定をした。本研究により、大腸癌の肝転移について新たな治療ターゲットを開発することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Despite significant advancements in the treatment of unresectable colorectal cancer, the 5-year survival rate remains inadequate at less than 10%. To identify novel molecular targets for treatment, we have focused on investigating liver metastasis-related microRNAs (miRNAs) in the stroma of primary tumors. In this study, to enhance our understanding of miRNAs involved in liver metastasis, we identified and functionally analyzed miRNAs related to liver metastasis by examining primary tumor cancer cells. Colorectal cancer cells from Stage II and Stage IV (with liver metastasis) were collected, and miRNAs characteristically expressed in Stage IV colorectal cancer cells were comprehensively analyzed and validated to pinpoint miRNAs associated with liver metastasis in colorectal cancer. Additionally, we explored the regulatory functions of these miRNAs in cancer metastasis at both cellular and animal levels.

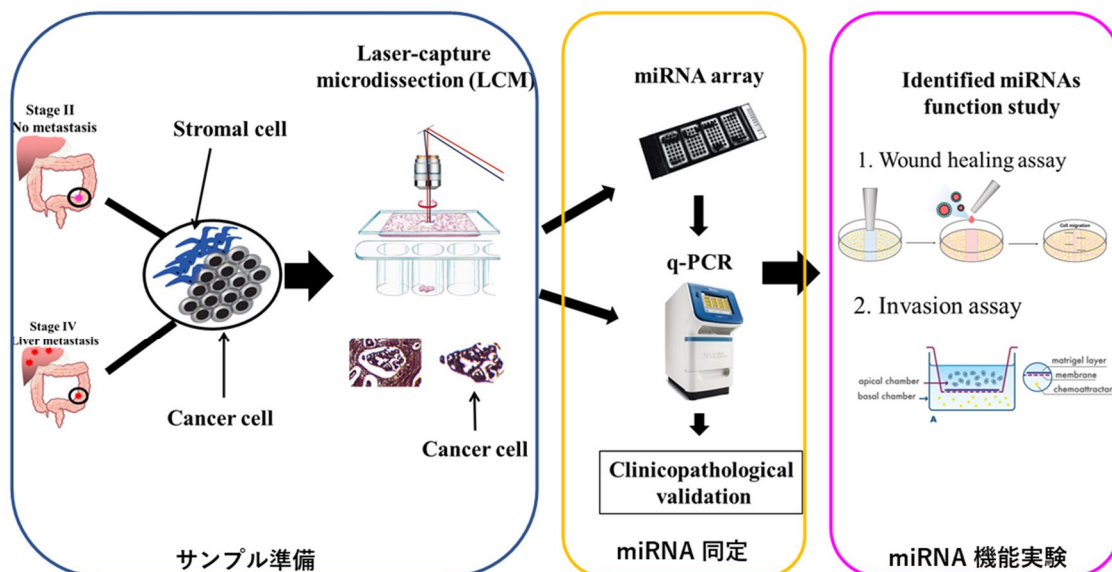
研究分野：医学

キーワード：大腸がん 肝転移 miRNA

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の発生率と死亡率は世界中で年々増加しており、人々の生活に深刻な影響を与えています。日本では、生活習慣の変化と高齢化に伴い、大腸がんの発生率はトップ3にランクされている。また、大腸癌の診断時にすでに、約25%が遠隔転移を伴い、そのうち約50%が肝転移を発症している。大腸癌の転移メカニズムは解明されておらず、根治的な治療法に乏しいため、切除不能大腸癌の5年生存率は10%未満と著しく低いのが現状である。大腸癌肝転移メカニズムの解明とそれに基づいた新規治療標的の開発が急務である。

近年、癌組織または血清中のmiRNAの発現レベルで癌の診断、悪性度の評価および術後生存期予測ができると報告されている。特に原発巣癌細胞とその周囲を取り囲む間質細胞で構成され、癌の微小環境に発現するmiRNAは、大腸癌の発生、進行および転移において重要な役割を果たすことが報告されている。癌の転移に関するmiRNA研究は多いが、原発巣を癌細胞と間質にわけ、肝転移の有無による癌細胞のmiRNA発現の相違を網羅的に解析し、miRNA発現と肝転移を結びつける報告はない。当研究室では、大腸癌の癌間質中のmiRNA221およびmiRNA222が大腸癌の肝転移と関連することを見出した。しかし、癌細胞に特化したmiRNAの発現プロファイルはまだ不明である。癌の起源である原発巣癌細胞に異常発現したmiRNAと間質miRNAとのクロストークを解明するため、原発巣癌細胞におけるmiRNAの網羅的解析が必須である。本研究は大腸癌肝転移に関与する癌細胞と間質細胞間の情報伝達をより正確に検出するために、LCM法を用いて癌細胞だけを精製してmiRNAの発現を解析する。



本研究の概要

2. 研究の目的

我々は治療標的となる新規分子探索のため、原発巣の間質における肝転移関連マイクロRNA (miRNA) について検討してきた。本研究では、肝転移の発生に関与するmiRNAに関する知見を深めるため、原発巣の癌細胞の解析から、肝転移に関連するmiRNAの同定と機能解析を行う。本研究の目的は、

- (1) LCM法によってステージII並びにIV(肝転移)大腸癌の原発巣から癌細胞を採取し、ステージIV大腸癌細胞に特徴的に発現するmiRNAの網羅的解析により異常発現したmiRNAを調べる。
- (2) 患者さんの術後サンプルを用いて、上記(1)から得た候補miRNAをq-PCRと臨床病理学因子でリレーションして大腸癌肝転移関連する新規miRNAを同定する。
- (3) 同定されたmiRNAはいかに癌細胞の浸潤や転移に作用するかを細胞レベルで検証する。
- (4) 同定したmiRNAが癌細胞の転移を制御するメカニズムを探索する。

3. 研究の方法

本研究では、原発巣の大腸癌細胞において転移と関連するmiRNAを同定する。更に同定したmiRNAと大腸癌転移の関連性を検証するため、下記の実験を行った。

- (1) LCM法を用いて大腸がんサンプルから癌細胞だけを精製した。

- (2) 肝転移の有無による原発巣大腸癌細胞の miRNA 網羅的解析により、異常発現した miRNA (Fold>2 もしくは Fold<0.5、Fisher Ratio>4) 異常発現した miRNA を調べた。
- (3) ステージ II 並びに IV (肝転移あり) 各 20 例のサンプルから癌細胞の RNA を抽出し、(2) で選ばれた miRNA の発現レベルを q-PCR でバリデーションした。
- (4) 上記(3)選ばれた miRNA の発現レベルおよび発現パターンと患者さんの臨床病理学因子の関連性を確認し、最も関連性が高い miRNA を同定した。
- (5)機能欠損と機能獲得アプローチを用いて、候補 miRNA inhibitor (機能欠損) 及び候補 miRNA mimic (機能獲得)を導入して、Wound healing assay で miRNA の癌細胞遊走御機能を調べる。新規同定された新規 miRNA ががん細胞の転移機能を阻害するかどうかを細胞レベルで検証しました。
- (6) 上記(5)遺伝子導入方法を用いて、候補 miRNA inhibitor(機能欠損)及び候補 miRNA mimic (機能獲得)を導入して浸潤 assay で miRNA の浸潤制御機能を調べる。同定した新規 miRNA が癌細胞の転移と浸潤を抑制するかを細胞レベルで検証した。

Name	Fold change	Fisher Ratio	<i>t-test</i>
			<i>p</i>
hsa-let-7f-5p	2.96921056	16.16267526	0.0001 ↑
hsa-miR-30c-5p	2.779168582	12.00470488	0.0001 ↑
hsa-miR-30b-5p	3.30211411	9.718323671	0.0003 ↓
hsa-miR-107	3.373600545	7.77523105	0.0007 ↑
hsa-miR-106b-5p	2.022709866	5.647356784	0.0021 ↑
hsa-miR-194-5p	2.274404613	5.38524171	0.0024 ↓
hsa-miR-652-5p	0.454307496	4.789753498	0.0035 ↓
RNU6B (control)			

Selection standard:

1. Fischer ratio>4; n=94
2. Fold changes>2 or <0.5; n=37
3. t-test p<0.05

ステージIV異常発現したmiRNAs

4. 研究成果

- (1) 肝転移の有無による原発巣大腸癌細胞の miRNA 網羅的解析により、異常発現した miRNA (Fold>2 もしくは Fold<0.5、Fisher Ratio>4) 37 個を得た。
- (2) 異常発現した miRNA から 7 本 miRNA を選択してステージ II 並びに IV (肝転移あり) 各 20 例のサンプルから癌細胞の RNA を抽出して、選ばれた miRNA の発現レベルを q-PCR でバリデーションした。
- (3) 上記(2)で選ばれた miRNA の発現レベルおよび発現パターンと患者さんの臨床病理学因子の関連性を確認し、最も関連性が高い miR-106b, miR-30b を同定した。
- (4)miR-30b または miR-106b を阻害すると、細胞の移動能力が低下した。miR-30b または miR-106b の mimic を導入すると、細胞の遊走を促進した。
- (5)miR-30b または miR-106b を阻害すると、細胞の浸潤能力が低下した。miR-30b または miR-106b の mimic を導入すると、細胞浸潤を促進した。

上記の結果は、原発巣癌細胞における miR-30b および miR-106b の過剰発現が大腸癌の肝転移と関連していることを示しています。この研究は、結腸直腸癌の肝転移に対する新しい治療マーカーの開発に理論的基礎を提供する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 XU MING, TSUNEDOMI RYOUICHI, KIYOTANI KAZUMA, TOMOCHIKA SHINOBU, FURUYA KEI, NAKAJIMA MASAO, MATSUI HIROTO, TOKUMITSU YUKIO, SHINDO YOSHITARO, YOSHIDA SHIN, IIDA MICHIIHISA, SUZUKI NOBUAKI, TAKEDA SHIGERU, IOKA TATSUYA, HAZAMA SHOICHI, NAGANO HIROAKI	4. 巻 43
2. 論文標題 Anti-VEGF and Anti-EGFR Antibody Therapy on T-Cell Infiltration and TCR Variation in Metastatic Colorectal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 613 ~ 620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.16197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 CHIDIMATSU HIKARI, TSUNEDOMI RYOUICHI, NAKAGAMI YUKI, XU MING, NAKAJIMA MASAO, HAZAMA SHOICHI, NAGANO HIROAKI	4. 巻 43
2. 論文標題 Serum CCL7 Is a Novel Prognostic Biomarker of Metastatic Colorectal Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 105 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.16139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ying Zhang, Qian Lu, Nan Li, Ming Xu, Tatsuo Miyamoto, Jing Liu	4. 巻 8
2. 論文標題 Sulforaphane suppresses metastasis of triple-negative breast cancer cells by targeting the RAF/MEK/ERK pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41523-022-00402-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Furuya Kei, Nakajima Masao, Tsunedomi Ryouichi, Nakagami Yuki, Xu Ming, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Tomochika Shinobu, Maeda Noriko, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Hazama Shoichi, Ioka Tatsuya, Hoshii Yoshinobu, Ueno Tomio, Nagano Hiroaki	4. 巻 24
2. 論文標題 High serum proteinase-3 levels predict poor progression-free survival and lower efficacy of bevacizumab in metastatic colorectal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 165-165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-024-11924-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 ZHENG HUANYU, TSUNEDOMI RYOUICHI, XU MING, ZHANG YING, KISHI HIROKO, KOBAYASHI SEI, TOMOCHIKA SHINOBU, NAKAJIMA MASAO, MATSUI HIROTO, TOKUMITSU YUKIO, SHINDO YOSHITARO, IIDA MICHIHISA, IOKA TATSUYA, NAGANO HIROAKI	4. 巻 44
2. 論文標題 Effect of Paxillin Expression and Phosphorylation on Colorectal Cancer Prognosis and Metastasis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 511 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.16839	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Tsunenori, Tsunedomi Ryouichi, Xu Ming, Nakagami Yuki, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Iida Michihisa, Takeda Shigeru, Hazama Shoichi, Tanabe Tsuyoshi, Ioka Tatsuya, Hoshii Yoshinobu, Kiyota Akifumi, Takizawa Hitoshi, Kawakami Yutaka, Ueno Tomio, Nagano Hiroaki	4. 巻 30
2. 論文標題 IL-6 Levels Correlate with Prognosis and Immunosuppressive Stromal Cells in Patients with Colorectal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 5267 ~ 5277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-023-13527-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Masao, Hazama Shoichi, Matsui Hiroto, Matsukuma Satoshi, Nakagami Yuki, Tamada Koji, Udaka Keiko, Sakamoto Michie, Saito Akira, Kouki Yasunari, Uematsu Toshinari, Xu Ming, Iida Michihisa, Tsunedomi Ryouichi, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Doi Shun, Nagano Hiroaki	4. 巻 53
2. 論文標題 Phase study of a novel therapeutic vaccine as perioperative treatment for patients with surgically resectable hepatocellular carcinoma: The YCP02 trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 649 ~ 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13900	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 徐明、恒富亮一、清谷一馬、友近忍、中島正夫、松井洋人、徳光幸生、新藤芳太郎、吉田晋、飯田通久、鈴木伸明、武田茂、井岡達也、碓野彰一、永野浩昭
2. 発表標題 転移性大腸癌における T 細胞浸潤および TCR 変動に対する抗 VEGF
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ming Xu, Shoichi Hazama, Michihisa Iida, Ryouichi Tsunedomi, Hiroto Matsui, Nobuaki Suzuki, Satoshi Matsukuma, Yukio Tokumitsu, Yoshitaro Shindo, Shinobu Tomochika, Yuki Nakagami, Noriko Maeda, Shin Yoshida, Shigeru Takeda, Tatsuya Ioka, Hiroaki Nagano
2. 発表標題 Identification and elucidation of liver metastasis-associated miRNAs in primary Colorectal cancer
3. 学会等名 日本癌学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 恒富亮一, 清谷一馬, 徐明, 友近忍, 中島正夫, 松井洋人, 新藤芳太郎, 徳光幸生, 渡邊裕策, 飯田通久, 鈴木伸明, 武田茂, 井岡達也, 永野浩昭
2. 発表標題 抗VEGF抗体・抗EGFR抗体治療後の大腸がん肝転移巣におけるT細胞浸潤とTCRレパトア
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ming Xu, Ryouichi Tsunedomi, Michihisa Iida, Yuki Nakagami, Hiroto Matsui, Yoshitaro Shindo, Yukio Tokumitsu, Yusaku Watanabe, Shinobu Tomochika, Masao Nakajima, Shigeru Takeda, Tatsuya Ioka, Hiroaki Nagano
2. 発表標題 Identification and elucidation of liver metastasis-associated miRNAs in primary colorectal cancer
3. 学会等名 第101回 日本生理学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中島 正夫 (Nakajima Masao) (00875487)	山口大学・医学部附属病院・診療助教 (4日/週) (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	裕 彰一 (Hazama Shoichi) (50253159)	山口大学・医学部・特別医学研究員 (15501)	
研究分担者	飯田 通久 (Iida Michihisa) (50554797)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	吉田 晋 (Yoshida Shin) (60554805)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	削除2023年3月31日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関