

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16257

研究課題名（和文）miR-449aによる癌幹細胞性・上皮間葉転換・解糖系制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）The impact of microRNA-449a on the cancer malignancy such as cancer stemness, epithelial-mesenchymal transition, and glycolysis.

研究代表者

石川 大地 (ISHIKAWA, Daichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・徳島大学専門研究員

研究者番号：70633882

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：大腸癌・胃癌の癌進展におけるmicroRNA-449a(miR-449a)の役割につき研究を行った。大腸癌では癌幹細胞遺伝子であるHDAC1が標的遺伝子であることが示唆され、miR-449a低発現群では予後が不良であった。胃癌においてはmiR-449a発現量は非癌部より癌部で低く、悪性度が高い症例ほど低発現であった。血中のmiR-449a発現は癌組織中miR-449aと相関し、分化度の低い組織型で低発現であった。大腸癌、胃癌症例においてmiR-449aはバイオマーカーとして機能しうることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miR-449aの機能・制御機構については不明であったが、今回の研究成果により標的遺伝子HDAC1が同定され、miRNA-449aが大腸癌、胃癌のバイオマーカーとして機能し、さらには術前の血液解析にて癌組織中miR-449a発現が予測可能であることが分かった。miR-449aが新たなバイオマーカーとして利用できることやmiR-449aをターゲットとした新規治療手段開発につながる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The significance of microRNA-449a (miR-449a) was investigated in colorectal cancer and gastric cancer. Using the surgically resected specimens (Colorectal cancer: n=72, Gastric cancer: n=66), expressions of miR-449a were evaluated and correlation to clinicopathological factors was examined. The expression of HDAC1 was inversely correlated to miR-449a expression, suggesting the HDAC1 could be the target-gene of miR-449a. The patients with low miR-449a expression had poorer prognosis after surgery. In gastric cancer, the expression of miR-449a was lower in the tumor tissue compared to non-tumor tissue. Serum expression of miR-449a was correlated to the expression of miR-449a in the tumor tissue. The serum expression of miR-449a was lower in the dedifferentiated cancer. miR-449a might be useful for the biomarker in the colorectal and gastric cancer.

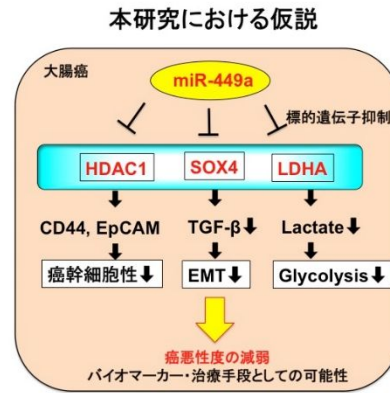
研究分野：癌分子生物学

キーワード：miR-449a 大腸癌 胃癌 HDAC1 癌幹細胞 上皮間葉転換 解糖系

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)は non-coding RNA の一種で 21-25 塩基長の 1 本差 RNA であり、遺伝子の転写抑制、転写産物の分解によりその機能を示す。ヒトゲノムには 1000 以上の miRNA がコードされており、発生、細胞増殖、分化などあらゆる生物学的プロセスに重要な役割を担う。これまでに種々の miRNA が癌発生や悪性度制御に密接に関連すると報告されている (Nat Rev Cancer. 2009)。既報によると microRNA-449a(miR-449a)は抗腫瘍作用を示す miRNA であることが示唆されており、我々の miR-449a ノックアウトマウスを用いた研究においても、ノックアウトマウスでは大腸化学発癌が高頻度に生じ、また腫瘍サイズも大きく、より浸潤傾向を有することが示された (Sci Rep. 2017)。また臨床検体を用いた研究においては miR-449 低発現群は高発現群に比較し大腸癌切除後の無再発生存率 (DFS) が不良であるという結果も得ており動物実験での結果を支持するものであると考えられる。



miR-449a は Histon diacetylase 1(HDAC1)、SOX4、Lactate dehydrogenase (LADH) といった癌幹細胞性、上皮間葉転換・解糖系を制御する遺伝子群を標的とする可能性があり、miR-449a はこれら標的遺伝子を介して癌表現系・悪性度を決定づけるという着想のもと、消化器癌(大腸癌・直腸癌、胃癌)における miR-449a の役割を解明することを研究課題として設定するに至った。

### 2. 研究の目的

消化器癌の発癌メカニズム、増悪進展様式の解明は新たなバイオマーカーの開発や次世代治療方法の確立に不可欠である。これまでの研究成果により microRNA-449a(miR-449a)の欠失や発現低下は大腸癌発癌・癌進展に密接に関連する因子であることが明らかとなった (Sci Rep. 2017)。しかしながら miR-449a の詳細な機能・制御機構については不明であり、癌悪性度評価や予後予測等バイオマーカーとしての確立、また新規治療手段開発に向けてさらなる研究が必要不可欠である。miR-449a は HDAC1 などの標的遺伝子を介して癌表現系・悪性度を決定づけるという仮説のもと、今回、大腸癌・直腸癌における miR-449a の役割を解明することを研究目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) EMT 誘導時における miR-449a の発現動態 (in vitro)

大腸癌細胞株に EMT を誘導させ、EMT 誘導過程における miR-449a の発現量とその推移、EMT 関連遺伝子・タンパクの発現量との関連性について観察する。EMT が誘導された、より純粋な細胞集団の同定を行い、各分画をセルソーティングで分取して解析し、分画ごとの表現型の違いを明らかにする。

#### (2) miR-449a の機能解析と標的遺伝子の同定 (in vitro, in vivo)

miR-449a の機能抑制あるいは過剰発現が、EMT 誘導時における細胞形態や誘導効率、各 EMT 関連因子 (E-cadherin, Twist, Snail) の発現、遊走・浸潤能、増殖能に与える影響、癌幹細胞性に対する影響、解糖系エネルギー代謝への影響を明らかにする。

#### (3) miR-449a 発現の臨床的意義 (臨床検体)

大腸癌 (n=72)、胃癌 (n=66) の原発巣及び肝転移巣の手術切除標本、術前に採取した血液を用いて組織中 (癌部・非癌部) 及び血中の miR-449a 発現を RT-PCR 法を用いて解析し、miR-449a 発現と予後を含めた臨床病理学的因子との関連性について明らかにする。また、標的遺伝子 (HDAC1, SOX4, LADH) の発現量を免疫組織化学染色にて評価し miR-449a との発現の相関を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 細胞モデルにおける EMT 誘導と miR-449a の発現パターンを解析し機能面においても FACS 解析にて明らかにする予定であったがモデルの確立に難渋した。大腸癌細胞株 HCT116, HT29 を用いて、細胞を播種直後より TGF、Wnt シグナル刺激により EMT 誘導細胞の増加を測ったが、E-cadherin, Twist, Snail の遺伝子発現量に差は認めなかった。TGF、Wnt シグナル誘導のタイムポイントや細胞株自体の EMT 誘導に対する感受性の差が関連していると考えられた。有効に EMT 誘導がなされなかったためプロトコールの変更が必要と考えられた。

(2) 大腸癌臨床検体における検討では、手術切除標本における癌部 miR-449a 発現と HDAC1 発現量は有意な逆相関の関係にあり (図 1)、大腸癌に

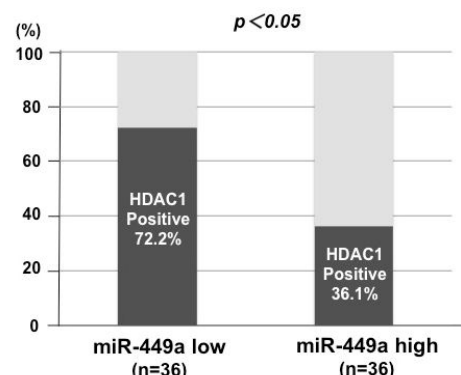


図1: miR-449a 発現と HDAC1 発現との関係性

において HDAC1 が miR-449a の標的遺伝子として存在していることが示唆された。臨床病理学的因子において、miR-449a 発現は年齢や性別、腫瘍局在、リンパ節転移の有無、CA19-9 値との関連は認めなかったが、miR-449a 低発現群において腫瘍深達度が深く、リンパ脈管侵襲が高度であり、CEA 値が高値であった。予後に関しては、miR-449a 低発現群で全生存率が低い傾向にあり ( $p=0.09$ )、無再発生存率は有意に不良である結果となった (Anticancer Res.2019)。さらに miR-449a 発現は原発巣に比較して肝転移巣で低下しており癌悪性化に寄与することが示唆された。

(3) 胃癌摘出標本を用いた検討にて、miR-449a 発現量は非癌部に比較して癌部で有意に低く、腹水中癌細胞陽性の症例、病期が進行した症例など悪性度が高いほど低発現であった。また単変量解析においては、リンパ節転移陽性、リンパ管侵襲あり、脈管侵襲あり、CEA, CA19-9 高値、miR-449a 低発現が、癌特異的生存率が不良であることの因子として抽出された。さらに血中の miR-449a 発現量は癌組織中の miR-449a 発現量と相関していた (図2)。血中 miR-449a 発現は分化度の低い組織型で低発現であった (Anticancer res. 2020)。大腸癌と同様に胃癌症例においても miR-449a はバイオマーカーとして機能しうることが示唆された。

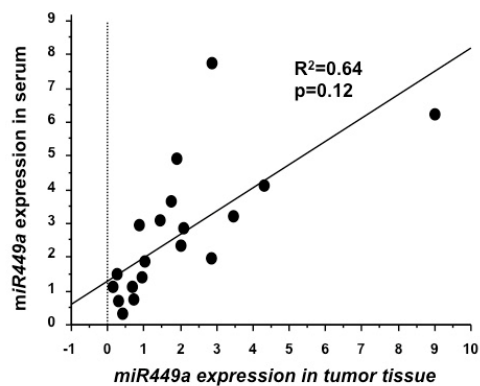


図2: 組織中および血中miR-449a発現の相関

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 ISHIKAWA DAICHI, NISHI MASAOKI, TAKASU CHIE, KASHIHARA HIDEYA, TOKUNAGA TAKUYA, HIGASHIJIMA JUN, YOSHIKAWA KOZO, SHIMADA MITSUO	4. 巻 34
2. 論文標題 The Role of Neutrophil-to-lymphocyte Ratio on the Effect of CRT for Patients With Rectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 863 ~ 868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11850	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 Ishikawa Daichi, Yoshikawa Kozo, Higashijima Jun, Nishi Masaaki, Kashihara Hideya, Takasu Chie, Shimada Mitsuo	4. 巻 67
2. 論文標題 Anastomotic recurrence after laparoscopic distal gastrectomy with delta-shaped anastomosis?:?report of a case	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 211 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.67.211	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 ISHIKAWA DAICHI, TAKASU CHIE, KASHIHARA HIDEYA, NISHI MASAOKI, TOKUNAGA TAKUYA, HIGASHIJIMA JUN, YOSHIKAWA KOZO, YASUTOMO KOJI, SHIMADA MITSUO	4. 巻 39
2. 論文標題 The Significance of MicroRNA-449a and Its Potential Target HDAC1 in Patients With Colorectal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2855 ~ 2860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.13414	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 Wada Y, Nishi M, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T, Tokunaga T, Takasu C, Kashihara H, Ishikawa D, Yoshimoto T, Shimada M	4. 巻 34
2. 論文標題 Usefulness of virtual three-dimensional image analysis in inguinal hernia as an educational tool.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Endosc.	6. 最初と最後の頁 1923-1928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nishi Masaaki, Yoshikawa Kozo, Higashijima Jun, Tokunaga Takuya, Takasu Chie, Kashihara Hideya, Ishikawa Daichi, Shimada Mitsuo	4. 巻 66
2. 論文標題 Utility of virtual three-dimensional image analysis for laparoscopic gastrectomy conducted by trainee surgeons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 280 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.66.280	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 ISHIKAWA DAICHI, YOSHIKAWA KOZO, TAKASU CHIE, KASHIHARA HIDEYA, NISHI MASAOKI, TOKUNAGA TAKUYA, HIGASHIJIMA JUN, SHIMADA MITSUO	4. 巻 40
2. 論文標題 Expression Level of MicroRNA-449a Predicts the Prognosis of Patients With Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 239 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.13945	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 ENKHBAT TUMENJIN, NISHI MASAOKI, YOSHIKAWA KOZO, JUN HIGASHIJIMA, TOKUNAGA TAKUYA, TAKASU CHIE, KASHIHARA HIDEYA, ISHIKAWA DAICHI, TOMINAGA MASAHIDE, SHIMADA MITSUO	4. 巻 38
2. 論文標題 Epigallocatechin-3-gallate Enhances Radiation Sensitivity in Colorectal Cancer Cells Through Nrf2 Activation and Autophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6247 ~ 6252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.12980	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 NISHI MASAOKI, YOSHIKAWA KOZO, HIGASHIJIMA JUN, TOKUNAGA TAKUYA, KASHIHARA HIDEYA, TAKASU CHIE, ISHIKAWA DAICHI, WADA YUMA, SHIMADA MITSUO	4. 巻 38
2. 論文標題 The Impact of Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) Expression on Stage III Gastric Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3387 ~ 3392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.12605	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 ENKHBAT TUMENJIN, NISHI MASAOKI, TAKASU CHIE, YOSHIKAWA KOZO, JUN HIGASHIJIMA, TOKUNAGA TAKUYA, KASHIHARA HIDEYA, ISHIKAWA DAICHI, SHIMADA MITSUO	4. 巻 38
2. 論文標題 Programmed Cell Death Ligand 1 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Colorectal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3367 ~ 3373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12603	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 Yoshimoto T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Iwahashi S, Saito YU, Takasu C, Ishikawa D, Teraoku H, Bando Y, Shimada M.	4. 巻 38
2. 論文標題 The Outcome of Sorafenib Therapy on Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Experience of Conversion and Salvage Hepatectomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 501 ~ 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12250	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石川大地、佐藤宏彦、豊田剛、鷹村和人、三浦連人
2. 発表標題 絞扼性イレウスを来たし緊急手術を行った大網裂肛ヘルニアの1例
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川大地、高須千絵、柏原秀也、西正暁、徳永卓哉、東島潤、吉川耕造、島田光生
2. 発表標題 胃癌組織中に発現するmicroRNA-449aの意義解明についての研究
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川大地、高須千絵、柏原秀也、西正暎、徳永卓哉、東島潤、吉川幸造、島田光生
2. 発表標題 再発及び前立腺摘出術後の鼠径ヘルニア症例に対するTAPP法の有用性
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----