

平成30年6月15日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07152

研究課題名(和文)大腸癌の転移、浸潤に関わるマイクロRNA発現の腫瘍内不均一性の検討

研究課題名(英文) Heterogeneous expression of microRNA associated with metastasis of colorectal cancer

研究代表者

武藤 雄太 (MUTO, Yuta)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：60782018

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)：癌の転移や浸潤にはマイクロRNAが関与する。大腸癌におけるマイクロRNAの腫瘍内不均一性を明らかにすることで転移のメカニズムの解明につながることを期待できる。大腸癌の粘膜側、中心部、漿膜側からマイクロRNAを抽出し、癌に関与する84種類のマイクロRNAの測定を行った。27種類で腫瘍内不均一性を認め、がん抑制に関わるmiR-34a、miR30-cの発現が漿膜側で低下していた。また、血液検体から採取したマイクロRNAの発現と比較したところ、漿膜側のプロファイルが類似していた。マイクロRNAの発現において、癌の漿膜側から検体を採取することで癌の浸潤能、転移能を正しく反映した結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA is involved in metastasis and invasion of the colorectal cancer. We investigated the intratumor heterogeneity of microRNA in colorectal cancer. We extracted the microRNA from the mucosa side, the center, the serosa side of colorectal cancer and measured 84 kinds of microRNA associated with a cancer. There was intratumor heterogeneity in 27 of those. The expression level of miR-34a and miR30-c, which were thought to tumor suppressor micro RNA, decreased on the serosa side. Also, comparing the microRNA expression profile of blood samples with that of each tumor samples, a profile on the serosa side was similar to that of blood samples. Obtaining a specimen from the serosa side of colorectal cancer is the important to evaluate the invasive ability, metastaticity of the cancer when we use the clinical samples.

研究分野：消化器外科学

キーワード：マイクロRNA 大腸癌 転移 腫瘍内不均一性

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の治療成績は外科治療や化学療法  
の進歩により向上したが、転移を有する大腸  
癌患者の予後は依然不良である。転移の制御  
が現在の大腸癌治療における課題であり、転  
移の機序の解明が求められている。近年、癌  
の転移について EMT (Epithelial-  
Mesenchymal Transition、上皮間葉移行)の  
関与が注目されてきた。EMT とは上皮細胞  
が間葉系細胞の形質を獲得する現象であり、  
癌の浸潤や転移においてもその関与が考え  
られるようになった。癌細胞は間葉系の表現  
型になることで浸潤能や転移能を獲得し、原  
発巣からの遊離が可能になると考えられて  
いる。しかし、EMT に関する報告のほとん  
どが in vitro の実験で行われ、生体内での腫  
瘍環境や間質から受ける影響についての検  
討を欠いている。EMT と転移の関係につ  
いて臨床検体では十分な証明がされていない  
のが現状である。

臨床検体で EMT の証明が困難な原因とし  
て腫瘍内不均一性が考えられる。転移に関わ  
る分子の発現は、腫瘍全体に一樣に認められ  
るのではなく、腫瘍の一部の領域に偏在して  
いる可能性があり、それが臨床検体での  
EMT の検出を困難にしている事が推測され  
る。以前から癌は浸潤する過程で変異を蓄積  
し、不均一性を有することが知られている。  
近年では分子生物学的な見地から腫瘍内不  
均一性の証明が行われ、癌はひとつの腫瘍内  
でも異なる遺伝子発現プロファイルを示す  
ことが明らかとなった。EMT の証明におい  
ても腫瘍内不均一性を考慮する必要がある  
と考え、特に腫瘍中心部と先進部の遺伝子発  
現プロファイルの違いに注目した。我々はこ  
れまでの研究で大腸癌臨床検体を用いて  
EMT に関連する遺伝子の発現分布を調べ、  
転移に関与する分子を同定した。

本研究ではノンコーディング RNA のひと  
つであるマイクロ RNA(miRNA)の腫瘍内不  
均一性について詳細な研究を行う予定であ  
る。miRNA は癌の発生や制御に深く関与し  
ていることがわかってきている。我々のこれ  
までの研究でも miR-200c が転移に関与す  
ることを明らかにした。癌に関与する miRNA  
は 100 種類以上報告されており、現在では血  
液に含まれる miRNA から癌を診断すること  
も試みられている。miRNA はエクソソーム  
に包まれ血液中に移行することが報告され  
ているが、腫瘍内不均一性については詳しく  
調べられておらず、腫瘍のどの部分で高発現  
しているか不明であり、ほとんどの miRNA  
において腫瘍内不均一性を有するかどうか  
もわかっていない。

## 2. 研究の目的

近年、上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得  
する現象、EMT (Epithelial-Mesenchymal  
Transition、上皮間葉移行)が癌の転移に関  
与すると考えられている。EMT により運動

能の亢進や細胞外基質の蓄積がもたらされ、  
癌細胞が浸潤能や転移能を獲得するといわ  
れているが、臨床検体では十分な証明がされ  
ていない。我々は腫瘍中心部と先進部の遺伝  
子発現プロファイルの違いに注目し、EMT  
を証明するため腫瘍内不均一性を考慮した  
研究を行ってきた。これまでの研究では大腸  
癌臨床検体を用い EMT に関連する遺伝子の  
発現分布を調べ、転移に関わる分子を同定し  
た。

本研究では癌の進行や転移を制御する  
miRNA について、原発巣、転移巣における  
発現分布を調べ、miRNA の腫瘍内不均一性  
を明らかにし、血液中の miRNA との関係を  
調べる。miRNA もしくは miRNA を内包す  
るエクソソームがどのような経路で血中  
に移行するかを解明することが期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) miRNA の腫瘍内不均一性の検証

Cancer panel を用い 84 種類の miRNA  
の腫瘍内不均一性を調べる。

### (2) Cancer panel から得られた結果と臨 床情報を用いた解析

実臨床における大腸癌の浸潤、転移に関  
係する miRNA を同定。

### (3) バリデーション

検体数を増やし、対象となる miRNA を  
絞りこむ。

### (4) 血液中 miRNA の測定

組織中と血液中の miRNA の関係を調べ  
る。

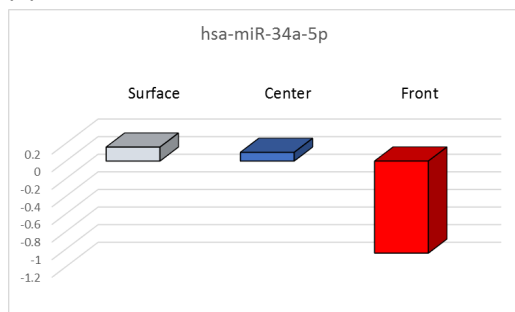
### (5) 血中遊離癌細胞 (Circulating tumor cell, CTC) からの miRNA 測定

CTC から抽出した miRNA と血液中から  
直接抽出した miRNA の発現の違いを測定す  
る。

## 4. 研究成果

自治医科大学附属さいたま医療センター  
で採取した大腸癌切除標本のうち、転移を伴  
う大腸癌の検体を選択し、正常大腸粘膜、大  
腸癌部については粘膜側、中心、漿膜側のそ  
れぞれから microRNA を抽出した。microRNA  
用の cancer panel (Cancer Focus microRNA  
PCR Panel (Exiqon 社)) を用い、癌に関与す  
る 84 種類の microRNA の測定を行った。その  
うち、27 個の microRNA の発現で腫瘍内不均  
一性を認めた。大腸癌における tumor  
suppressor microRNA (がん抑制型 microRNA)  
と考えられている miR-34a の発現については  
10 検体から抽出した計 50 箇所の RNA を用い  
q-RTPCR を施行し、バリデーションを行った。  
その結果、粘膜側、中心部では同一患者の正  
常大腸粘膜の発現と同程度であったものの、  
漿膜側では有意に発現が低下している  
( $p=0.03$ ) ことが確認できた (図 1)。

図 1

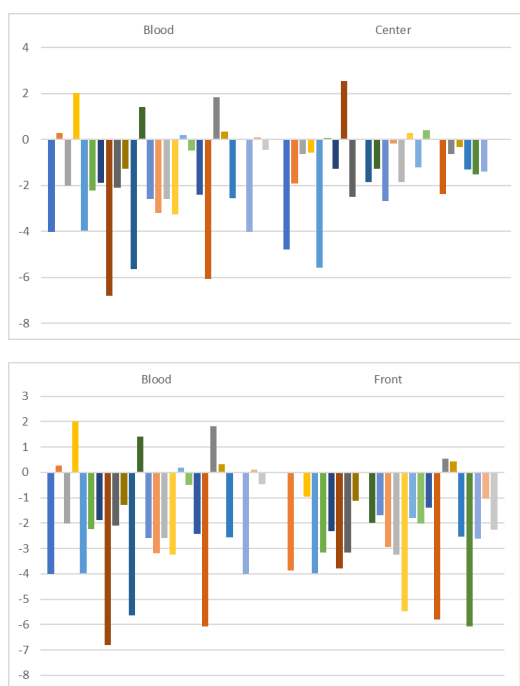


また、同様に tumor suppressor microRNA と考えられている miR30-c においても有意差はなかったが漿膜側で発現低下している傾向を認めた(p=0.06)。いずれも転移を有さない大腸癌の検討では漿膜側とそれ以外の部位で発現差を認めなかった。

以前、われわれが報告した mRNA 発現と同様に、microRNA の発現においても、癌の漿膜側から検体を採取することで癌の浸潤能、転移能を正しく反映した結果が得られることを示唆していると考えられた。

また、同一患者の血液検体から採取した microRNA に対しても cancer panel を用いた測定を行っており、組織と血液の microRNA 発現プロファイルを比較し、組織漿膜側のプロファイルの方がより血液の発現プロファイルに近い(図2)ことが判明し、癌の漿膜側での検体を用いることで血液中に移行する癌細胞の状態をとらえることができると考えられた。

図 2



CTC 採取に関しては抽出したものの miRNA の質に問題があり、発現量を測定することが

できなかった。

今後の検討課題として、採取時に転移していない大腸癌の検体数を増やし、再発症例に特徴的な miRNA の存在の有無を確認することと血液中の miRNA と転移の関係に明らかにすることが挙げられる。

miRNA の腫瘍内不均一性が転移にどのように影響を及ぼすか、また血中への癌細胞の移行にどのように関わるかを明らかにし、転移再発癌の早期発見とリスク評価を可能にするため継続して研究を進め、論文化を目指す。

## 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9件)

2017年

Clinical and molecular assessment of regorafenib monotherapy.

Kakizawa N, Suzuki K, Fukui T, Takayama Y, Ichida K, Muto Y, Hasegawa F, Watanabe F, Kikugawa R, Tsujinaka S, Futsuhara K, Miyakura Y, Noda H, Rikiyama T.

Oncol Reports. 2017 Apr;37(4):2506-2512. doi: 10.3892/or.2017.5456. Epub 2017 Feb 15. 査読あり

Sequential administration of XELOX and XELIRI is effective, feasible and well tolerated by patients with metastatic colorectal cancer.

Fukui T, Suzuki K, Ichida K, Takayama Y, Kakizawa N, Muto Y, Hasegawa F, Watanabe F, Kikugawa R, Saito M, Tsujinaka S, Miyakura Y, Rikiyama T.

Oncol Letters. 2017 Jun;13(6):4947-4952. doi: 10.3892/ol.2017.6100. Epub 2017 Apr 26. 査読あり

Morphological response contributes to patient selection for rescue liver resection in chemotherapy patients with initially un-resectable colorectal liver metastasis.

Suzuki K, Muto Y, Ichida K, Fukui T, Takayama Y, Kakizawa N, Kato T, Hasegawa F, Watanabe F, Kaneda Y, Kikukawa R, Saito M, Tsujinaka S, Futsuhara K, Takata O, Noda H, Miyakura Y, Kiyozaki H, Konishi F, Rikiyama T.

Oncol Letters. 2017 Aug;14(2):1491-1499. doi: 10.3892/ol.2017.6338. Epub 2017 Jun 7. 査読あり

Overexpression of satellite alpha transcripts leads to chromosomal instability via segregation errors at specific chromosomes.

Ichida K, Suzuki K, Fukui T, Takayama Y, Kakizawa N, Watanabe F, Ishikawa H, Muto Y, Kato T, Saito M, Futsuhara K, Miyakura Y, Noda H, Ohmori T, Konishi F, Rikiyama T. 査読あり

Int J Oncol. 2018 Mar 16. doi: 10.3892/ijo.2018.4321. [Epub ahead of print]

武藤 雄太, 帖地憲太郎, 森田大作, 岡淳夫, 力山敏樹

S-1 単剤療法により長期生存を得られた根治切除不能な高齢者大腸がんの1例

3892 45巻1号 55-57 2018.1 査読あり

2016年

Clinical characteristics of synchronous colorectal cancers in Japan. Kato T, Alonso S, Muto Y, Noda H, Miyakura Y, Suzuki K, Tsujinaka S, Saito M, Perucho M, Rikiyama T. World J Surg Oncol 2016 Oct 24;14(1):272. 査読あり

Heterogeneous expression of zinc-finger E-box-binding homeobox 1 plays a pivotal role in metastasis via regulation of miR-200c in epithelial-mesenchymal transition. Muto Y, Suzuki K, Kato T, Tsujinaka S, Ichida K, Takayama Y, Fukui T, Kakizawa N, Watanabe F, Saito M, Futsuhara K, Noda H, Miyakura Y, Konishi F, Rikiyama T. Int J Oncol 2016 Sep;49(3):1057-67. 査読あり

Malignant, but not benign, intraductal papillary mucinous neoplasm preferentially associates with prior extrapancreatic malignancies. Kato T, Alonso S, Noda H, Miyakura Y, Tsujinaka S, Saito M, Muto Y, Fukui T, Ichida K, Takayama Y, Watanabe F, Kakizawa N, Perucho M, Rikiyama T. Oncol Rep 2016 Jun;35(6):3236-40. doi: 10.3892/or.2016.4755. 査読あり

Tumor size is an independent risk predictor for metachronous colorectal cancer. Kato T, Alonso S, Muto Y, Perucho M, Rikiyama T. Oncotarget 2016 Apr 5;7(14):17896-904. doi: 10.18632/oncotarget.7555. 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

2017年

Verification of the morphological response for unresectable colorectal liver metastases Fukui T, Suzuki K, Ichida K, Kakizawa N, Muto Y, Watanabe F, Kaneda Y, Miyakura Y, Noda H, Rikiyama T Joint Congress of The 6th Biennial

Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association & The 29th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 2017.6.7-10, Yokohama, Oral

乳癌において Satellite alpha transcript 過剰発現が惹起する染色体不安定性 市田晃佑、鈴木浩一、福井太郎、高山裕司、柿澤奈緒、渡部文昭、石川英樹、齊藤正昭、武藤雄太、加藤高晴、蓬原一茂、力山敏樹 第76回日本癌学会学術総会 2017.9.28-30 横浜 ポスター

大腸癌肝転移に対する外科的治療選択における形態学的変化の有用性の検証 福井太郎、鈴木浩一、市田晃佑、柿澤奈緒、武藤雄太、渡部文昭、兼田裕司、宮倉安幸、野田弘志、力山敏樹 第72回日本消化器外科学会総会 2017.7.20-22 金沢 ワークショップ

2016年

大腸癌臨床検体における腫瘍内不均一性を考慮した上皮間葉移行と転移の関係についての検討. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、柿澤奈緒、齊藤正昭、力山敏樹 第20回日本がん分子標的治療研究会 2016.5.30-6.1 別府 示説

大腸癌臨床検体における腫瘍内不均一性を考慮した上皮間葉移行と転移の関係についての検討. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、柿澤奈緒、渡部文昭、齊藤正昭、辻仲眞康、高田理、宮倉安幸、力山敏樹 第37回癌免疫外科研究会 2016.5.12-13 川越 示説

〔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

武藤 雄太 (MUTO, Yuta)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：60782018

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )