

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10635

研究課題名(和文)大腸癌肝転移に関する癌微小環境におけるmicroRNAの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of microRNA in cancer microenvironment involved in colorectal liver metastasis

研究代表者

飯田 通久 (IIDA, Michihisa)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50554797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：miRNAアレイによる網羅的解析の結果、miR221およびmiR222は肝転移のない大腸癌症例に比較して肝転移を有する大腸癌の原発癌間質において有意に高かった。さらにqPCRによる発現解析では、miR221高発現群で肝転移、遠隔転移、脈管浸潤が多く、全生存期間が不良であった。同様にmiR222高発現群で肝転移、遠隔転移が多く、全生存期間が不良であった。一方、癌細胞におけるmiR221およびmiR222発現と臨床病理学的因子の間に有意な相関はなかった。ISHによる発現解析では肝転移症例の癌細胞および線維芽細胞の細胞質にmiR221およびmiR222発現が強く見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌原発癌の間質においてmiR221およびmiR222の高発現は、大腸癌の進展とくに肝転移および遠隔転移に関与することが示された。このことは大腸癌の予後に最も関与する遠隔転移が起こる過程が新たに示された可能性がある。また癌間質のなかでも特に線維芽細胞においてmiR221およびmiR222の高発現が示されたことは、癌の進展や転移に関わるとされる癌関連線維芽細胞の発生の過程にもmiR221およびmiR222の高発現が関与することが示唆されており、癌関連線維芽細胞の制御という面でも意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：As a result of comprehensive analysis by miRNA array, miR221 and miR222 were significantly higher in the primary cancerous interstitium of colorectal cancer with liver metastasis than in the cases of colorectal cancer without liver metastasis. Expression analysis by qPCR revealed that liver metastasis, distant metastasis, and vascular invasion were high in the miR221 high expression group, and overall survival was poor. Similarly, liver metastasis, distant metastasis, and overall survival were high in the miR222 high expression group. The duration was poor. Meanwhile, there was no significant correlation between miR221 and miR222 expression in cancer cells and clinicopathologic factors. Expression analysis by ISH showed strong miR221 and miR222 expression in the cytoplasm of cancer cells and fibroblasts in liver metastases.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 癌間質 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は増加中の疾病で、世界で1年間に120万例が新たに大腸癌を発症し、60万人が大腸癌で死亡している。日本では大腸癌に毎年約12万人が罹患し、癌種別死亡者数では男性で第3位、女性で第1位である。大腸癌において肝転移は遠隔転移の中で最も多く、大腸癌の予後向上のためには大腸癌肝転移のメカニズム解明およびその制御が重要である。

癌が浸潤や転移を来すには癌細胞が様々な能力を獲得することが必要であるが、近年これらのステップには癌を取り巻く微小環境が重要であると注目されている。癌組織は癌細胞と癌間質から構成され、癌間質には線維芽細胞や免疫細胞、炎症細胞、血管などが存在し、癌微小環境を形成している。癌間質と癌細胞はサイトカインおよびエクソソーム中に内包された miRNA、タンパクなどを介してクロストークしており、これによって癌細胞は転移に必要な能力を獲得していると考えられている。特に癌関連線維芽細胞(CAF)は癌の悪性度促進に深くかかわっていると注目されている。

癌の肝転移には癌微小環境も含め様々な要因が関わっていると推測されるが、癌間質に focus を当てた癌遠隔転移のメカニズム研究はまだ多くない。癌間質における miRNA 発現が大腸癌肝転移に影響を及ぼしているかを検討することは、癌微小環境が肝転移形成に及ぼすメカニズム解明および肝転移の制御につながると考えられる。

miRNA-221 および miRNA-222 は様々な癌腫で発現上昇が報告されている oncogenic miRNA であるが(M.Galfalo, Curr Mol Med 2012)、癌間質での発現上昇や肝転移との関係については報告されていない。また miRNA-221 と miRNA-222 は相同性の高い miRNA でかつ同じシード配列を有しており、同じ mRNA の発現を制御していると考えられる。これらの相同性の高い miRNA が同時に過剰発現しているが確認されたことは、臨床的意義が非常に高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では多数の臨床サンプルで大腸癌間質組織中の miRNA221 および miRNA222 の発現解析を PCR および In situ hybridization (ISH) にて行い、肝転移や遠隔転移などの臨床病理学的因子野と関連を検討する。また In situ hybridization にて大腸癌肝転移症例における miRNA221, 222 発現上昇は癌間質の中でも特に線維芽細胞にみられることを同定しており、癌線維芽細胞に miRNA221, 222 を導入した機能解析を行うことにより miRNA221 および miRNA222 過剰発現が肝転移を促進する機序について検討する。

## 3. 研究の方法

### 1. 大腸癌間質および癌細胞における miR221/222 の発現解析

進行大腸癌切除標本 101 例で LCM にて癌間質および癌細胞を抽出した後 PCR を行い、癌間質および癌細胞における miRNA-221 および miRNA-222 の発現を検討する。miRNA-221・222 の発現量と臨床病理学的因子や切除後生存率との関係について検討する。

### 2. 大腸癌間質での miR221/222 発現の局在を同定

大腸癌切除標本 20 例で ISH を行うことで癌間質における miR221/222 発現の局在および発現強度を検討する。

## 4. 研究成果

miRNA アレイによる網羅的解析の結果、miR221 および miR222 は肝転移のない大腸癌症例に比較して肝転移を有する大腸癌の原発巣癌間質において有意に高かった。

さらに qPCR による発現解析では、miR221 高発現群では低発現群に比較して肝転移、遠隔転移、脈管浸潤が多く、全生存期間が不良であった(図1)。

**図1** miR221の間質および癌細胞での発現と臨床病理学因子

Clinicopathologic factor	miR221 expression stroma			miR221 expression cancer cell		
	High (N= 50)	Low (N= 51)		High (N= 50)	Low (N= 51)	
Age	68.3±11.7	67.8±11.6	P=0.851	68.8±10.4	67.3±12.7	P=0.494
Gender						
male	23	26	P=0.617	25	24	P=0.767
female	27	25		25	27	
Degree of differentiation			P=0.358			P=0.383
Well / moderate	44	47		46	45	
Poor	6	4		4	6	
Depth			P=0.098			P=0.098
mp / ss	25	33		25	33	
se / si	25	18		25	18	
Lymph node metastasis			P=0.227			P=0.227
Absent	16	21		16	21	
Present	34	30		34	30	
Lymphatic invasion			P=0.346			P=0.369
Absent	5	3		3	5	
Present	45	48		47	46	
Venous invasion			P=0.023			P=0.062
Absent	8	18		9	17	
Present	42	33		41	34	
Liver metastasis			P=0.028			P=0.164
Absent	33	43		35	41	
Present	17	8		15	10	
Distant metastasis			P=0.003			P=0.083
Absent	29	43		32	40	
Present	21	8		18	11	
Recurrence within 3 years (Cur A,B)	High (N= 27)	Low (N= 37)	P=0.092	High (N= 29)	Low (N= 35)	P=0.544
Absent	17	30		21	26	
Present	10	7		8	9	

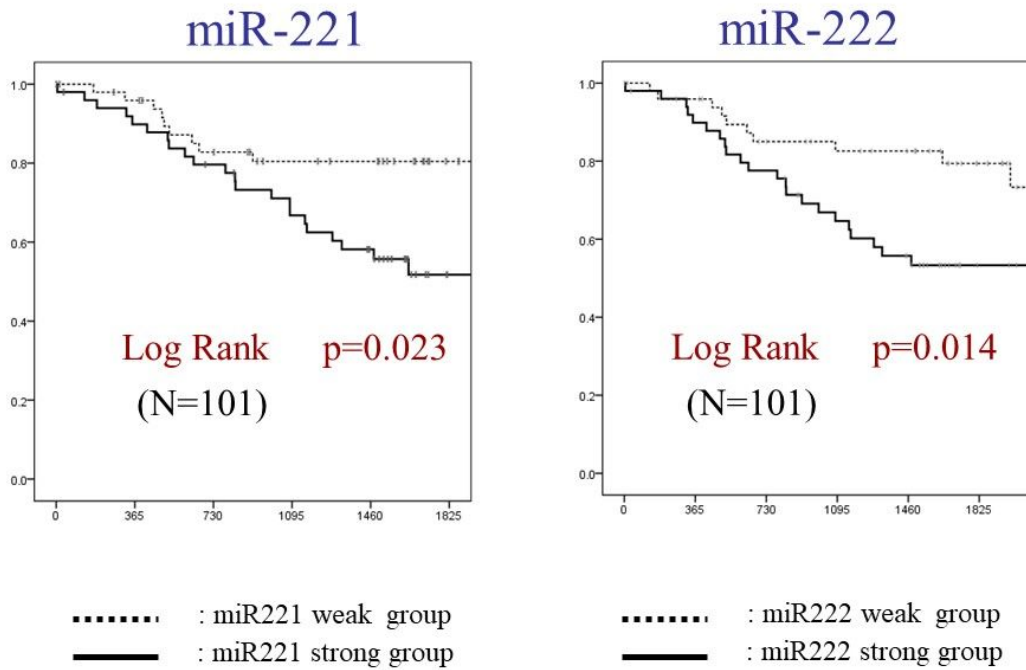
同様に miR222 高発現群では低発現群に比較して肝転移、遠隔転移が多く、全生存期間が不良であった（図2）。

**図2** miR222の間質および癌細胞での発現と臨床病理学因子

Clinicopathologic factor	miR222 expression stroma			miR222 expression cancer cell		
	High (N= 50)	Low (N= 51)		High (N= 50)	Low (N= 51)	
Age	68.7±11.0	67.4±12.2	P=0.562	68.8±10.4	67.3±12.7	P=0.494
Gender						
male	18	31	P=0.617	25	24	P=0.767
female	32	20		25	27	
Degree of differentiation			P=0.383			P=0.383
Well / moderate	46	45		46	45	
Poor	4	6		4	6	
Depth			P=0.045			P=0.098
mp / ss	24	34		25	33	
se / si	26	17		25	18	
Lymph node metastasis			P=0.184			P=0.227
Absent	21	16		16	21	
Present	29	35		34	30	
Lymphatic invasion			P=0.141			P=0.369
Absent	2	6		3	5	
Present	48	45		47	46	
Venous invasion			P=0.267			P=0.062
Absent	15	11		9	17	
Present	36	39		41	34	
Liver metastasis			P=0.009			P=0.164
Absent	32	44		35	41	
Present	18	7		15	10	
Distant metastasis			P=0.003			P=0.083
Absent	29	43		32	40	
Present	21	8		18	11	
Recurrence within 3 years (Cur A,B)	High (N= 27)	Low (N= 37)	P=0.404	High (N= 29)	Low (N= 35)	P=0.544
Absent	22	33		21	26	
Present	8	9		8	9	

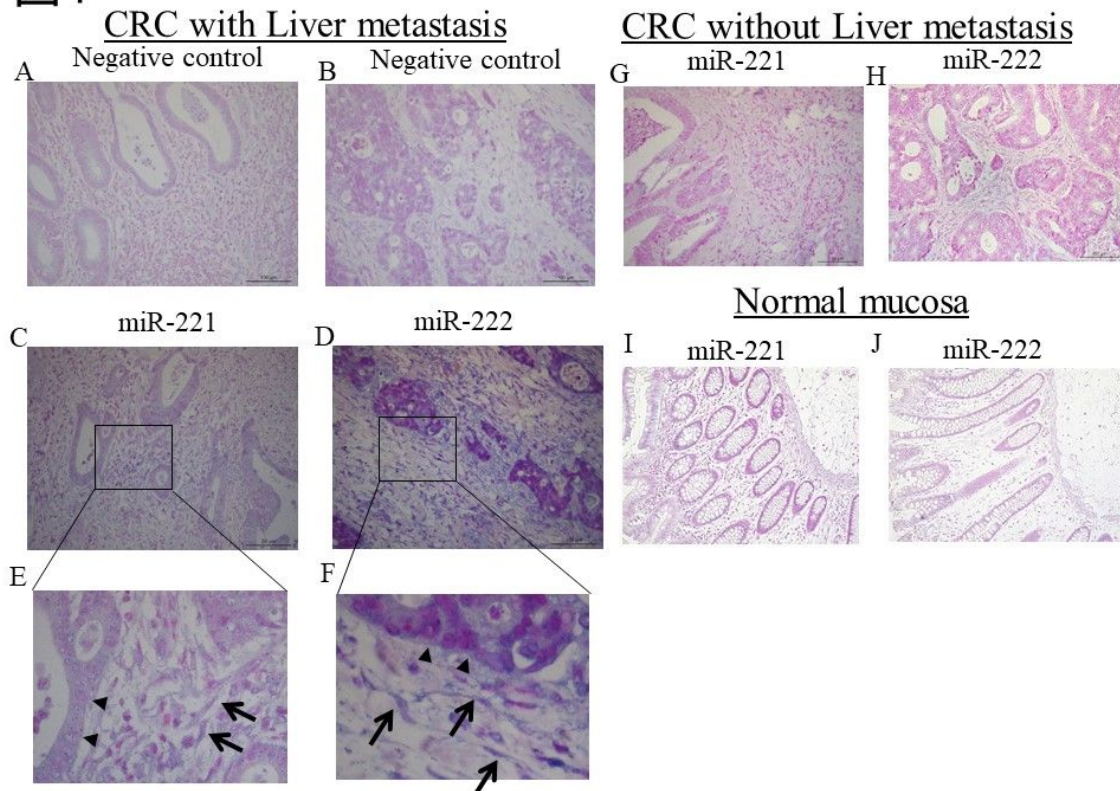
生存解析では、間質における miR221 高発現群および miR222 高発現群では低発現群に比較して全生存期間が不良であった（図3）。

図3 miR221およびmiR222の間質での発現と全生存期間



一方、癌細胞における miR221 および miR222 発現と臨床病理学的因子の間に有意な相関はなかった。ISH による発現解析では肝転移症例の癌細胞および線維芽細胞の細胞質に miR221 および miR222 発現が強く見られた (図4)。

図4 miR221およびmiR222のISHによる間質での発現解析



また miR221 および miR222 が間質の線維芽細胞に影響して癌関連線維芽細胞への分化を促すことで肝転移形成に関与しているか確認するために、線維芽細胞に miR221 および miR222 をトランスフェクションした。トランスフェクション株は miR-221 で 360%、miR-222 で 1300%の発

現上昇を示した。トランスフェクション株の癌関連線維芽細胞様の形態変化は見られなかった。また癌関連線維芽細胞のマーカーである SMA および FAP を PCR で定量しトランスフェクションとコントロールで比較した。SMA は miR-221 で 140%、miR-222 で 150% とトランスフェクション株で増加を認めた。FAP は miR-221 で 150%、miR-222 で 130% とトランスフェクション株で増加を認めた。

線維芽細胞における癌間質における 2 つの highly homologous miRNA, miR221 および miR222 の過剰発現は大腸癌進展に関連している可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Iida Michihisa, Hazama Shoichi, Tsunedomi Ryouichi, Tanaka Hironori, Takenouchi Hiroko, Kanekiyo Shinsuke, Tokumitsu Yukio, Tomochika Shinobu, Tokuhisa Yoshihiro, Sakamoto Kazuhiko, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ueno Tomio, Yamamoto Shigeru, Yoshino Shigefumi, Fujita Koji, Kuroda Masahiko, Nagano Hiroaki	4. 巻 40
2. 論文標題 Overexpression of miR221 and miR222 in the cancer stroma is associated with malignant potential in colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1621-1631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2018.6575	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯田 通久
2. 発表標題 癌間質におけるmiR221およびmiR222の過剰発現は大腸癌の悪性度と関連する
3. 学会等名 第26回日本がん転移学会
4. 発表年 2017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	碓 彰一 (HAZAMA Shoichi) (50253159)	山口大学・医学部・教授（寄附講座等）  (15501)	
研究分担者	坂本 和彦 (SAKAMOTO Kazuhiko) (50420526)	山口大学・医学部附属病院・講師  (15501)	

