

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09119

研究課題名(和文) 転移性大腸癌における癌悪液質併発のエピジェネティックな機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of epigenetic mechanism in metastasis-related cachexia in Colorectal Cancer

研究代表者

藤川 裕之 (Fujikawa, Hiroyuki)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：40616091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸癌術前CT画像を解析し、腰椎L3下縁レベルにおける腸腰筋・多裂筋を評価し、Psoas Mass Index (PMI:腸腰筋面積/身長<sup>2</sup>)・Intramuscular Adipose Tissue Content (IMAC:多裂筋CT値/皮下脂肪CT値)・Modified IMAC(mIMAC:多裂筋CT値-皮下脂肪CT値)を計算し、その臨床的意義や腫瘍学的予後に与える影響を解析し、術前PMI低下やmIMAC低下が有意な予後不良因子となることをあきらかにした。また遠隔転移組織分泌型miRNAが骨格筋量低下を引き起こす新たな機序を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、担癌宿主における体組成変化として骨格筋量の低下や質の低下は、腫瘍学的予後不良因子となることがあきらかとなり、術前体組成をCT画像を用いて評価することは、栄養介入などの新たな治療介入必要群の同定に有用となる。またその機序として特に遠隔転移組織から積極的にサルコペニアを発症するエピゲノム機序が存在する可能性があきらかとなり、新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated psoas mass index(PMI) or modified intramuscular adipose tissue content (mIMAC) using preoperative computed tomography, and revealed that preoperative myopenia or myosteatorsis was an independent prognostic factor in colorectal cancer. In addition, assessment of miRNA expression using clinical specimens and series of in vitro experiments demonstrated that circulating miRNAs secreted from distant metastasis could induce myopenia in colorectal cancer patients.

研究分野：エピゲノム

キーワード：大腸癌 悪液質 エピゲノム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の欧米化に伴って、日本においても大腸癌による死亡者数が増加している。一方で手術技術の進歩の他、分子標的薬などの新薬、新レジメンの導入により大腸癌患者の予後は向上してきている。しかしながら、大腸癌の予後を規定する因子は術後再発、遠隔転移であることは変わらず、これらに対する中心的な治療である全身化学療法の継続率や治療強度の向上を支える支持療法の重要性が再注目を集めている。またこれまでは腫瘍側因子に注目した、分子標的剤を中心とした治療が中心であったが、免疫チェックポイント阻害剤の開発とその普及により、担癌宿主側因子を標的とした免疫療法の重要性が解明され、腫瘍免疫の基盤となる栄養支持療法の重要性が改めて認識されてきている。

がん局所-個体間における host-tumor interaction が、がん患者の栄養状態や免疫能など全身状態に重大な影響を及ぼすことはよく知られた事実である。一般にがん患者の栄養障害は、「がん関連性体重減少」と「がん誘発性体重減少」に分類されるが、前者が物理的な消化管通過障害や下痢などの消化管機能障害による栄養摂取・消化吸収量低下、絶食期間の長期化に起因する可逆性の病態であるのに対し、後者は上記の host-tumor interaction に起因する不可逆性の病態であると言われている。特に「がん誘発性体重減少」を代表する病態である「悪液質」は、がん治療のアウトカムにも影響を与え、全身化学療法、放射線治療など、がん集学的治療においては、副作用発症率の上昇、有効性・継続性の低下をもたらすと言われ、Performance status(PS)や QOL の低下のみならず、予後不良に深くかかわるとされている。

### 2. 研究の目的

癌化機序としては DNA 変異に伴う Genetic なものと遺伝子配列変異を伴わない遺伝子発現調節を来す Epigenetic 変化が大きく考慮されてきた。とくに Epigenetic 変化の中でも代表的な DNA メチル化に関しては、癌抑制遺伝子の DNA メチル化による発現抑制が発癌・癌進展において重要な役割を果たしていることが明らかとされてきた。また non-coding RNA (ncRNA、非コード RNA) はタンパク質へ翻訳されずに機能する RNA の総称であり、とくに 20 塩基程度の microRNA(miRNA) は、生命現象の微調整役として多くの遺伝子や蛋白質発現制御に関与しており、細胞の分化・増殖及び細胞死の制御に重要な役割を果たしている。近年、細胞外に放出される分泌型 miRNA の存在が明らかになり、血液を利用した新たな非侵襲的 biomarker として期待されている。さらに最近では、miRNA が細胞間情報伝達に大きく関与していることが報告され、癌悪液質発症の機序においても、血液微小蛋白に埋包された miR-21 が、TLR-7 発現調節を介し、骨格筋壊死に関与することが確認された (Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:4525-9)。しかし、癌悪液質における miRNA 伝達による機序や、血清中 miRNA を用いた診断マーカーとしての有用性は、未だ報告が世界的にもないのが現状である。

我々の報告を含むこれまでの先行研究から転移性腫瘍と悪液質発症には深い関連があることはあきらかであるが、その病因には化学療法などの治療に伴うものから、転移に伴う多臓器障害、心理的要因などさまざまな交絡因子が存在する。しかしながら転移組織そのものが全身の骨格筋に対して悪液質を引き起こしている可能性も十分に考慮される。本研究では、転移性症例に高頻度に併発する悪液質、特に骨格筋量減少にかかわる血清中 miRNA 群を同定し、新たな非侵襲的診断マーカーを確立し、癌悪液質の機序解明と治療法開発を目的とする Two way approach を行い質の高い Quality of life を提供することを目的とする。これは学術的にも意義深く、あらたな治療戦略につながる可能性があり、転移性大腸癌患者の幅広い患者層への臨床的償却に直結した研究を遂行することを目標とする。

### 3. 研究の方法

#### ・大腸癌症例の術前 CT 画像を用いた体組成解析

大腸癌 300 例の術前 CT 画像を解析し、術前単純画像を用いて腰椎 L3 下縁レベルにおける腸腰筋・多裂筋を評価し、Psoas Mass Index (PMI:腸腰筋面積/身長<sup>2</sup>)・Intramuscular Adipose Tissue Content (IMAC:多裂筋 CT 値/皮下脂肪 CT 値)・Modified IMAC(mIMAC:多裂筋 CT 値-皮下脂肪 CT 値)を計算し、その臨床的意義や腫瘍学的予後に与える影響を解析した。

#### ・RNA 抽出(組織・血液)

大腸癌組織の原発腫瘍、近傍正常大腸粘膜より採取した RNA later 保存凍結標本と術前血清から RNA を miRNeasy RNA extraction kit(Qiagen)を利用して抽出した。

#### ・定量的 PCR

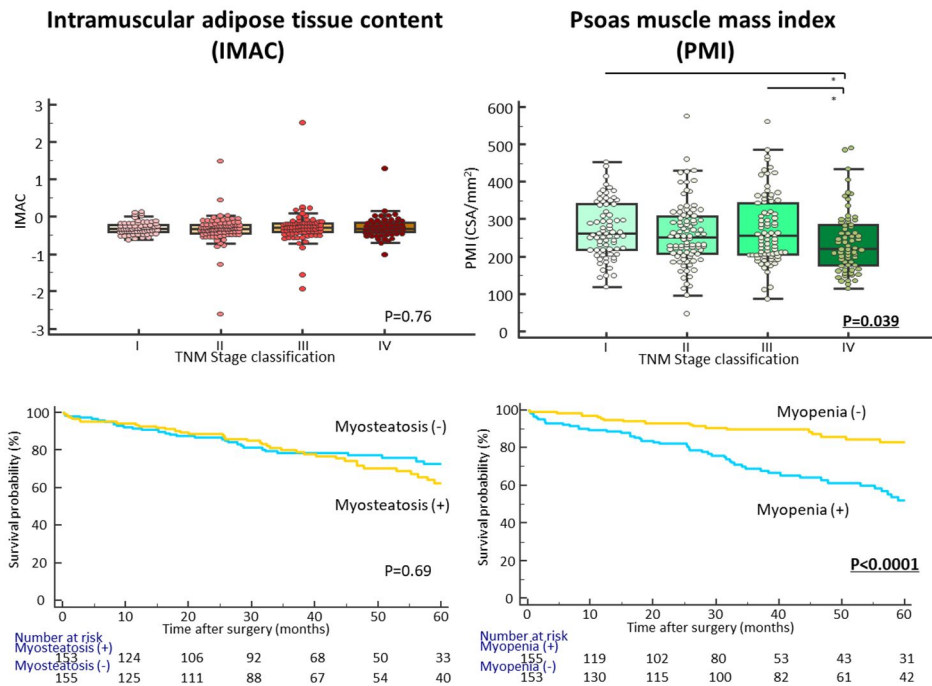
大腸組織や術前血清より抽出した miRNA を用い、qPCR を用いて定量化をおこなった。

#### ・In vitro 解析 (細胞株を用いて)

ヒト骨格筋細胞株 (hSkM) を用い、miR-mimic ならびに miR-inhibitor (Applied) で過剰発現/発現抑制の両者を行った。そのうえでそれらの細胞株を用いて MTT assay, Apoptosis assay, 細胞周期アッセイなどをおこない、miRNA 発現調節による phenotype の変化を評価した。

#### 4. 研究成果

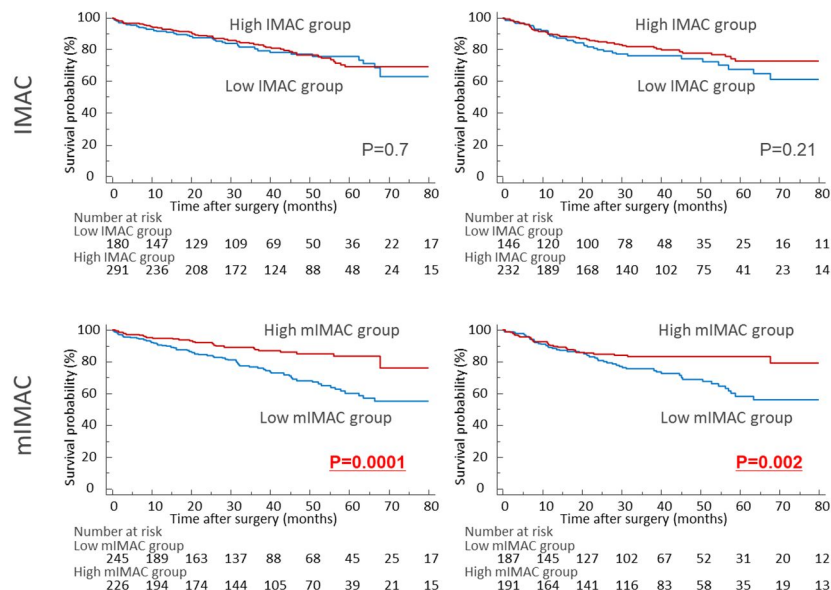
まず大腸癌における術前体組成変化が、腫瘍学的予後に与える影響を明らかにするために、術前 CT 画像を用いて腰椎 L3 下縁レベルにおける、腰椎 L3 下縁レベルにおける腸腰筋・多裂筋を評価し、Psoas Mass Index (PMI:腸腰筋面積/身長<sup>2</sup>)・Intramuscular Adipose Tissue Content (IMAC:多裂筋 CT 値/皮下脂肪 CT 値)を計算し、その臨床的意義や腫瘍学的予後に与える影響を解析したところ、術前骨格筋の質の低下・つまり IMAC 高値はあきらかな相関はみとめないものの、術前骨格筋量 PMI は病期進展とともに有意に低下し、全生存期間並びに無再発生存期間における予後不良因子となることがあきらかとなった(下図)。また Propensity Score Matching をおこない、大腸癌病期の患者背景をそろえて解析を行って



も、同様に術前 PMI 低値はやはり全生存期間・無再発生存期間における有意な予後不良因子となることがあきらかとなった。

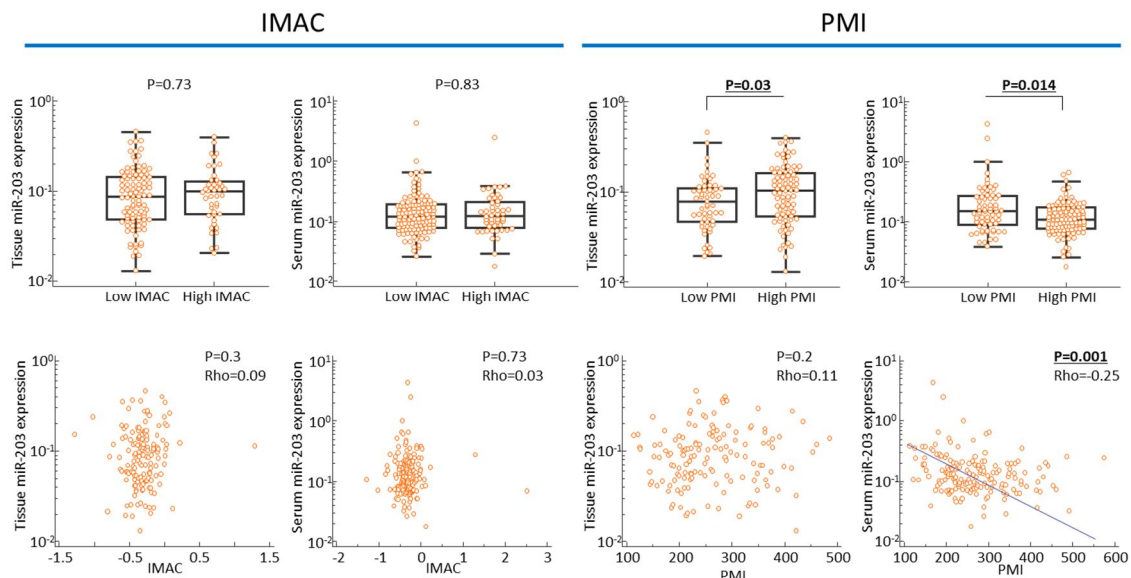
一方、骨格筋の質の評価である従来法の IMAC に代わる方法の開発に着目し、Modified IMAC(mIMAC:多裂筋 CT 値-皮下脂肪 CT 値)を同定し、その臨床的意義や予後予測能を従来法の IMAC と比較検討を行った。その結果、術前 IMAC と比較し、術前 mIMAC 低値は全生存期間・無再発生存期間における有意な予後不良因子となるほか、術前栄養指標のアルブミンや Body Mass Index、Prognostic Nutrition Index と相関をすることから、あらたな栄養指標ともなりうることをあきらかにした。

一方、上述の研究結果から、術前骨格筋量低下は遠隔転移陽性症例で有意に多く認めることが

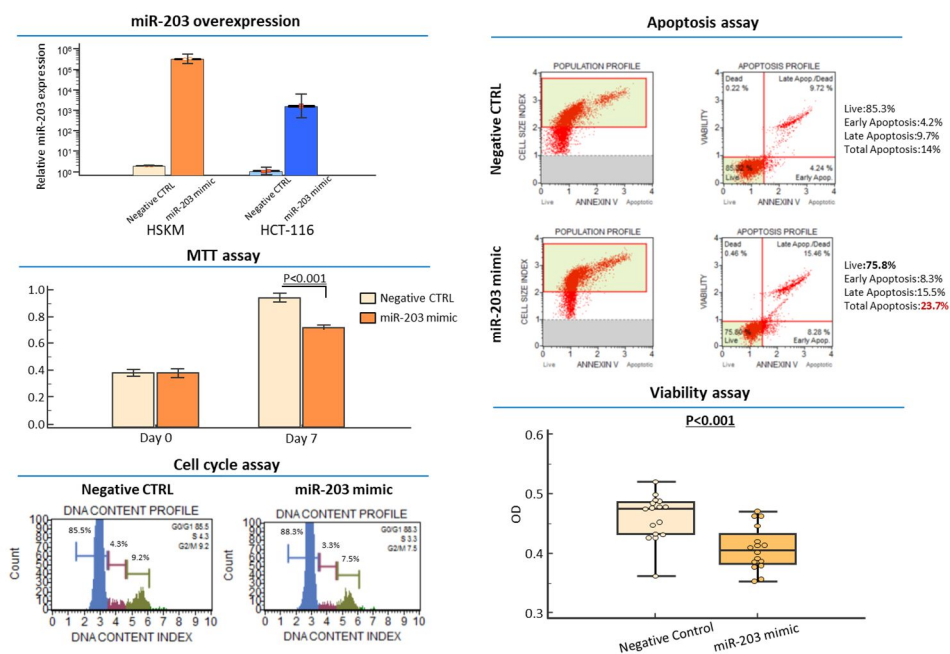


明らかとなったことから、やはり遠隔転移組織より積極的に誘発される骨格筋量低下の機序がある可能性を考慮し、エピゲノム機序として代表的なもののひとつである microRNA(miRNA)に着目し、研究を遂行した。

実際、骨格筋細胞で重要な役割を果たすことが報告されている myo-miR のなかから、大腸癌原発組織と比較し、肝転移組織で有意に発現上昇する分泌型マイクロ RNA:miR-203 に着目し、大腸癌原発組織発現、術前血清発現と術前 CT 画像からの PMI や IMAC との相関解析を行った。その結果、IMAC と miR-203 発現は相関を認めないものの術前骨格筋量(PMI)と術前血清 miR-203 発現は有意な逆相関を占めることが明らかとなり、肝転移から分泌され血中に移行する miR-203 が骨格筋細胞に積極的に作用している可能性が考慮された。



その機序を明らかにするために、ヒト骨格筋細胞株 (hSkM) を用い、miR-203 mimic で過剰発現を行った。そのうえでそれらの細胞株を用いて MTT assay、Apoptosis assay、細胞周期アッセイなどをおこない、miR-203 発現調節による phenotype の変化を評価した。その結果、増殖能に関して、miR-203 過剰発現は、一週間後で有意に抑制し、また細胞周期でわずかに G0/1 arrest に働く可能性が示唆された。一方、過剰発現直後における viability は miR-203 過剰発現群で抑制され、アポトーシスが誘導される可能性が示唆された。



公開データベースを用い解析すると、miR-203 の標的遺伝子の多くが、apoptosis シグナルにかかわる可能性が示唆され、4 つのデータベースを用いて overlap する予測標的遺伝子に、とくに抗アポトーシスにかかわる蛋白群(IAP family)を確認したため、過剰発現群とコントロール群で発現解析をした。その結果、とりわけ BIRC5 発現が抑制されていることが明らかとなり血清 miR-203 発現増加は骨格筋細胞における BIRC5 を抑制し、アポトーシス誘導、Myopenia となりうる可能性が示唆された。本研究に付随し、新たな新規 miRNA-X においても同様の機序に関与している可能性を既に同定し現在も研究継続中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Okugawa Y, Toiyama Y, Yamamoto A, Shigemori T, Ide S, Kitajima T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Yokoe T, Saigusa S, Tanaka K, Shirai Y, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, McMillan DC, Miki C, Goel A, Kusunoki M	4. 巻 272
2. 論文標題 Lymphocyte-C-reactive Protein Ratio as Promising New Marker for Predicting Surgical and Oncological Outcomes in Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 342 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003239	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 該当する
1. 著者名 Mori Koichiro, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Ichikawa Takashi, Nagano Yuka, Oki Satoshi, Shimura Tadanobu, Fujikawa Hiroyuki, Hiro Junichiro, Kobayash Minako, Araki Toshimitsu, Inoue Yasuhiro, Mohri Yasuhiko, Kusunoki Masato	4. 巻 20
2. 論文標題 Preoperative heat shock protein 47 levels identify colorectal cancer patients with lymph node metastasis and poor prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12196	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 Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Hur Keun, Yamamoto Akira, Yin Chengzeng, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Koike Yuhki, Okita Yoshiki, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Araki Toshimitsu, Miki Chikao, McMillan Donald C., Goel Ajay, Kusunoki Masato	4. 巻 10
2. 論文標題 Circulating miR 203 derived from metastatic tissues promotes myopenia in colorectal cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 536 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.12403	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 Okita Yoshiki, Araki Toshimitsu, Okugawa Yoshinaga, Kondo Satoru, Fujikawa Hiroyuki, Hiro Junichiro, Inoue Mikihiro, Toiyama Yuji, Ohi Masaki, Uchida Keiichi, Kusunoki Masato	4. 巻 3
2. 論文標題 The prognostic nutritional index for postoperative infectious complication in patients with ulcerative colitis undergoing proctectomy with ileal pouch-anal anastomosis following subtotal colectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Anus, Rectum and Colon	6. 最初と最後の頁 91 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23922/jarc.2018-032	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 Omura Yusuke, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Yamamoto Akira, Yin Chengzeng, Kusunoki Kurando, Kusunoki Yukina, Shigemori Tsunehiko, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Ohi Masaki, Kusunoki Masato	4. 巻 27
2. 論文標題 Crohn's-Like Lymphoid Reaction is Associated with Oncological Prognosis and Nutritional Status in Patients with Pathological Stage II/III Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 259 ~ 267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07709-w	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 Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Yamamoto Akira, Shigemori Tsunehiko, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Yokoe Takeshi, Saigusa Susumu, Tanaka Koji, Shirai Yumiko, Kobayashi Minako, Ohi Masaki, et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Lymphocyte-C-reactive Protein Ratio as Promising New Marker for Predicting Surgical and Oncological Outcomes in Colorectal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003239	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 該当する

1. 著者名 Fujikawa Hiroyuki, Toiyama Yuji, Inoue Yasuhiro, Omura Yusuke, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Yasuda Hiromi, Okugawa Yoshinaga, Okita Yoshiki, Yoshiyama Shigeyuki, Hiro Junichiro, Kobayashi Minako, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	4. 巻 17(4)
2. 論文標題 Phase I study of preoperative chemoradiotherapy with sequential oxaliplatin and irinotecan with S-1 for locally advanced rectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3930-3936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.10028	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥川喜永、問山裕二、藤川裕之、廣 純一郎、三澤雅子、手島信子、岩下義明、荒木俊光、三木誓雄、楠 正人
2. 発表標題 腫瘍宿主相互作用の観点に基づいた 転移組織分泌型miR-203による腫瘍誘導宿主サルコペニアの可能性の検討.
3. 学会等名 第34回日本静脈経腸栄養学会学術集会、東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥川喜永、問山裕二、山本 晃、大村悠介、浦谷 亮、井出正造、近藤 哲、志村匡信、安田裕美、藤川裕之、大北喜基、白井由美子、横江 毅、三枝 晋、廣 純一郎、大井正貴、荒木俊光、田中光司、三木誓雄、楠 正人
2. 発表標題 臨床実装を視野に入れた大腸癌外科診療におけるあらたなmultiple-outcome prediction biomarkerの確立
3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会、東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤川裕之、問山裕二、小林美奈子、楠 蔵人、大村悠介、山本 晃、浦谷 亮、井出正造、北嶋貴仁、近藤 哲、志村匡信、重盛恒彦、安田裕美、奥川喜永、大北喜基、横江 毅、廣 純一郎、大井正貴、荒木俊光、楠 正人
2. 発表標題 大腸癌手術におけるSurgical site infection,縫合不全に対する経口抗菌薬併用機械的前処置の有用性
3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会、東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥川喜永、問山裕二、藤川裕之、井出正造、大村悠介、山本 晃、安田裕美、大北喜基、横江 毅、廣 純一郎、望木郁代、大井正貴、荒木俊光、中谷 中、楠 正人
2. 発表標題 転移性悪性腫瘍患者におけるサルコペニア発症の機序解明～転移組織分泌型miR-200cに着目して～
3. 学会等名 第24日本緩和医療学会学術集会、横浜
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤川裕之、問山裕二、大村悠介、山本 晃、浦谷 亮、井出正造、近藤 哲、北嶋貴仁、重盛恒彦、安田裕美、奥川喜永、大北喜基、吉山繁幸、廣 純一郎、大井正貴、荒木俊光、楠 正人
2. 発表標題 大腸癌における術後累積CRPと予後との関連
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会、大阪
4. 発表年 2019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	問山 裕二 (Toiyama Yuji) (00422824)	三重大学・医学系研究科・教授  (14101)	
研究分担者	奥川 喜永 (Okugawa Yoshinaga) (30555545)	三重大学・医学部附属病院・教授  (14101)	
研究分担者	北嶋 貴仁 (Kitajima Takahito) (30586772)	三重大学・医学部附属病院・助教  (14101)	
研究分担者	楠 正人 (Kusunoki Masato) (50192026)	三重大学・医学系研究科・寄附講座大学教員  (14101)	
研究分担者	三木 誓雄 (Miki Chikao) (50242962)	三重大学・医学系研究科・客員教授  (14101)	



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
---------	---------