

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591926

研究課題名(和文)胃癌腹膜播種形成に関するエピジェネティック変化の分子機構と治療への応用

研究課題名(英文)Epigenetic alternation associated with metastasis in gastrointestinal cancer

研究代表者

安田 裕美(Yasuda, Hiromi)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60586767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉移行に関わるmiR-200cは原発巣に比べ遠隔転移巣で有意に発現が上昇し、miR-200cのメチル化レベルは遠隔巣にて有意に低下していた。つまり原発巣からの癌細胞の解離ならびに遠隔部位における転移形成にはmiR-200cのメチル化、脱メチル化によるmiR-200cの発現調整とそのtarget 遺伝子のZEB-1発現制御によって引き起こされているというメカニズムを示した。血清miR-200cレベルは癌患者の進行度とともに有意に高くなり、特に遠隔転移を有する患者で発現が高かった。血清miR-200cは癌患者の予後との関連もあり、独立予後規定因子ならびに再発規定因子でもあった。

研究成果の概要(英文)：Distant metastasis tissues showed higher expression of miR-200c and miR-141 than did primary GICs, which was significantly associated with hypomethylation of the promoter region of these miRNAs. Transfection of miR-200c precursors resulted in enhanced cell proliferation but reduced invasion and migration behaviours in cancer cell lines, and caused reduced expression of putative gene targets, and resulted in epithelial-mesenchymal transition. In addition, high serum miR-200c demonstrated a significant positive correlation with lymph node metastasis, distant metastasis, and prognosis. More importantly, serum miR-200c was an independent predictor for lymph node metastasis and tumor recurrence and emerged as an independent prognostic marker.

In conclusion, miR-200c, epigenetically regulated, plays an important role in mediating EMT and metastatic behaviour in GIC. Serum miR-200c has strong potential to serve as a noninvasive biomarker for GIC prognosis and predicting metastasis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：microRNA エピジェネティック 消化器癌

1. 研究開始当初の背景

消化器癌(胃癌、大腸癌)の腹膜播種は難治の遠隔転移形式として挙げられ、病勢が進行すると、癌性腹膜炎の状態となり、全身状態は急速に悪化する。近年、抗癌剤の進歩により、消化器癌に対する全身化学療法の効果が期待できる現代さえ、予後不良と言わざるを得ない。遠隔転移は癌細胞の原発腫瘍からの解離、循環系への移行、そして多臓器への接着・増大というステップがあり、この一連の過程において遠隔転移に関わる因子があるが、それらがどの様に関連し成立しているのか、いまだ十分には解明されておらず、この機序解明が新たな治療法の開発に貢献する可能性がある

2. 研究の目的

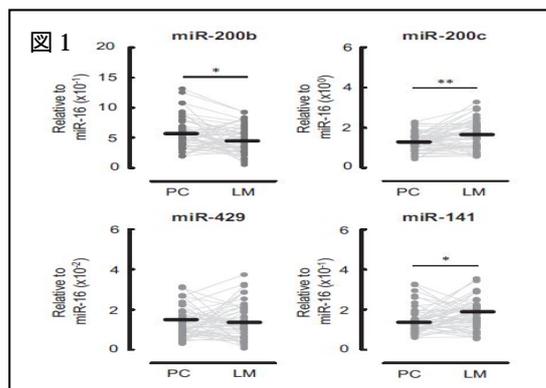
遠隔転移は原発巣からの腫瘍の解離(上皮間葉移行:EMT)と遠隔部位の腫瘍形成(間葉上皮移行:MET)による EMT-MET switch が重要であるという仮説から、

- (1) EMT の中心的な役割を果たす miR-200 family に着目し、同一個体の癌の原発巣、遠隔転移巣における発現を検証した。
- (2) miR-200 family 発現を制御する機構をメチル化の観点から検討し、miR-200 family の癌細胞における機能的意義を検証した。
- (3) 癌原発巣ならびに血清 miR-200family の発現を検討して、その臨床病理学的意義を検証した。

3. 研究の方法

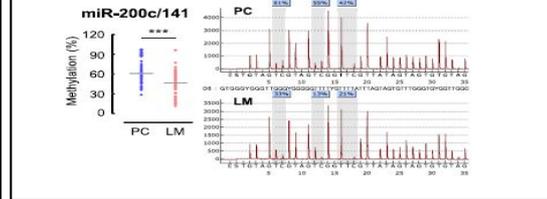
- (1) 癌原発巣とその遠隔転移巣の miR-200 family 発現を real time PCR 法にて定量した。
- (2) 癌原発巣とその遠隔転移巣の miR-200 family のメチル化を pyrosequencing 法にて解析した。
- (3) miR-200c の癌細胞株での機能解析とその target 遺伝子の解析。Anti-miR-200c および miR-200c mimic を遺伝子導入し、MTT assay, Invasion assay, migration assay 等を行い転移能に関して検討した。さらに、ルシフェラーゼ assay にて miR-200c の target 遺伝子を確定した。
- (4) 癌原発巣ならびにその患者の血清 miR-200c 発現を real time PCR 法にて定量して、臨床病理学的意義の検証を行った。

4. 研究成果



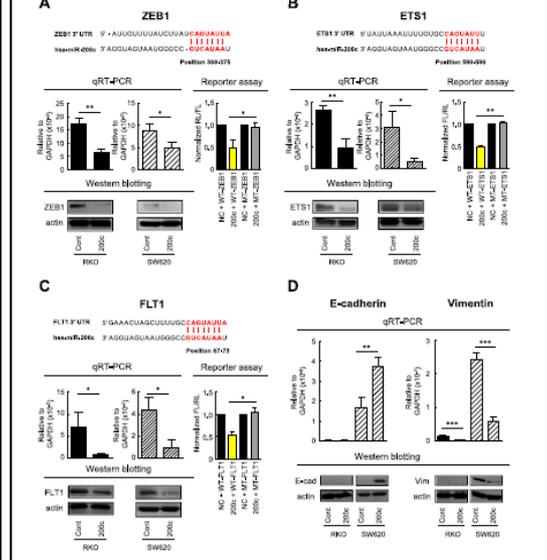
- (1) 図 1 に示すように、miR-200c ならびに miR-141 は原発巣に比べ遠隔転移巣で有意に発現が高かった。

図 2

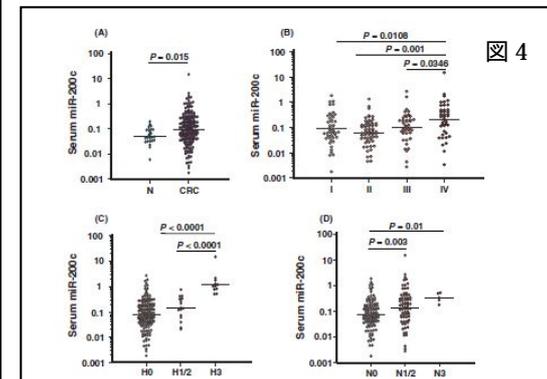


- (2) 図 2 に示すように miR-200c/miR-141 のメチル化レベルは原発巣に比べ遠隔転移巣で有意に低く、発現レベルとメチル化レベルは有意に負の相関を示すことから、miR-200c/miR-141 発現はこのメチル化により制御されていることが示された。

図 3

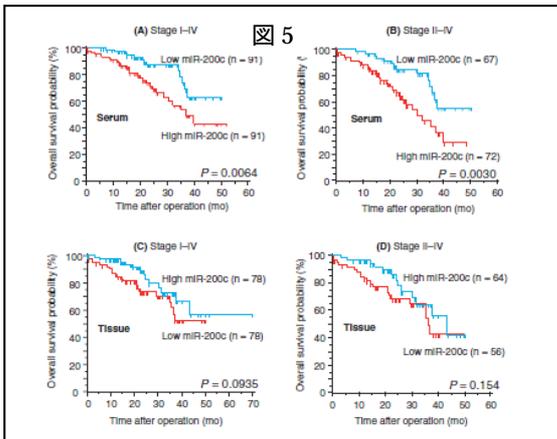


- (3) 図 3 に示すように miR-200c の遺伝子導入を行ったところ、増殖能に関しては特に変化を認めなかったが、有意に浸潤能、移動能の抑制が認められた。ルシフェラーゼ assay により miR-200c の target 遺伝子(ZEB1, EST1 ならびに FLT1)の抑制効果を確認した。

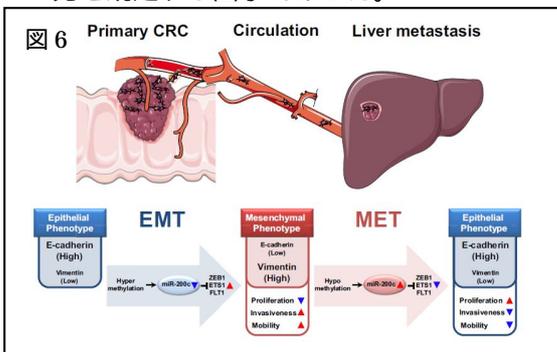


- (4) 図 4 に示すように癌患者の血清 miR-200c 発現は有意に健常者より発現が高く、癌の進行度(TNM stage)が悪化するにつれて発現が高くなることが示された。特に転移を認める患者(リンパ節転移、腹膜

播種転移、肝転移)で有意に発現が高くなった。さらに多変量解析では、血清 miR-200c 発現は独立した遠隔転移の危険因子であった。



(5) 図5に示すように腫瘍組織内の miR-200c 発現ではなく、血清中の miR-200c 発現レベルが高い群で有意に予後不良であった。また多変量解析では、血清 miR-200c 発現レベルは独立した予後因子、ならびに再発を規定する因子であった。



(6) 図6に示すように原発巣からの癌細胞の解離ならびに遠隔部位における転移形成には miR-200c のメチル化、脱メチル化による miR-200c の発現調整とその target 遺伝子の ZEB-1 発現制御によって引き起こされているというメカニズムを示した。さらに遠隔転移巣で発現が高くなる現象からそれを血清レベルで測定することで、独立予後規定因子ならびに再発規定因子としての意義も示された。

##### 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4件)

間山裕二、奥川喜永、田中光司、井上靖浩、毛利靖彦、植正人

MicroRNA を用いた非侵襲的大腸癌診断の現状と展望 日本消化器病学会雑誌 111(3): 482-494 2014

Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, Goel A.

Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in

patients with colorectal cancer. Ann Surg. 2014 Apr;259(4):735-743.

Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Goel A, Kusunoki M. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. Carcinogenesis. 2013 Nov;34(11): 2548-2557.

Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, Hemmi H, Koi M, Boland CR, Goel A. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. Gut. 2013 Sep;62(9):1315-1326.

[学会発表](計4件)

間山裕二、井上靖浩、川村幹雄、川本文、奥川喜永、三枝晋、廣純一郎、田中光司、毛利靖彦、植正人

血清転移巣由来と考えられる血清 microRNAs の大腸癌バイオマーカーとしての意義 日本大腸肛門病学会 2013年11月15-16日京王プラザ (東京都 新宿区)

間山裕二、井上靖浩、沖上正人、川村幹雄、川本文、奥川喜永、三枝晋、廣純一郎、田中光司、毛利靖彦、Boland CR、Goel Ajay、植正人

Serum microRNA-200c and -203 as novel prognostic and metastasis predictive biomarkers in patients with colorectal cancer 日本癌学会 2013年10月3-5日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[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

安田裕美 (Hiromi Yasuda)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60586767

(2) 研究分担者

問山裕二 (Yuji Toiyama)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：26462011

井上靖浩 (Yasuhiro Inoue)  
三重大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20324535

楠 正人 (Masato Kusunoki)  
三重大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：50192026