

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 研究活動スタート支援
 研究期間： 2011 ～ 2012
 課題番号： 23890083
 研究課題名（和文） 大腸癌肺転移形成に関与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） Molecular mechanism of epigenetic alteration associated with lung metastasis formation in colorectal cancer and therapeutic application based on the mechanism.
 研究代表者
 藤川裕之（FUJIKAWA HIROYUKI）
 三重大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号： 40616091

研究成果の概要（和文）：上皮間葉移行に関わる MicroRNA-200c はエピジェネティックな制御により原発部位に比べ有意に癌転移部位で高発現であることを証明した。またこの実験結果をもとに、癌転移部位（リンパ節転移、肝転移）から分泌される microRNA-200c を血清で測定することで、大腸癌術後再発ならびに予後不良な患者を選択できることを証明した。

研究成果の概要（英文）： We showed that EMT-MET switch are regulated by promoter methylation status of CpG island of miR-200c family and expression of miR-200c in metastatic sites is significantly higher than that in primary sites. In addition, we demonstrated that serum miR-200c has a strong potential to serve as a noninvasive biomarker for CRC prognosis and predicting metastasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：大腸癌、遠隔転移、microRNA、epigenetic

1. 研究開始当初の背景

本研究において大腸癌遠隔転移（肺、肝臓）に関与する DNA methylation とそれに制御される microRNA に着目し、これを網羅的に解析することで大腸癌遠隔転移のメカニズムを解明し、大腸癌患者遠隔転移の新たな分子学的診断法だけでなく治療戦略を確立し、その予後・QOL の向上を目指すことを目標とした。

2. 研究の目的

本研究は大腸癌の転移機序を microRNA の epigenetic な制御から解明することで、今回特に転移の初期から後期に関わる上皮間葉移行のメカニズムに着目し、その制御に関わる中心的な microRNA (miR-200 family) のメチルとその発現を検討し、大腸癌の治療戦略としての意義を検証することである。

3. 研究の方法

1. 転移形成における EMT-MET switch 制御メカニズムの解明(miR-200c に着目して)

1. 同意が得られた大腸癌原発組織、同一患者の遠隔転移組織を用い、miR-200c の発現ならびに promoter 領域の CpG アイランドのメチレーションレベルの測定。

2. miR-200c 遺伝子導入に伴う大腸癌細胞の機能変化に関する評価。

3. miR-200c 遺伝子導入に伴う標的遺伝子の制御と EMT 関連蛋白の発現制御。

2. miR-200 family の遠隔転移同定バイオマーカーとしての意義

1. 同意が得られた大腸癌患者の血清ならびに原発腫瘍組織、健常者の血清ならびに正常粘膜組織を用い、miR-200 family の発現を検討し、臨床病理学的因子ならびに予後との関連を検証。

4. 研究成果

1. 転移形成における EMT-MET switch 制御メカニズムの解明(miR-200c に着目して)

1. **発現**：ホルマリン固定された原発性大腸癌 (n=54) とその肝転移 (n=54) から癌部を micro-dissection し total RNA を抽出し、miR-200 family (miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429) の発現を real-time PCR で比較検討した。miR-200b は原発大腸癌に比べ遠隔転移巣にて発現が抑制されていたが、miR-200c/141 cluster は遠隔部位にて有意に発現が亢進していた。次に、特に発現差の大きい miR-200c に着目し、原発大腸癌とその肝転移巣の発現を In site hybridization にて確認した。原発大腸癌に関しては、進行癌は早期癌に比べ、有意に miR-200c 発現が低下しており、invasive front で有意に発現が低下していた。また原発大腸癌とその肝転移における miR-200c の染色比較では、有意に肝転移において発現が高く、real time PCR の結果と一貫性を示した。

メチレーション：ホルマリン固定された原発性大腸癌 (n=54) とその肝転移 (n=54) から癌部を micro-dissection し DNA を抽出し、バイサルファイト処理後、miR-200c のプロモーター領域におけるメチレーションレベルをパイロシークエンス法にて比較定量した。原発大腸癌部位における miR-200c のメチレーションレベルは同一患者の遠隔転移部位のそれに比べ有意に高く、メチレーションレベルと発現は有意に負の相関を認めた。

2. 大腸癌細胞株 RK0, SW620 を用い、miR-200c precursor, negative control をトランスフェクションし miR-200c の細胞株に及ぼす影響を比較検討した。

MTT assay: miR-200c 高発現細胞株は有意に増殖能が亢進した。

Cell Migration & Invasion assay: miR-200c 高発現細胞株は有意に移動能、浸潤能が抑制された。

Wound healing assay: miR-200c 高発現細胞株は有意に wound healing 能が抑制された。

3. 大腸癌細胞株 RK0, SW620 を用い、miR-200c precursor, negative control をトランスフェクションし target gene と推測される ZEB-1, EST-1 そして FLT-1 の遺伝子発現、タンパク発現を real-time PCR 及び western blotting で検討した。

上記 3 遺伝子発現は miR-200c 導入細胞株で有意に抑制され、タンパクレベルも同様の結果であった。

大腸癌細胞株に ZEB-1, EST-1 そして FLT-1 3' UTR 部位の WT, MT を持つ遺伝子配列をルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み遺伝子導入し、miR-200c precursor, negative control をトランスフェクションすることで、miR-200c と ZEB-1, EST-1 そして FLT-1 の直接的な抑制効果を証明した。

1. 結果のまとめ

原発大腸癌部位においては、miR-200c の promoter 部位の hypermethylation が miR-200c 発現を低下させ、target gene である EMT の転写因子 ZEB-1, EST-1 そして FLT-1 を発現誘導し、転移の初期現象として原発巣からの癌解離を誘発していることが証明された。一方で、遠隔転移巣 (肝転移部位) では hypomethylation による miR-200c/miR-141 cluster の発現を上昇させ、MET の機構を誘導することで、肝臓における腫瘍増殖に働くことが示された。

2. miR-200 family の遠隔転移同定バイオマーカーとしての意義

Screening step として Stage IV 大腸癌患者血清 (n=12) ならびに Stage I 大腸癌血清 (n=12) を用い、miR-200 family (miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429) の発現を比較検討したところ、miR-200c のみ Stage IV 大腸癌で Stage I 大腸癌に比較し有意に発現レベルが高かった ($p < 0.05$)。以上より miR-200c に着目し Validation step を行った。

Validation step として、大腸癌患者血清 (n=184)、健常者血清 (n=24) を用い、血清 miR-200c レベルを測定した。血清 miR-200c レベルは健常者に比べ、大腸癌患者で有意に高く ($p = 0.015$)、TNM stage の進行とともに高くなった (I vs. IV: $p = 0.0108$, II vs. IV: $p = 0.010$, III vs. IV: $p = 0.0346$)。血清 miR-200c 高値群は有意にリンパ節転移 ($p = 0.0026$)、肝転移 ($p = 0.0016$)、遠隔転移 ($p = 0.0023$) と相関を示し、N stage, H stage の進行とともに発現レベルが高くなり、血清 miR-200c 高値群は独立したリンパ節転移同

定因子 (HR:4.81, 95% CI: 1.98-11.7, p=0.0005)であった。

血清 miR-200c レベルと大腸癌患者の予後との検討では、血清 miR-200c 高値群は独立した予後規定因子 (HR: 2.67, 95%CI: 1.28-5.67, p=0.01)であり、興味深い知見として、stage II 大腸癌患者において、独立した術後再発を規定する因子でもあった。

同一大腸癌患者の癌組織 (n=156/184), 独立した大腸癌組織 (n=20) とその肝転移巣 (n=20) の miR-200c 発現も合わせて測定した結果、TNM stage の進行とともに発現が下がり、Stage IV 大腸癌では Stage I 大腸癌に比べ有意に低下していた (p=0.023)。また原発大腸癌とその肝転移巣での比較検討では、転移巣で有意に miR-200c 発現が高く、(p=0.0135)。In site hybridization では肝転移巣で原発巣に比べ有意に染色濃度が高かった。

2. 結果のまとめ

大腸癌転移巣由来の可能性のある血清 miR-200c はリンパ節転移、遠隔転移患者や予後不良患者の選別に有用なマーカーの可能性が示唆された。

3. 結語

遠隔部における転移形成に必要な MET 現象は miR-200c/miR-141 cluster の promoter 領域における epigenetic な変化 (hypomethylation) による高発現によって誘導され、血中に分泌された miR-200c は遠隔転移 (微小転移) を同定することが可能であり、新規の予後、再発患者を規定するバイオマーカーであった。

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 10 件)

1. 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. *Annals of Surg.* 2013 in press (査読あり)
2. Iwata T, Tanaka K, Inoue Y, Toiyama Y, Hiro J, Fujikawa H, Okugawa Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3a) is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2013;107:160-6. (査読あり)
3. 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.* 2012 Jul 10. (査読あり)
4. Fujikawa H, Tanaka K, Toiyama Y, Saigusa S, Inoue Y, Uchida K, Kusunoki M. High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT induction in colorectal cancer cells. *J Gastroenterol.* 2012;47:775-84. (査読あり)
5. Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Iwata T, Fujikawa H, Saigusa S, Konishi N, Tanaka K, Uchida K, Kusunoki M. Clinical significance of serum soluble E-cadherin in colorectal carcinoma. *J Surg Res.* 2012;175:e67-73. (査読あり)
6. Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Okugawa Y, Fujikawa H, Matsushita K, Uchida K, Inoue Y, Kusunoki M. Prognostic significance of glucose transporter-1 (GLUT1) gene expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Surg Today.* 2012;42:460-9. (査読あり)
7. Toiyama Y, Fujikawa H, Kawamura M, Matsushita K, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Evaluation of CXCL10 as a novel serum marker for predicting liver metastasis and prognosis in colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2012;40:560-6. (査読あり)
8. Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Fujikawa H, Matsushita K, Okugawa Y, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Inhibition of HGF/cMET expression prevents distant recurrence of rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Int J Oncol.* 2012 40:583-91. (査読あり)
9. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Matsushita K, Fujikawa H, Tanaka K, Mohri Y, Inoue Y, Goel A, Kusunoki M. Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer. *Int J Cancer.* 2012;130:2912-21. (査読あり)

10. Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Fujikawa H, Matsusita K, Kawamura M, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Cancer-associated fibroblasts correlate with poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy.
Int J Oncol. 2011 38:655-63.(査読あり)

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤川裕之 (FUJIKAWA HIROYUKI)

三重大学・医学部附属病院・医員

研究者番号： 40616091