

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10134

研究課題名(和文) 大腸癌腹膜播種に関するmicroRNAの網羅的解析と治療戦略

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of microRNAs associated with peritoneal dissemination of colorectal cancer and treatment strategy

研究代表者

藤川 裕之 (Fujikawa, Hiroyuki)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40616091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌腹膜播種進展ひいては転移進展の診断マーカーとその機序を解明するために、大腸癌腹膜播種患者の原発組織ならびに、血清microRNAの網羅的解析を行った。とくに大腸癌患者血清と健常人血清の比較において大腸癌患者血清で有意に発現上昇するmiR-1290が、癌進展にかかわるoncogenic miRNAであることを確認するとともに、組織においてのみならず血清において大腸癌患者で有意に発現上昇し、有用な早期診断・予後マーカーであった。さらに血清miR-1290は腹膜播種転移陽性患者群で有意に発現上昇し、腹膜播種診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify miRNA biomarkers for peritoneal metastasis in colorectal cancer and to clarify the functional mechanism of these miRNAs for development of peritoneal metastasis, we performed array-based comprehensive analysis. From this result, we demonstrated that serum miR-1290 was significantly increased in CRC patients compared to healthy volunteers, and increased serum miR-1290 was significantly correlated with recurrence and poor survival in CRC. Especially, serum miR-1290 was significantly increased in CRC patients harboring peritoneal metastasis, and suggested that serum miR-1290 might be used as a predictive biomarker for peritoneal metastasis in CRC patients.

研究分野：Colorectal cancer

キーワード：大腸癌 腹膜播種 microRNA

1. 研究開始当初の背景

【大腸癌患者の推移】

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おり、女性においては悪性新生物による死亡者数で第1位となっている。症例が増加す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、これらに対する治療の向上が急がれている。

【大腸癌腹膜播種治療の現状】

大腸癌で最も多い遠隔転移臓器は肝臓であり、腹膜播種、肺が続く。肝転移に対しては全身化学療法を中心に、近年では肝切除による腫瘍の完全切除や熱凝固療法などの局所療法の導入により肝転移症例において生存率の向上が得られてきている。一方、腹膜播種症例は肉眼的完全切除を行っても腹腔内に微小な腫瘍組織が遺残するため従来から治療困難な病態と考えられてきた。しかしながら、近年になり減量手術としての腹膜切除 (cytoreductive surgery; CRS) と周術期腹腔内化学療法による集学的治療が腹膜播種症例の予後を改善させることが知られてきている。特に CRS と腹腔内温熱化学療法 (HIPEC) を組み合わせた治療が最も予後の改善が得られていると報告されている。我々も 2014 年よりこの CRS+HIPEC による腹膜播種治療を導入した。しかしながらその予後はいまだ不良であるため、腹膜播種診断マーカー、予測マーカーの開発と播種形成の機序を解明することは、あらたな腹膜播種治療における戦略を変える可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、大腸癌腹膜播種患者の原発組織ならびに、血清・腹水中 microRNA の網羅的解析を行い、腹膜播種と密に関連する microRNA 関連候補を同定し、予後との関連を検討する。これは、大腸癌腹膜播種の新たな診断法を確立することにより、腹膜播種高リスク群を抽出し、新たな治療戦略の構築、腹膜播種患者の予後・QOL の向上をめざすことを目的とする。

3. 研究の方法

・MicroRNA 発現網羅的解析：腹膜播種転移陽性大腸癌 5 例、腹膜播種転移陰性大腸癌 3 例、正常大腸粘膜 3 例と、その患者血清を使用し、microRNA アレイ D-Gene Human miRNA Oligo chips (Toray, Kamakura, Japan) を施行した

・RNA 抽出(組織)

・大腸癌組織 180 例の原発腫瘍、近傍正常大腸粘膜より採取した FFPE 標本から RNA を miRNeasy FFPE RNA extraction kit (Qiagen) を利用して抽出した。

・RNA 抽出(血清)

大腸癌患者の術前血清 200ul より miRNeasy serum/plasma RNA extraction kit (Qiagen) を使用して RNA を抽出した。また RNA 抽出過程において cel-miR-39 を添加し、定量 PCR の際の normalizer に使用した。

・定量的 PCR

大腸組織より抽出した RNA を用い miRNA の定量解析は、Taqman primer と Taqman microRNA RT kit を利用して microRNA-specific な逆転写を施行したうえで、qPCR を同様に施行した。また normalizer には組織には miR-16、血清には cel-miR-39 を使用した。

・In vitro 解析

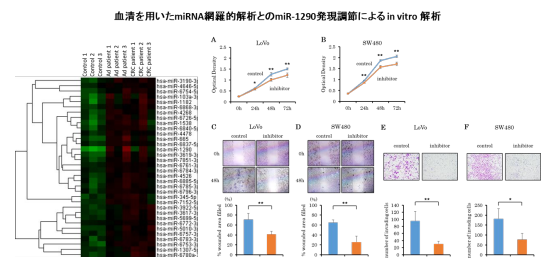
大腸癌細胞株を使用し、候補遺伝子を lipofectamine RNAi Max (Invitrogene) を利用し、lipofection 法で、siRNA transfection で遺伝子発現抑制を行ったうえで、MTT assay、Invasion assay、migration assay などをおこない、遺伝子発現調節による phenotype の変化を評価した。

4. 研究成果

大腸癌腹膜播種進展については転移進展の診断マーカーとその機序を解明するために、大腸癌腹膜播種患者の原発組織ならびに、血清 microRNA の網羅的解析を行った。

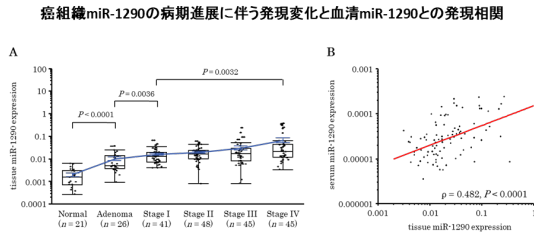
大腸癌組織と正常粘膜組織との比較においては、多くの miRNA が同定されたものの、播種転移進展の有無に伴う原発組織の検討においては、同定できた候補 miRNA は少なく、さらに血清での同様の比較検討で重複するものを同定することを試みたが、残念ながら重複する候補 miRNA は同定することができなかった。

以上の背景から、他の比較検討を利用する方向に切り替え、大腸癌患者と健常人血清の比較検討で同定できた miR-1290 に着目し、まずはこの miR-1290 の癌進展における機能解析を優先する方向とした(下図)。



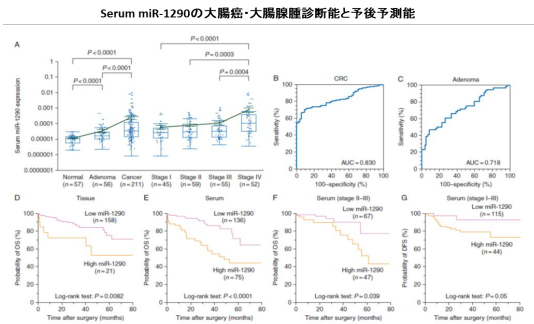
miR-1290 を miRNA Inhibitor を使用して siRNA transfection を行うと、増殖能、遊走能、浸潤能は抑制されることがあきらかとなり、miR-1290 は癌進展に深くかかわる Oncogenic miRNA である可能性が示唆された。

さらに大腸癌組織と正常粘膜の発現比較を行うと miR-1290 は有意に癌組織で発現上昇をみとめた。さらに癌組織における miR-1290 は病期進展に伴い発現上昇をきたすことが明らかとなった(下図)。



以上の背景から、miR-1290 は、がん遺伝子で大腸癌組織特異的に発現増加をきたすことから、血清を用いた非侵襲的バイオマーカーになる可能性があるため、血清より抽出したRNA を利用し、miR-1290 の発現解析を行った。

興味深いことに、血清 miR-1290 は、癌組織発現と有意な正の相関を認め、さらに病期進展に伴い、発現上昇をきたすため、有用な予後予測・再発予測マーカーとなるほか、大腸癌診断マーカーとなりうることがわかった。



さらに癌組織と血清 miR-1290 発現と臨床病理学的因子との相関解析を行うと、癌組織ではなく、血清中 miR-1290 発現が、腹膜播種陽性大腸癌症例で有意に上昇していることが明らかとなり(p<0.0001)、腹膜播種診断非侵襲バイオマーカーへの転用の可能性も考慮された(Imaoka H, Fujikawa H et al. Ann Oncol. 2016 Oct;27(10):1879-86)。  
また本研究に付随して、リンパ節特異的発現組織・血清miR-1290の腹膜播種含む臨床病理学因子との相関

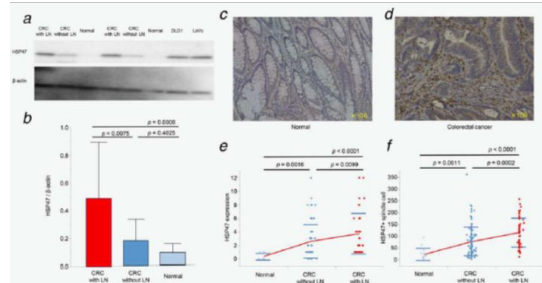
Table 3. Correlation between serum miR-1290 expression level and clinicopathological features in colorectal cancer patients.

Variables	Low miR-1290 expression (n=176)		High miR-1290 expression (n=111)		P-value
	n	Mean ± SD	n	Mean ± SD	
Age (years)					
≤67	88	60.48 ± 9.574	51	59.7	0.8939 ± 0.0011
>67	88	62.57 ± 9.646	60	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
Gender					
Male	107	62.16 ± 9.563	59	59.9	0.8822 ± 0.0008
Female	72	62.52 ± 9.539	52	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
Histology					
Well/moderately differentiated	117	62.52 ± 9.537	69	59.9	0.8827 ± 0.0008
Poorly differentiated	59	62.46 ± 9.596	42	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
Stroma (mm)					
<40	88	62.59 ± 9.576	56	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
≥40	88	62.46 ± 9.596	55	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
Lymphatic invasion					
Negative	137	62.52 ± 9.535	82	59.9	0.8827 ± 0.0008
Positive	42	62.59 ± 9.587	29	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
Nerve invasion					
Negative	97	62.52 ± 9.532	52	59.9	0.8822 ± 0.0008
Positive	79	62.46 ± 9.592	59	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
T classification					
T3/T4	117	62.52 ± 9.533	67	59.9	0.8822 ± 0.0008
T3/T4	59	62.46 ± 9.592	44	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
Lymph node metastasis					
Negative	87	62.59 ± 9.573	52	59.9	0.8822 ± 0.0008
Positive	89	62.46 ± 9.596	59	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
Liver metastasis					
Negative	149	62.52 ± 9.526	82	59.9	0.8822 ± 0.0008
Positive	27	62.46 ± 9.592	29	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
Peritoneal metastasis					
Negative	165	62.52 ± 9.526	82	59.9	0.8822 ± 0.0008
Positive	14	62.57 ± 9.536	29	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
Distant metastasis					
Negative	116	62.57 ± 9.543	59	59.9	0.8822 ± 0.0008
Positive	59	62.46 ± 9.592	52	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
TNM stage					
I	41	62.59 ± 9.573	26	59.9	0.8822 ± 0.0008
II	41	62.59 ± 9.573	29	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
III	41	62.59 ± 9.573	29	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
IV	41	62.59 ± 9.573	29	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008
II-IV	41	62.59 ± 9.573	29	62.86 ± 9.698	0.8822 ± 0.0008

SD, standard deviation; TNM, tumor node metastasis.  
The smallest age and tumor size were 47 years and 40 mm, respectively (both serum and tissue culture).  
Significant associations were shown in bold (P < 0.05).

をきたす蛋白の同定も行っており、蛋白網羅的解析で同定された HSP47 の大腸癌組織発現は、リンパ節転移陽性症例を同定することが可能となる可能性も報告している。

大腸癌組織HSP47発現のリンパ節転移との相関解析



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8件)

Prognostic impact of sarcopenia and its correlation with circulating miR-21 in colorectal cancer patients. Okugawa Y, Yao L, Toiyama Y, Yamamoto A, Shigemori T, Yin C, Omura Y, Ide S, Kitajima T, Shimura T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Kobayashi M, Tanaka K, Inoue Y, Araki T, Miki C, Kusunoki M. Oncol Rep. 2018 Apr;39(4):1555-1564(査読あり)

Successful identification of a predictive biomarker for lymph node metastasis in colorectal cancer using a proteomic approach. Mori K, Toiyama Y, Otake K, Ide S, Imaoka H, Okigami M, Okugawa Y, Fujikawa H, Saigusa S, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Kobayashi Y, Mohri Y, Kobayashi I, Goel A, Kusunoki M. Oncotarget. 2017 Oct 30;8(63):106935-106947. (査読あり)

Prognostic Impact of Preoperative Albumin-to-Globulin Ratio in Patients with Colon Cancer Undergoing Surgery with Curative Intent. Fujikawa H, Toiyama Y, Inoue Y, Imaoka H, Shimura T, Okigami M, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Saigusa S, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, Mohri Y, Kusunoki M. Anticancer Res. 2017 Mar;37(3):1335-1342. (査読あり)

Proteomics analysis of differential protein expression identifies heat shock protein 47 as a predictive marker for lymph node metastasis in patients with colorectal cancer.

Mori K, Toiyama Y, Otake K, Fujikawa H, Saigusa S, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Kobayashi Y, Kobayashi I, Mohri Y, Goel A, Kusunoki M.  
Int J Cancer. 2017 Mar 15;140(6):1425-1435.  
(査読あり)

MicroRNA-7 Is Associated with Malignant Potential and Poor Prognosis in Human Colorectal Cancer.  
Nagano Y, Toiyama Y, Okugawa Y, Imaoka H, Fujikawa H, Yasuda H, Yoshiyama S, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M.  
Anticancer Res. 2016 Dec;36(12):6521-6526.  
(査読あり)

Circulating microRNA-1290 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in human colorectal cancer.  
Imaoka H, Toiyama Y, Fujikawa H, Hiro J, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Mori T, Kato T, Toden S, Goel A, Kusunoki M.  
Ann Oncol. 2016 Oct;27(10):1879-86. (査読あり)

Serum Angiopoietin-like Protein 2 Improves Preoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer.  
Toiyama Y, Inoue Y, Shimura T, Fujikawa H, Saigusa S, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, Tanaka K, Mohri Y, Kusunoki M.  
Anticancer Res. 2015 May;35(5):2849-56.  
(査読あり)

Systemic Analysis of Predictive Biomarkers for Recurrence in Colorectal Cancer Patients Treated with Curative Surgery.  
Mori K, Toiyama Y, Saigusa S, Fujikawa H, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, Inoue Y, Tanaka K, Mohri Y, Kusunoki M.  
Dig Dis Sci. 2015 Aug;60(8):2477-87(査読あり)

〔学会発表〕(計 11 件)

藤川裕之、間山裕二、沖哲、大村悠介、井出正造、北嶋貴仁、安田裕美、奥川喜永、吉山繁幸、廣 純一郎、小林美奈子、大井正貴、荒木俊光、楠 正人：当科における大腸癌腹膜播種に対するCRS+HIPECの適応.日本ハイパーサーミア学会第 34 回大会、京都、2017.9.16

藤川裕之、間山裕二、志村匡信、今岡裕基、沖上正人、安田裕美、奥川喜永、大北喜基、吉山繁幸、廣純一郎、三枝晋、

井上幹大、小林美奈子、大井正貴、荒木俊光、田中光司、井上靖浩、内田恵一、毛利靖彦、楠 正人：遠隔転移を伴う大腸癌患者における原発巣切除後の集学的治療導入可否因子の同定.第 117 回日本外科学会定期学術集会、横浜、2017.4.27

重盛恒彦、井上靖浩、沖上正人、藤川裕之、廣 純一郎、間山裕二、小林美奈子、毛利靖彦、楠 正人：繰り返す減量手術と腹腔内温熱化学療法で延命している虫垂癌腹膜播種の 1 例.日本臨床外科学会三重県支部会第 287 回三重外科集談会、津、2016.12.11

藤川裕之、間山裕二、今岡裕基、沖上正人、廣純一郎、三枝 晋、小林美奈子、大井正貴、荒木俊光、田中光司、井上靖浩、内田恵一、毛利靖彦、楠 正人：結腸癌根治手術後における術前血清炎症性マーカーと予後との関連.JDDW2016 第 24 回日本消化器関連学会週間第 14 回日本消化器外科学会大会、神戸、2016.11.5

沖上正人、井上靖浩、今岡裕基、藤川裕之、廣 純一郎、間山裕二、小林美奈子、大井正貴、毛利靖彦、楠 正人：消化器癌腹膜播種に対する減量手術・腹腔内温熱化学療法導入時の取り組みとその評価.日本ハイパーサーミア学会第 33 回大会、つくば、2016.9.3

藤川裕之、間山裕二、今岡裕基、沖上正人、廣純一郎、小林美奈子、田中光司、井上靖浩、毛利靖彦、楠 正人：結腸癌根治手術後における血清 Albumin Globulin Ratio(AGR)と予後との関連.第 71 回日本消化器外科学会総会、徳島、2016.7.15

Toiyama Y, Imaoka H, Fujikawa H, Hiro J, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Mori K, Kato T, Goel A, Kusunoki M:Circulating microRNA-1290 as a novel diagnostic biomarker in human colorectal cancer. Annual Meeting 2016, New Orleans, Apr 18, 2016

藤川裕之、井上靖浩、志村匡信、奥川喜永、廣 純一郎、間山裕二、小林美奈子、大井正貴、荒木俊光、田中光司、内田恵一、毛利靖彦、楠 正人：進行再発大腸癌における原発部位が転移巣治療に及ぼす影響.第 70 回日本大腸肛門病学会学術集会、名古屋、2015.11.13

藤川裕之、井上靖浩、沖 哲、志村匡信、廣純一郎、間山裕二、田中光司、内田恵一、毛利靖彦、楠 正人：大腸癌における腹膜播種再発と臨床病理学的因子の検

討. 第 70 回日本消化器外科学会総会、浜松、2015.7.17

沖 哲、井上靖浩、志村匡信、廣純一郎、三枝 晋、問山裕二、小林美奈子、田中光司、毛利靖彦、楠 正人：大腸癌腹膜播種に対し、全身化学療法後の減量手術、腹腔内温熱化学療法を用いた集学的治療の検討. 第 70 回日本消化器外科学会総会、浜松、2015.7.17

Toiyama Y, Kitajima T, Imaoka H, Kawamura M, Fujikawa H, Hiro J, Saigusa S, Kobayashi M, Araki T, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M: MicroRNA-503 promotes tumor progression and acts as a novel biomarkers for early recurrence and poor prognosis in human colorectal cancer. Annual Meeting 2015, Pennsylvania, April 22, 2015

〔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：該当なし

## 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・助教  
研究者番号：40616091

### (2) 研究分担者

問山 裕二 (TOIYAMA, Yuji)  
三重大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：00422824

井上 靖浩 (INOUE, Yasuhiro)  
三重大学・医学系研究科・客員准教授  
研究者番号：20324535

楠 正人 (KUSUNOKI, Masato)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：50192026

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし