

表 題 大腸癌臨床検体における腫瘍内不均一性を考慮した  
上皮間葉移行と転移の関係についての検討

論文の区分 博士課程

著 者 名 武藤 雄太

担当指導教員氏名 力山 敏樹 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系 専攻  
総合医学 分野  
外科系総合医学

2016年1月8日申請の学位論文

## 目次

はじめに	p.2-5
研究対象と方法	p.6-14
結果	p.15-26
考察	p.27-33
結語	p.34
謝辞	p.35
参考文献	p.36-42

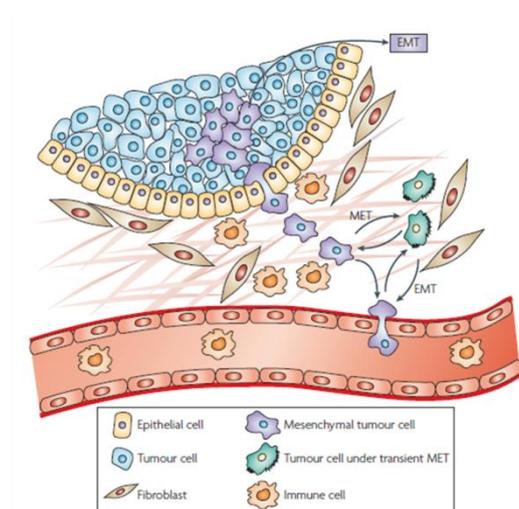
## はじめに

わが国における大腸癌罹患者数、死亡者数は年々増加しており、国立がん研究センターがん対策情報センターの統計によると 2014 年の大腸癌による死者数は約 49500 人であった。がんによる死亡者のうち、女性で 1 位、男性で 3 位となっている (1)。死者数は増加しているものの、外科治療や化学療法の進歩により治療成績は向上し、早期癌患者の 5 年生存率は 90%を越えるようになった。しかし、遠隔転移を有する大腸癌患者の予後は依然不良で、発見時に同時性遠隔転移を伴う大腸癌患者の 5 年生存率は 18.8%である (2, 3)。現在、大腸癌患者の予後を決定する最も重要な因子は転移となっており、転移の制御が大腸癌治療における喫緊の課題であり、そのためには転移の機序の解明が不可欠である。

近年、癌の転移において EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition, 上皮間葉移行) の関与が注目されている (4-7)。EMT とは上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得する現象であり、胚の発育など胎生期のイベントにおいて、さまざまな組織や器官の形成、成長、分化に重要な役割を果たしている (8)。EMT は運動能の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすため、癌の浸潤や転移においても EMT が関係しているのではないかと考えられるようになった (4)。EMT の過程では、上皮細胞は E カドヘリン (Cadherin-1, CDH1) 発現を低下させ、細胞

間接着を失う。また、中間径フィラメントがケラチンからビメンチンに置き換わり、細胞骨格が再編成される。さらに頂側膜と基底膜の極性が失われ、繊維芽細胞様の形態となり運動能が増す (9, 10) (図 1)。

図 1 Epithelial mesenchymal transition (EMT) のシエーマ



Nature reviews 2007;7(6):415-28.より転載

EMT にはさまざまな遺伝子が関わっているが、中でも SNAIL や zinc-finger E-box-binding homeobox (ZEB)、basic helix-loop-helix transcription factors などが主要な役割を果たすと考えられている (5, 7)。これらの分子は、E カドヘリンのプロモーター領域に直接結合し、E カドヘリンの発現を抑制する (7, 11)。EMT に関わる分子の活性化は TGF- $\beta$  経路、Wnt 経路、VEGF (Vascular endothelial growth factor) 経路、Notch 経路、EGF 経路、HIF 経路などのさまざまなシグナル伝達経路によって引き起こされる (12, 13)。これらのシグナ

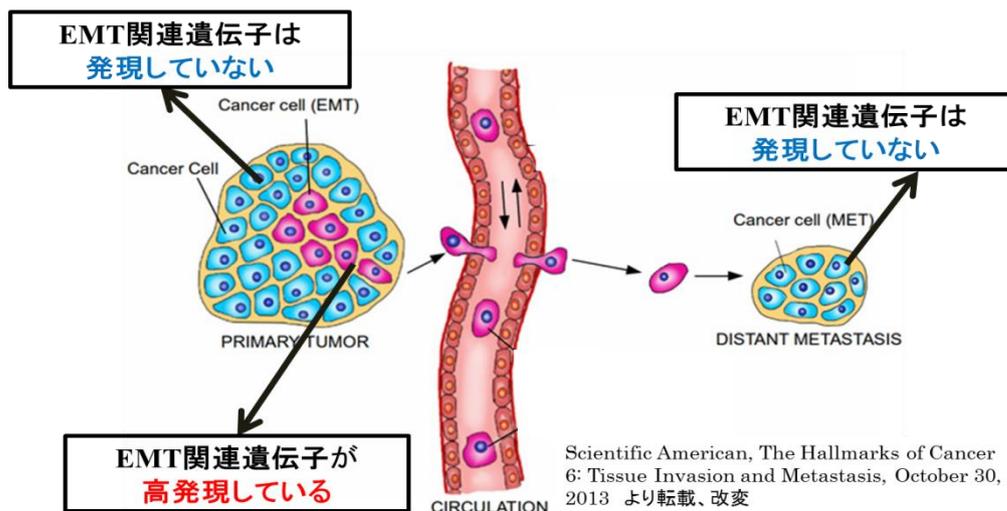
ル伝達経路は腫瘍とその微小環境の相互関係に影響し、結果として EMT を動的に制御している (5)。また、遺伝子の転写を抑制し、分解を促進させるマイクロ RNA も EMT 制御に関わっているとされている (14, 15)。

癌細胞は EMT の過程を経て間葉系の表現型になることで、浸潤能や転移能を獲得し、原発巣から遊離することが可能になると考えられている (13, 16)。しかし、EMT を制御するメカニズムやシグナル伝達経路についての報告のほとんどが培養細胞を使った実験系で行われており、これらの実験は生体内での腫瘍環境や間質から受ける影響についての検討を欠いていることがしばしば批判的になっている。そのような観点からの EMT の検討は未だ不十分であり、特にヒト臨床検体で EMT が癌の転移に必要なかどうかについては議論の余地がある (9, 12, 17, 18)。

臨床検体で EMT の証明が困難な原因として癌組織の腫瘍内不均一性が考えられる (16, 18) (図 2)。以前から腫瘍は浸潤する過程において変異を蓄積し、不均一性を有することが知られている (19)。近年、次世代シーケンサーをはじめとする新しいテクノロジーを使用した腫瘍内不均一性の証明が行われ、癌はひとつの腫瘍内でも異なる遺伝子発現プロファイルを示すことが報告されている (20-22)。現在までに様々な癌種で分子生物学的アプローチにより腫瘍内不均一性が証明されており、治療や薬剤の抵抗性にも影響することがわかってき

た (21-23)。そこで EMT の証明においても腫瘍内不均一性を考慮する必要があると考えた。

図 2 大腸癌臨床検体で EMT の証明が困難である理由



図の赤い細胞が EMT 関連遺伝子を高発現している細胞とすると、表面や転移先の青い細胞から検体採取しても EMT を捉えられない

本研究では大腸癌臨床検体を用いて EMT に関わる遺伝子の腫瘍内不均一性を調べ、転移に関与する遺伝子を同定することを目的とした。ひとつの原発性大腸癌から複数箇所の組織を採取し、大腸癌臨床検体において転移を起こす癌細胞が存在すると考えられている先進部に注目しながら腫瘍内不均一性について検討し、EMT に関連する遺伝子やシグナル伝達経路、マイクロ RNA の発現と転移の関係を調べた。

## 研究対象と方法

### 臨床検体

2013年12月から2014年12月の間に自治医科大学附属さいたま医療センターで大腸切除術を施行した8症例の遠隔転移を伴う大腸癌と8症例の遠隔転移を伴わない大腸癌から採取した組織を用いた。表1に臨床病理学的特徴を示す。腫瘍表面（管腔側）から5-10mmの部位を腫瘍中心部（Tumor center, TC）、腫瘍と筋層、漿膜あるいは他臓器との境界から1-3mmの部位を先進部（Invasive Front, IF）と定義し、各々の腫瘍でTCまたはIFの空間的に離れた数か所から検体を採取した（図3）。転移臓器を切除した6症例からは転移臓器の検体も採取し、11症例からは正常大腸粘膜の検体採取も行った（表2）。検体は採取した後、速やかに核酸保存液であるRNA later™（Ambion社製）に浸し、-80℃で保存した。遺伝子発現マイクロアレイ、リアルタイムPCRで遺伝子のmRNAの発現量を定量し、免疫組織化学法でタンパク質発現を調べた。EMTに関わるマイクロRNA発現の定量はリアルタイムPCRにより行った。マイクロアレイには8症例から採取した38検体のRNA（表1、Case 1-8）を用い、リアルタイムPCRには8症例を追加し（表1、Case 9-16）、計16症例から採取した133検体を用いた。マイクロRNAの定量に関しては、TCとIFの中からマイクロRNA

を採取するための十分な量がある検体を選び、8 症例から採取した 88 検体を使用した。免疫組織化学法には上記 16 症例のうちステージ I の早期癌患者を除いた 15 症例に、2003 年 7 月から 2014 年 12 月の間に当センターで手術を施行した大腸癌患者 65 症例の検体を加え、計 80 症例、各症例それぞれ 1 枚ずつのパラフィン包埋切片を使用した。パラフィン包埋切片の内訳は転移を有する大腸癌 33 症例、転移を有さない大腸癌 47 症例となった。全ての患者に対して研究内容について書面および口頭で説明を行い、研究に関する同意を書面で得た。また、本研究は自治医科大学遺伝子解析倫理委員会において承諾を得て行っている（承認番号 遺 12-65、許可年月日 平成 25 年 3 月 4 日）。

図 3 検体採取部位

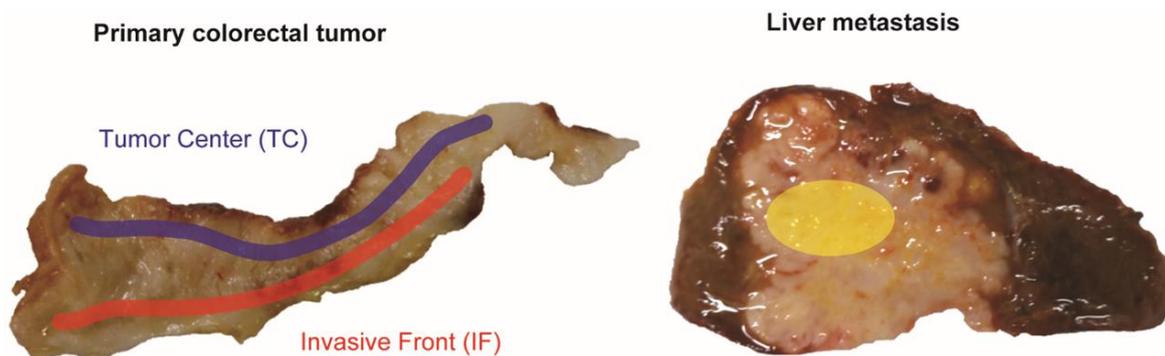


表 1 症例の臨床病理学的特徴

Case number	Sex	Age	Location <sup>1</sup>	T	N	M	UICC-Stage	Histologic type <sup>2</sup>	Distant metastasis <sup>3</sup>
1	M	65	A	T3	0	0	II A	well	no
2	M	51	R	T3	0	0	II A	well	no
3	M	79	S	T4b	0	0	II C	well	no
4	M	70	S	T4a	0	0	II B	well	no
5	M	57	R	T3	2	1a	IV a	well	liver
6	F	64	S	T4a	2	1a	IV a	mode	liver
7	F	76	T	T4a	1	1b	IV b	mode	liver, per, ovary
8	F	61	S	T4a	2	1b	IV b	mode	per, ovary
9	F	73	R	T2	0	0	I	well	no
10	F	77	A	T3	0	0	II A	well	no
11	F	78	T	T4a	1	0	III B	well	no
12	F	46	S	T3	1	0	III B	well	no
13	F	86	A	T4a	2	1a	IV a	muc	lung
14	M	78	A	T4a	2	1a	IV a	well	liver
15	M	72	R	T3	1	1a	IV a	mode	distant lymph nodes
16	F	41	S	T4a	1	1a	IV a	well	liver

1 Location. A: 上行結腸、Ascending colon、T: 横行結腸、Transversal colon、

S: S 状結腸、Sigmoid colon、R: 直腸、Rectum

2 Histologic type. well: 高分化腺癌、Well differentiated adenocarcinoma、

mode: 中分化腺癌、moderately differentiated adenocarcinoma、muc: 粘液癌、

mucinous adenocarcinoma

3 Distant metastasis. per: 腹膜播種、Peritoneal dissemination

表2 検体採取個数と部位の内訳

Case number	Normal colon tissue	Tumor center	Invasive front	Metastatic site	Other	subtotal
1	0	1	1	0	-	2
2	0	1	2	0	-	3
3	0	2	3	0	-	5
4	0	5	3	0	-	8
5	1	1	2	1	-	5
6	1	4	2	1	-	8
7	0	1	2	1	-	4
8	1	4	3	3	-	11
9	1	6	3	0	-	10
10	1	5	1	0	-	7
11	1	4	4	0	-	9
12	1	3	3	0	lymph node	8
13	1	6	6	1	-	14
14	1	11	3	4	-	19
15	1	5	6	0	-	12
16	1	5	2	0	-	8
subtotal	11	64	46	11	1	133

### 細胞株

ヒト大腸癌細胞株 4 種類 (CACO-2、COLO205、HCT116、HT-29) とヒト腎細胞癌細胞株 (VMRC-RCW) およびヒト胎児腎細胞株 (HEK293) を使用した。CACO-2 (RCB0988)、COLO205 (RCB2127)、HCT116 (RCB2979)、HEK293 (RCB1637) および VMRC-RCW (RCB1963) は理研セルバンク (RIKEN Cell Bank、RCB) から購入した。HT-29 は American Type Culture

Collection (USA) から購入した。それぞれの細胞は供給元のプロトコールに従って培養した。

## RNA 抽出

Total RNA は Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare UK 社製) と miRCURY™ RNA Isolation Kit (Exiqon 社製) を用い、プロトコールに従って抽出した。RNA の質評価と収量測定のために Nano-Drop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies 社製) による A260/280 比、A260/A230 比の測定と、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) を用いた RNA integrity number (RIN) による評価を行った。RIN 値が 7 以上のものを発現アレイ、リアルタイム PCR に用いた。

## マイクロアレイによる遺伝子発現解析

マイクロアレイは Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression 8 × 60K Ver2.0 (Agilent Technologies 社製) を用い、プロトコールは Agilent Technologies 社が提供する「One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol Version Jan.2012」に従った。

以下に実験の手順を簡潔に示す。検体から採取した 75ng の RNA を One-Color

Low Input Quick Amp Labelling Kit (Agilent Technologies 社製)を用いて Cyanine-3 (Cy3)で標識した cRNA を合成し、続いて RNeasy Mini Kit (Qiagen 社製)で精製した。Nano-Drop®で Cy3 の取り込み率と cRNA の収量を確認した後、ラベル化した 600ng の cRNA を 60°C で 30 分間フラグメント化した。Hybridization buffer を加え、ハイブリダイゼーションを行った(10 回転/分、65°C で 17 時間)。その後洗浄し、Feature Extraction (Agilent Technologies 社製)でスキャンおよび数値化を行った。各サンプルのノーマライズには Percentile shift 法を用い、各サンプルの 75 パーセンタイルの値をそろえる事でアレイ間の誤差を補正した。Universal Human Reference RNA (Agilent Technologies 社製)をコントロールとして用いた。マイクロアレイデータは Gene Expression Omnibus に登録した(accession number GSE75117)。

### リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現の定量

前述した total RNA を使い、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems 社製)を用いて、逆転写反応させ cDNA を合成した。リアルタイム PCR 法には QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社製)の機械と TaqMan® Gene Expression Assays と TaqMan® Gene Expression Master Mix を用いた。Primer およびプローブの詳細は表 3

に記す。反応条件は 95°C 10 分の後、 95°C 15 秒、 60°C 1 分を 40 サイクル行った。内因性コントロールには GAPDH を用いた。

### マイクロ RNA 発現の定量

miRCURY™ RNA Isolation Kit (Exiqon 社製)を用いて採取した 10ng の total RNA に対し miRCURY LNA™ Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon 社製)を使用し、逆転写反応を行った。miRNA の定量には microRNA LNA™ PCR primers と ExiLENT SYBR® Green master mix (Exiqon 社製)を使用した。

Primer の詳細は表 3 に記す。反応条件は 95°C 10 分の後、 95°C 10 秒、 60°C 1 分を 40 サイクル行い、最後に 95°C 15 秒、 60°C 1 分、 95°C 15 秒の反応を行った。リファレンスマイクロ RNA として miR-423-3p を用いた。

表 3 リアルタイム PCR に用いたプライマー

Target	Product number	Manufacturer
TaqMan® Gene Expression Assays		
ZEB1	Hs00232783_m1	Applied Biosystems
ZEB2	Hs00207691_m1	Applied Biosystems
SNAI1	Hs00195591_m1	Applied Biosystems
CDH1	Hs01023894_m1	Applied Biosystems
GAPDH	Hs03929097_g1	Applied Biosystems
microRNA LNA™ PCR primers		
hsa-miR-200a-3p	204707	Exiqon
hsa-miR-200b-3p	206071	Exiqon
hsa-miR-200c-3p	204482	Exiqon
hsa-miR-141-3p	204504	Exiqon
hsa-miR-423-3p	204488	Exiqon

## 免疫組織化学法

EMTに関する種々のタンパク質発現を免疫組織化学法で確認した。パラフィン包埋されていた大腸癌切除病理検体を用い、スライドガラス上に0.5 $\mu$ m厚切片を作成した。まず初めにスライドを、58 $^{\circ}$ Cのオーブン中で30分間静置させた後、脱パラフィンし組織を露出させた。抗原賦活処理を抗原回復液(10mM クエン酸ナトリウム緩衝液 pH6.0)の入ったプラスチック製染瓶に置き、電気ポット法で98 $^{\circ}$ C30分熱処理を行った。次に、内因性ペルオキシダーゼ除去を、0.3%過酸化水素水/メタノール混合溶液の入ったガラス製染瓶に置き、室温で20分反応させた。バックグラウンド染色を低減させるため5% bovine serum albumin で15分間サンプルを前処理した。一次抗体反応を抗 ZEB1 抗体(#NBP1-05987; Novus Biologicals 社製、1:500 希釈、4 $^{\circ}$ C overnight)、抗 ZEB2 抗体(#HPA003456; Sigma 社製、1:400 希釈、4 $^{\circ}$ C overnight)、抗 E カドヘリン抗体(#24E10; Cell Signaling TECHNOLOGY 社製、1:200 希釈、4 $^{\circ}$ C overnight) および抗 VEGF 抗体(#ab46154; Abcam 社製、1:200 希釈、室温30分)で行った。二次抗体反応として、抗マウス、ウサギ標準二次抗体シンプルステイン MAX-PO (ニチレイバイオサイエンス社製)を順次滴下した。発色は DAB 基質キット(DAKO 社製)を用いて5分間発色を行い、マイヤーヘマトキシリン液で対比染色した後、脱水透徹処理を行いマリノールで封入した。染色

は 40×、100×、200×で観察し評価した。

### 統計学的解析

連続変数のパラメトリック解析には Student's  $t$  検定を用い、ノンパラメトリック解析には Mann-Whitney-Wilcoxon test を用いた。また、多群間の比較にはフリーソフトの MeV を用いて一元配置分散分析(one-way factorial ANOVA)を行った (24)。名義変数の解析に関しては Fisher の正確検定を行った。いずれも  $p < 0.05$  を統計学的有意差ありとした。統計学的検討は R 2.13.0 (R Foundation for Statistical Computing 社製) と R commander (version 1.6-3) を生物学的統計解析用にカスタマイズしたソフトである EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター) を使用した (25)。

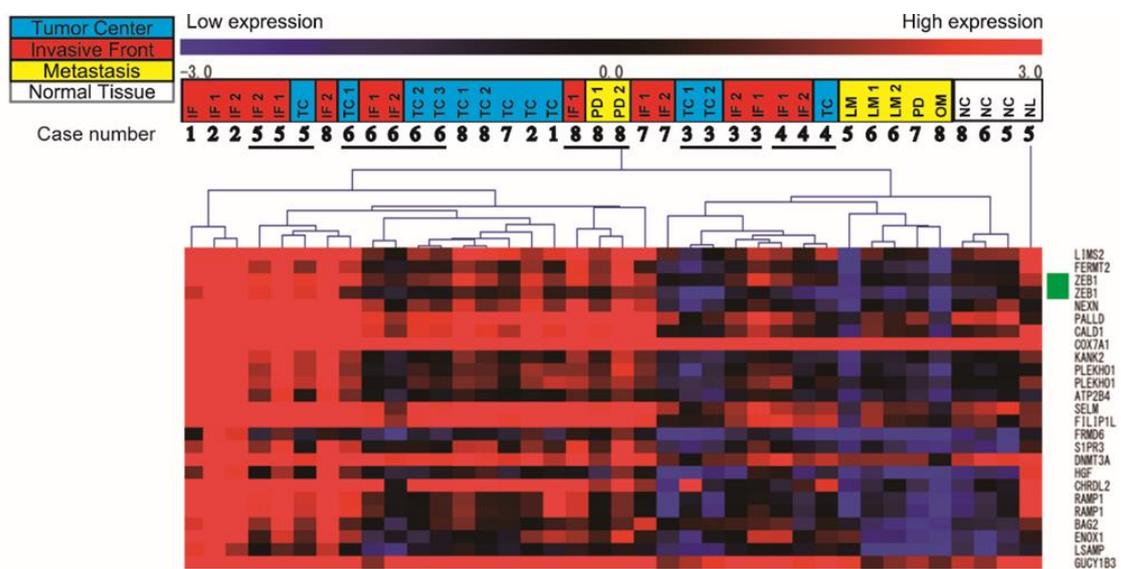
## 結果

### EMT 関連遺伝子の不均一な発現と転移を有する大腸癌の先進部における VEGF、Wnt シグナル伝達経路の活性化

はじめにマイクロアレイによる遺伝子の網羅的解析を行った。腫瘍中心部、先進部、転移巣の3群に分けANOVA（分散分析、analysis of variance）を行った。その結果7920プローブ（全体の13%）で3群間の発現に有意差があった。EMT 関連遺伝子ではZEB1の発現が中心部や転移巣と比較し、先進部で有意に高値であることが明らかになった（ $p < 0.01$ ）（図4）。腫瘍のほとんどの部分でZEB1の発現レベルが低値であったのに対し、先進部の一部で高値を示す箇所が存在した（図5）。他のEMT 関連遺伝子であるSNAIL、basic helix-loop-helix transcription factors やEカドヘリンに関しては3群間で発現量に有意差を認めなかった。ANOVAの結果で有意差があった7920プローブをクラスター解析し、発現プロファイルの違いを階層樹形図によって表したところ、いくつかの検体（No.3, 4, 5, 6, 8）では中心部と先進部の差よりも個体による差が強く影響していた（図4）。そこで個体差を除去するために中心部と先進部の発現比を算出した。算出した比を転移の有無によって2群に分け、 $t$ 検定を行った。1512プローブ（全体の2%）で有意差が検出でき、Database for

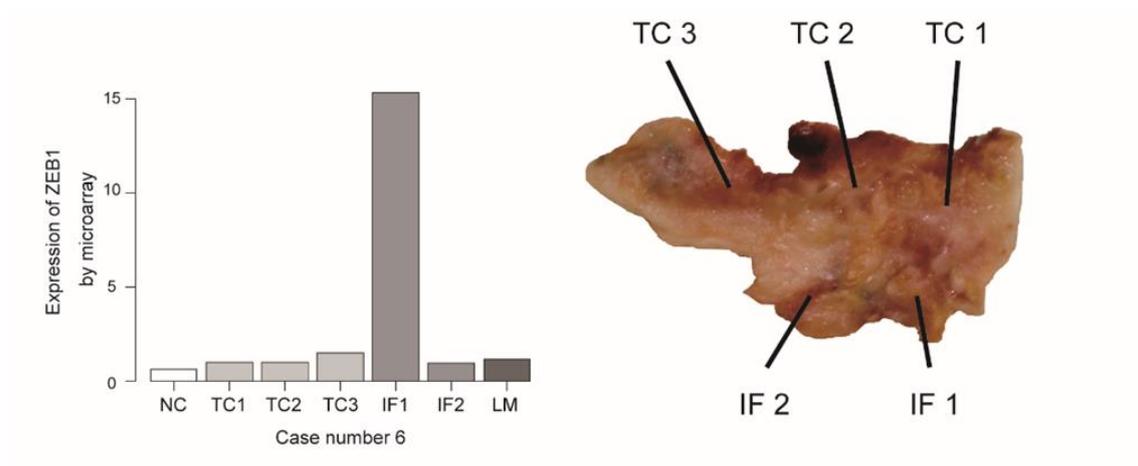
Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) を用いて、分子間ネットワーク解析を行うといくつかの遺伝子は VEGF シグナル伝達経路や Wnt シグナル伝達経路に関連することが明らかになった (表 4)。

図 4 マイクロアレイ結果から作成した階層樹形図の一部



中心部、先進部、転移巣の発現を ANOVA で解析した。有意なプローブ ( $p < 0.05$ ) を抽出し、Pearson's correlation を用い階層樹形図を作成した。ヒートマップでは高発現を赤、低発現を青で示した。中心部 (TC: tumor center) は水色、先進部 (IF: invasive front) は赤、転移巣 (LM: liver metastasis、OM: ovarian metastasis、PD: peritoneal dissemination) は黄色、正常組織 (NC: normal colon mucosa、NL: normal liver tissue) は白で表示した。Case number は下段に示した。遺伝子名は図の右に表記し、ZEB1 を緑色でマークした。

図5 マイクロアレイによる Case number 6 (表 1、2 参照) の ZEB1 発現



NC:正常大腸粘膜 (Normal Colon mucosa)、TC:腫瘍中心部 (Tumor center)、

IF:先進部 (Invasive Front)、LM: 肝転移巣 (Liver metastasis)

表4 DAVID と KEGG pathway を用いたパスウェイ解析

<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>P-Value</b>	<b>Benjamini</b>
<b>Axon guidance</b>	18	4.3E-4	3.4E-2
<b>Endocytosis</b>	16	6.5E-2	4.3E-1
<b>VEGF signaling pathway</b>	14	1.4E-4	2.1E-2
<b>T cell receptor signaling pathway</b>	14	4.5E-3	1.1E-1
<b>Wnt signaling pathway</b>	14	5.8E-2	4.1E-1
<b>ErbB signaling pathway</b>	13	2.0E-3	7.7E-2
<b>Neurotrophin signaling pathway</b>	13	3.2E-2	3.1E-1
<b>Tight junction</b>	13	5.2E-2	4.1E-1
<b>Pancreatic cancer</b>	11	4.5E-3	1.3E-1
<b>B cell receptor signaling pathway</b>	11	6.0E-3	1.3E-1
<b>Fc epsilon RI signaling pathway</b>	11	7.9E-3	1.5E-1
<b>Fc gamma R-mediated phagocytosis</b>	11	2.9E-2	3.0E-1
<b>Leukocyte transendothelial migration</b>	11	9.7E-2	5.1E-1
<b>Chronic myeloid leukemia</b>	10	1.7E-2	2.4E-1
<b>Prostate cancer</b>	10	4.6E-2	3.9E-1
<b>Progesterone-mediated oocyte maturation</b>	9	8.6E-2	4.8E-1
<b>Linoleic acid metabolism</b>	8	5.1E-4	2.7E-2
<b>Non-small cell lung cancer</b>	8	2.3E-2	2.7E-1
<b>Glycerophospholipid metabolism</b>	8	6.8E-2	4.3E-1
<b>Renal cell carcinoma</b>	8	7.8E-2	4.6E-1
<b>Bladder cancer</b>	7	2.3E-2	2.8E-1
<b>Endometrial cancer</b>	7	5.6E-2	4.2E-1
<b>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</b>	7	9.8E-2	5.0E-1
<b>Dorso-ventral axis formation</b>	6	9.1E-3	1.5E-1

## 腫瘍の部位と転移の有無による EMT 関連遺伝子発現の違い

16 個の腫瘍から採取した 133 検体および細胞株から採取した RNA を用いてリアルタイム PCR 法により ZEB を含む EMT 関連遺伝子の発現を調べ、腫瘍内不均一性の検証を行った。細胞株の検討では ZEB1、ZEB2 は大腸癌細胞株での発現は認めず、ヒト胎児腎細胞株 HEK293、および腎細胞癌細胞株 VMRC-RCW、universal reference で発現していた (図 6)。それに対し、E カドヘリンは大腸癌細胞株で発現していたが腎由来の細胞株ではほとんど発現していなかった。SNAIL1 は大腸癌細胞株で発現が高い傾向があったがいずれの細胞株でも発現を認めた。臨床検体における測定ではまず部位 (TC、IF および転移巣の 3 群) による発現の違いを調べた。ZEB1 および ZEB2 の発現は中心部や転移巣と比較し、先進部で有意に高値であった (図 7 a, b)。SNAIL1 は中心部よりも先進部が高値を示したものの有意差はなく、E カドヘリンに関しては 3 群でほぼ同様の発現レベルを示した (図 8 a, b)。

さらに転移の有無によってそれぞれの発現が異なるかどうかの検討を行った。それぞれの遺伝子において、中心部と先進部の発現を転移の有無によっても分類し、4 群で比較検討した。ZEB1 の先進部での発現は転移を有する癌において転移のない癌と比較し高い傾向 ( $p=0.083$ ) にあったが、中心部の発現にはほとんど差がなかった (図 7 c)。同様に ZEB2 に関して解析したが、転移の有無に

よる差は ZEB1 ほど明らかではなかった (図 7 d)。SNAIL1 と E カドヘリンについては転移の有無による差は認めなかった (図 8 c, d)。

図 6 各種細胞株における EMT 関連遺伝子の発現

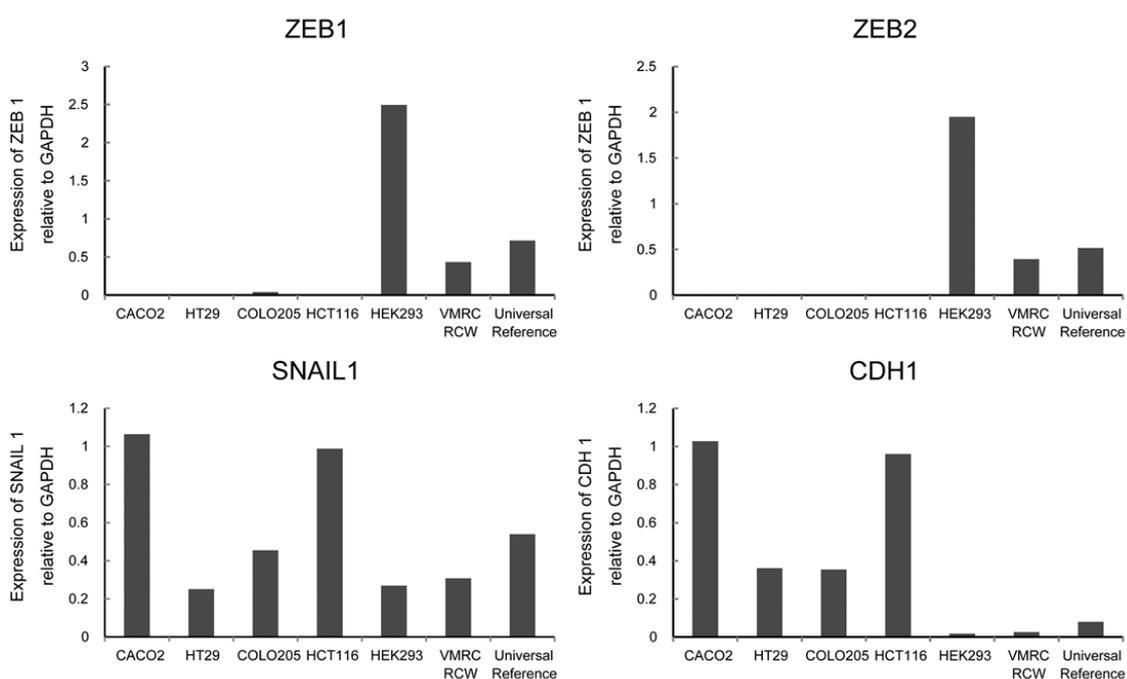
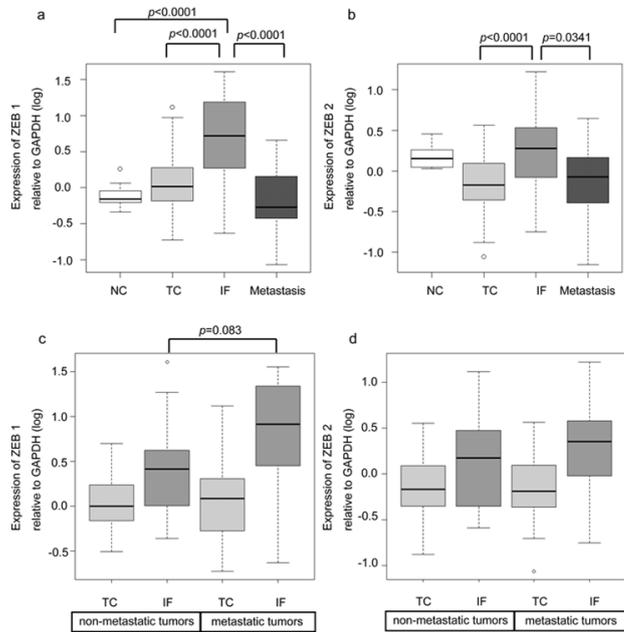
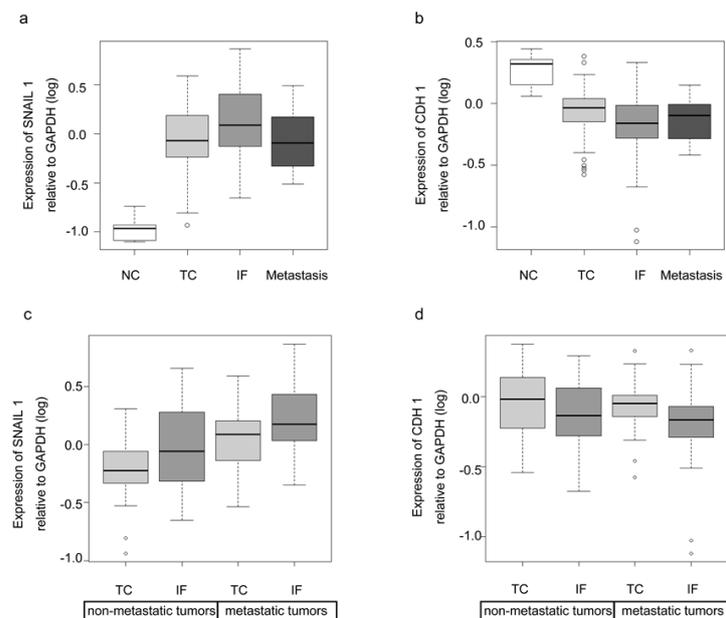


図7 ZEB1 および ZEB2 の遺伝子発現



a, b) 部位による発現レベルの違い  
 c, d) 転移の有無による発現レベルの違い

図8 SNAIL1 および E カドヘリン (CDH1) の遺伝子発現



a, b) 部位による発現レベルの違い  
 c, d) 転移の有無による発現レベルの違い

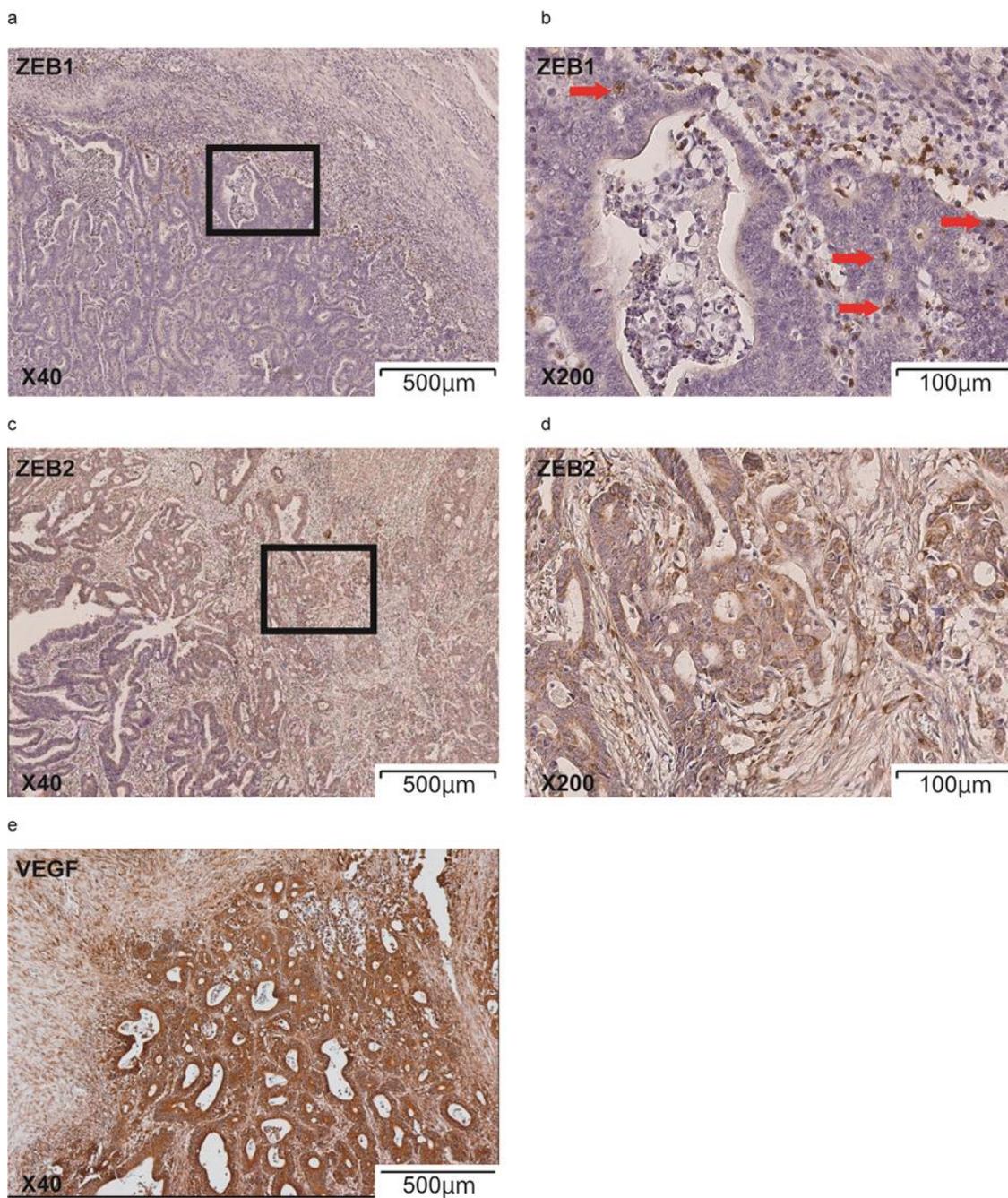
## 免疫組織化学法による ZEB タンパク質の不均一性の検証と転移に関連するタ

### ンパク質発現の検討

免疫組織化学法で ZEB タンパク質の発現を調べたところ、ZEB1、ZEB2 ともに先進部の中で不均一なタンパク質発現を示すことが確認できた (図 9)。

ZEB1 は 16 症例の癌細胞で発現を認め、ZEB2 は 18 症例で発現していた。しかし、ZEB タンパク質発現と転移の関連は示せなかった。全ての検体で ZEB1 は核が染まり、ZEB2 は細胞質が染まった。EMT の制御に関わるシグナル伝達経路については VEGF タンパク質の発現を調べた。転移との相関を示すことはできなかったが ZEB タンパク質と異なり、先進部は均一に染まっていることが判明した。E カドヘリンの検討では、先進部では細胞膜上の E カドヘリンタンパク質が減少し、細胞質での発現が増加していることがわかった (図 10)。しかし、E カドヘリンのタンパク質発現と転移についての関連も明らかではなかった。また、ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫組織化学法による染色のいずれにおいても、EMT に特徴的とされる紡錘状の形態、あるいは結合性の低下を示す形態学的所見は認めなかった (data not shown)。

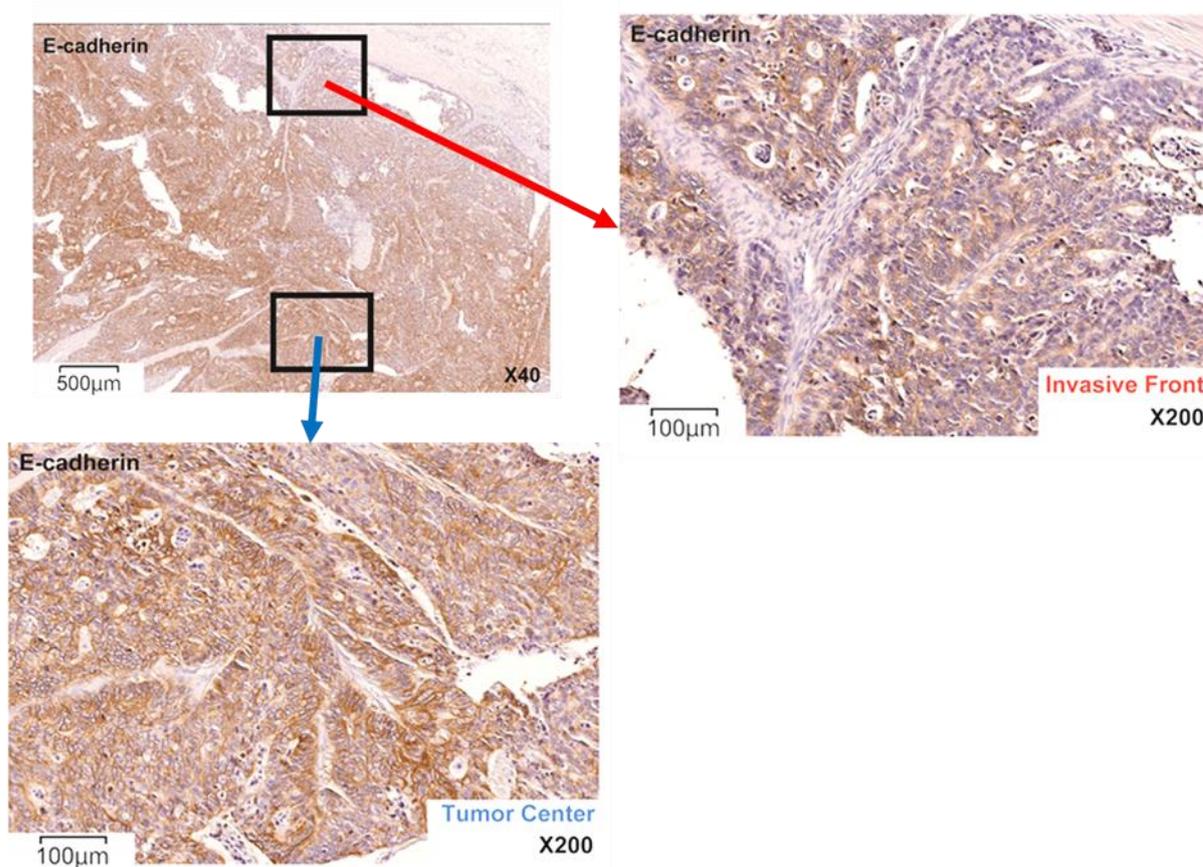
図9 ZEBタンパク質およびVEGFタンパク質の発現



a, b) ZEB1、c, d) ZEB2、e) VEGF

a, c, e は 40 倍、b, d は 200 倍

図10 Eカドヘリン (CDH1) タンパク質の発現パターン



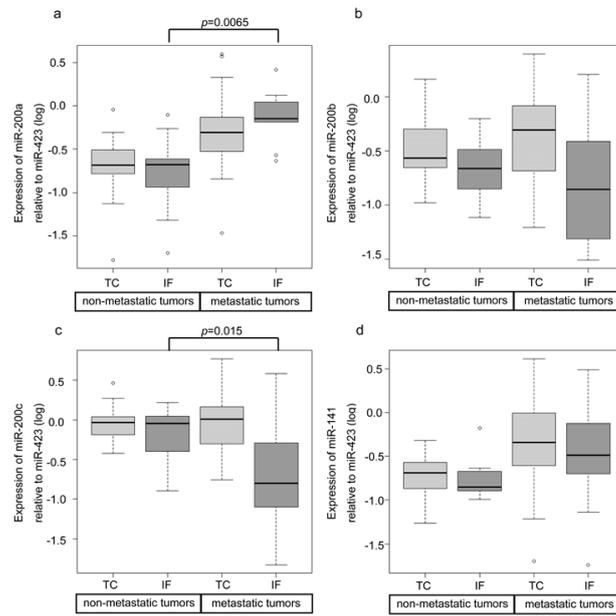
Eカドヘリンは中心部で細胞膜上に発現を認めるが、先進部では細胞膜の発現が減少し、細胞質が染色されている

miR-200c の発現は転移を有する大腸癌の先進部で低下し、ZEB1 の発現と逆相関関係を示す

これまでの実験から ZEB1 の遺伝子発現は転移を有する大腸癌の先進部で高いことが判明したものの統計学的な有意差はなく、ZEB タンパク質と転移の関

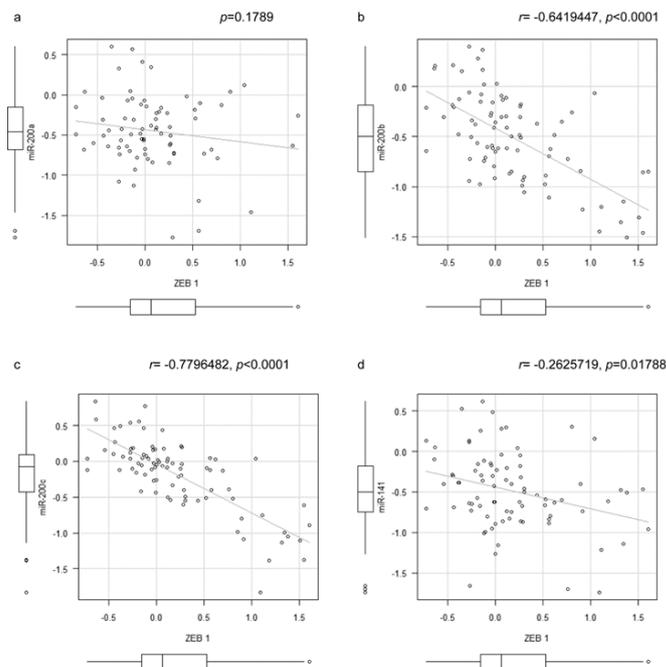
係も示すことができなかつた。そこで我々は ZEB の制御に関わると考えられている 4 種類のマイクロ RNA、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 の発現を 88 検体の RNA で調べ評価した。EMT 関連遺伝子のリアルタイム PCR の実験と同様に、各々の発現を部位および転移の有無により 4 群に分け比較すると、転移を有する癌の先進部での miR-200c の発現が転移のない大腸癌の先進部での発現と比べ有意に低下していた ( $p=0.015$ ) (図 1 1 c)。対称的に miR-200a の発現は、転移を有する癌の先進部において、転移を有さない癌の先進部と比較し有意に高かった ( $p<0.01$ ) (図 1 1 a)。また、ZEB1 と miR-200 の関係を調べると、miR-200b と miR-200c の発現は ZEB1 の発現と逆相関関係にあることが判明した (図 1 2)。

図 1 1 4 種類の miR-200 の発現レベル



a) miR-200a、b) miR-200b、c) miR-200c、d) miR-141

図 1 2 ZEB1 と 4 種類の miR-200 の発現との相関



a) miR-200a、b) miR-200b、c) miR-200c、d) miR-141

## 考察

EMT は癌の浸潤、転移に重要な役割を果たすと考えられるようになってきたがヒト臨床検体で EMT が本当に転移に必須であるかの検討は不十分であった。臨床検体における EMT の証明が困難である原因として我々は腫瘍の持つ不均一性の影響を考え、大腸癌臨床検体で腫瘍内不均一性を考慮に入れた実験を行った。

本研究では腫瘍が進展し、転移を起こす際に獲得するプロファイルの網羅的な検索を行うため、腫瘍中心部と先進部の遺伝子発現を比較し、また、中心部と先進部の発現比を用いた解析も行った。その結果、VEGF シグナル伝達経路や Wnt シグナル伝達経路に関わる遺伝子が転移を有する癌で高値を示すことを明らかにした (表 4)。これらのシグナル伝達経路は EMT を誘導することで転移を起こしやすくする役割をもつと考えられている。膵癌において VEGFR-1 は EMT に合致する形態変化や分子生物学的変化を引き起こし、浸潤や転移を誘導し、さらに EMT に関連する転写産物を増やすことが報告されている (26)。

Wnt シグナル伝達経路に関しては、GSK3- $\beta$  を抑制することにより SNAIL を安定させ、その結果 EMT を誘導すると考えられている (27)。また、Wnt シグナル伝達経路に関わる  $\beta$  カテニンの発現が EMT を起こす際に腫瘍先進部で増

加することも知られている (28)。

今回、我々は EMT 関連遺伝子の発現には腫瘍全体として不均一性があるのみならず、腫瘍先進部の中にも不均一性が存在することを発見し (図 5)、大腸癌臨床検体で EMT を調べる際には先進部の一部だけではなく複数箇所の検体採取が必要であることを示した。Gerlinger らもひとつの腫瘍の一部分から採取した検体で遺伝子評価を行うことの危険性を指摘している (21, 22)。

EMT 関連遺伝子のひとつである ZEB1 は大腸癌の進展に重要な役割を果たし (29)、ZEB1 高発現の原発性大腸癌は予後が悪いことが知られている (30)。しかし、過去に大腸癌臨床検体における ZEB1 発現と転移について直接言及した報告はなかった。本実験では腫瘍内不均一性を考慮にいたったことで、大腸癌臨床検体における ZEB1 と転移の関係を示すことができた。すなわち、中心部から採取した検体で ZEB1 を調べても転移の有無による差を示せなかったが、先進部から採取した複数の検体を用いたことで転移との関係を示すことが可能となった。ZEB1、ZEB2 とともに今回使用した全ての大腸癌細胞株で発現を認めず (図 6)、臨床検体においては中心部で発現が低く、先進部で高くなっていたが転移巣では低下していた。これらの結果から大腸癌の発癌から転移に至る過程のうち、ZEB は発癌には関与していないが、転移を起こす段階で一過性に発現上昇することが推測される。SNAIL1 は大腸癌細胞株の中で高発現を示すもの

があり、中心部から採取した臨床検体における発現もある程度の高値を示したため、転移よりも発癌や腫瘍の増大に関わっている可能性が考えられた。

免疫組織化学法によって **ZEB** のタンパク質発現の不均一性を証明することはできたが、転移との関係は示すことができなかった。原因として **ZEB** タンパク質の発現が不均一であり、また先進部でも部位によって発現が異なることから定量が難しいことが考えられた。さらに免疫組織化学法における **ZEB** 抗体の感度があまり良くないことも一因と考えられる。**E** カドヘリンタンパク質は腫瘍中心部では細胞膜上で発現を認め、先進部では細胞質内で発現していることが確認できた。**E** カドヘリンは細胞膜上で発現しているときに細胞間接着の役割を果たし、分解されるときには細胞質に移行することが知られている (31, 32)。先進部では **E** カドヘリンタンパク質が分解され、細胞膜上の発現が低下するため細胞間接着が減弱すると考えられた。**E** カドヘリンの分解は先進部で起こっているため、**VEGF** シグナル伝達経路や **Wnt** シグナル伝達経路、**ZEB** などの関与が考えられるが、本研究では何が **E** カドヘリンの分解に関わるかを具体的に突き止めることはできず、**E** カドヘリンと転移の関係を示すこともできなかった。また、**EMT** に特徴的な癌細胞の紡錘形細胞、結合性の低下等の形態変化も切片上で確認できなかった。**EMT** に関連するタンパク質が転移にどう関与しているかについては更なる検討が必要であり今後の課題となる。

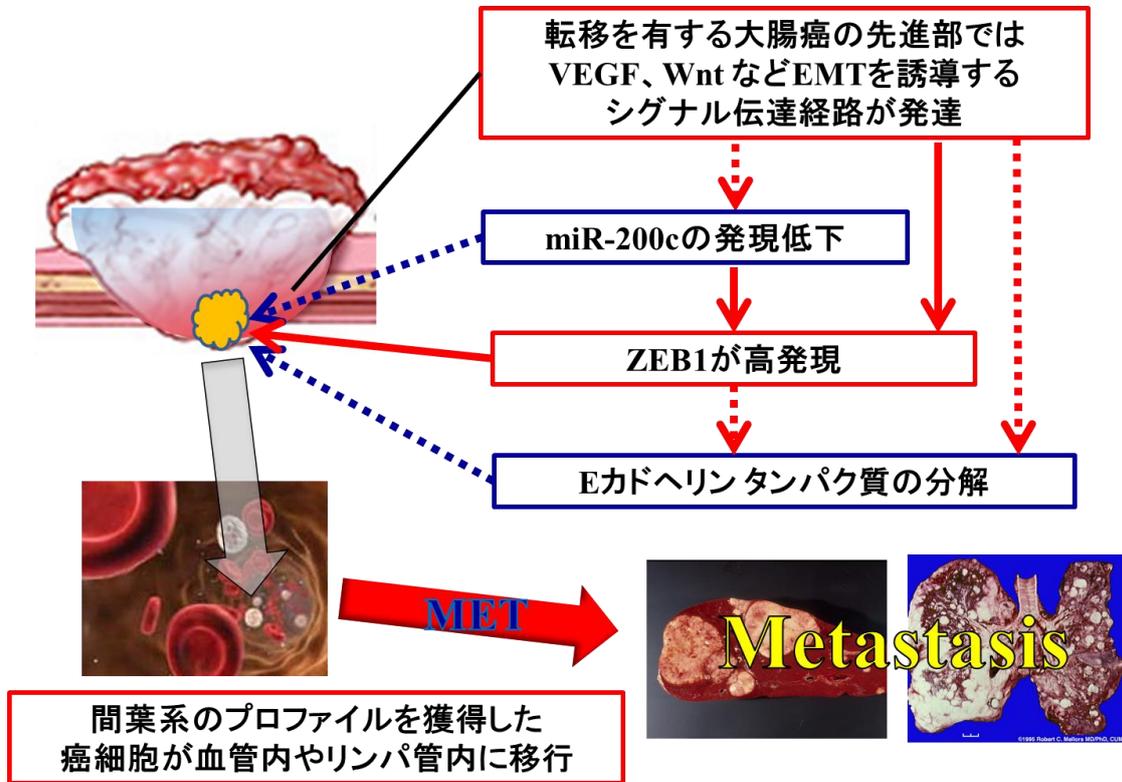
本研究で ZEB の不均一性を示すことはできたものの、転移との関係では統計学的な有意差を示すことはできなかった。そこで次に我々は ZEB の発現を上流から調節しているマイクロ RNA に注目した。マイクロ RNA は多数の標的遺伝子を有し転写後の発現を調節し、組織内で mRNA よりも安定して存在している (33, 34)。miR-200 ファミリーは 5 種類のマイクロ RNA から構成され、ZEB 発現を抑制することで EMT を調節することが報告されている (35, 36)。今回は全ての検体でほとんど発現していなかった miR-429 を除いた 4 種類の miR-200 を構成するマイクロ RNA について転移との関係を調べた。その結果、miR-200c が転移を有する大腸癌の先進部で有意に低下していることが明らかになった。また、ZEB1 と miR-200c の発現は強い逆相関関係を示し、miR-200c が ZEB1 を抑制するという過去の細胞実験の報告とも一致した (14)。これらの結果とマイクロ RNA が組織中で mRNA よりも安定して存在することを考慮すると、miR-200c の測定は ZEB1 の測定よりも転移を正確に反映することが示唆された。マイクロ RNA の実験では miR-200a の先進部での発現は miR-200c とは対称的に転移を有する大腸癌で高いこともわかった (図 1 1)。miR-200c と miR-200a は塩基配列に相動性があるものの、構造的には異なっていることが影響していると考えられる (36)。miR-200a 発現と ZEB1 発現の間には有意な相関関係はなく、miR-200a の ZEB1 に対する影響は明らかではなかった。

本研究では EMT 関連遺伝子の不均一性が複数の検体を採取することにより確認できた。しかし、前述した免疫組織化学法での課題の他にもいくつかの課題が残った。まず今回は EMT 関連遺伝子、シグナル伝達経路についての検討を行ったもののそれらの具体的な相互関係について言及できなかった。VEGF シグナル伝達経路や Wnt シグナル伝達経路の一部が EMT の誘導に関わるのか、シグナル伝達経路全体として EMT を誘導するのか、また、どの遺伝子が Key molecule となるのかは不明のままであり、今後の検証が必要である。さらに EMT と逆の現象、転移巣で増大する際に上皮細胞の形質を再獲得する現象である MET (Mesenchymal-epithelial transition、間葉上皮移行) もまた転移形成に必須であると考えられているが、今回の検討においては ZEB1 など EMT 関連遺伝子の発現が転移巣で低下している事実を確認することに留まった。MET がどの段階で起こるか、たとえば血中に遊離した癌細胞の段階で MET が始まっているのか、それとも転移巣にたどり着いた段階で起こるのか、そして MET を調節しているのはどの分子なのか調べることも今後の課題となる。また、本研究の手法は臨床応用するためには複雑で時間がかかってしまう。その解決策のひとつとしては血液中に遊離した腫瘍細胞や腫瘍由来の核酸を利用する“Liquid biopsy”が挙げられる。最近では血漿中のマイクロ RNA を調べることが可能になり、miR-200c と予後との関係について報告されている (37)。

Liquid biopsy は血中での EMT 関連遺伝子の状態を調べることに応用でき、MET のタイミングを捉える方法としても有効な可能性がある。

上述した課題は残ったものの、ひとつの腫瘍から複数の検体を採取し発現解析を行うという本研究の手法は、EMT 関連遺伝子、マイクロ RNA の腫瘍内不均一性の証明および大腸癌臨床検体における EMT 関連遺伝子と転移との関係を調べるために有用であった。本研究から、転移を有する大腸癌では腫瘍先進部で VEGF シグナル伝達経路や Wnt シグナル伝達経路といった EMT を誘導するシグナル伝達経路が活性化しており、miR-200c の発現低下、ZEB1 発現の上昇、E カドヘリンタンパク質の分解を経て癌細胞が間葉系細胞の形質を得て、血中に遊離していくという EMT の一連のプロセスを提示することができた (図 13)。今後、前述した課題の解決を目指し、さらに研究を進めていきたい。

図 1 3 本研究で得られた EMT のプロセスのシエーマ



点線部の流れは本研究では直接因果関係を示せていない

## 結語

本論文では原発性大腸癌において腫瘍が浸潤するに伴って獲得するプロファイルを網羅的に解析し、VEGF シグナル伝達経路や Wnt シグナル伝達経路といった EMT を誘導するシグナル伝達経路に関連する遺伝子が、転移を有する大腸癌の先進部で高発現していることを明らかにした。また、EMT を制御する主要な分子である ZEB1 や miR-200 の腫瘍内不均一性を示し、miR-200c は転移を有する大腸癌の先進部で低下することを同定した。臨床検体を扱う場合、ひとつの腫瘍の複数箇所からの検体採取を行うことが正確かつ十分な EMT の評価を可能にすることを示した。

## 謝辞

本研究は、自治医科大学大学院医学研究科大学院生補助金、自治医科大学大学院医学研究科研究奨励賞、日本学術振興会科研費、財団法人日本自転車振興会からの助成を受けたものであり、ご支援いただいた関係各位に深く感謝いたします。本研究を遂行する機会を賜り、全般にわたりご指導をいただいた自治医科大学附属さいたま医療センター外科系総合医学 力山敏樹教授、小西文雄前教授、そして終始懇切かつ情熱的なご指導を賜りました鈴木浩一講師に心から感謝申し上げます。また、研究に付随する事務手続きや実験試薬、器具の準備や実験の補助など、本研究に直接、間接的に多大な貢献をしていただいた研究補助員の石坂伊津子様に厚くお礼申し上げます。

最後に自治医科大学附属さいたま医療センター一般消化器外科の皆様、病理部の皆様、手術室スタッフの皆様、循環器病臨床医学研究所の皆様に深謝いたします。

## 参考文献

1. *がんの統計 '14* がんの統計編集委員会編 公益財団法人がん研究振興財団 2015
2. *大腸癌治療ガイドライン2014年版* 大腸癌研究会編 金原出版 2014
3. Hashiguchi Y, Hase K, Kotake K, Ueno H, Shinto E, Mochizuki H, Yamamoto J, Sugihara K. Evaluation of the seventh edition of the tumour, node, metastasis (TNM) classification for colon cancer in two nationwide registries of the United States and Japan. *Colorectal Dis.* 14: 1065-74. 2012
4. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.* 65: 5991-5; discussion 5. 2005
5. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 7: 415-28. 2007
6. Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet.* 369: 1742-57. 2007
7. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of

epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15: 178-96. 2014

8. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119: 1420-8. 2009

9. Chui MH. Insights into cancer metastasis from a clinicopathologic perspective: Epithelial-Mesenchymal Transition is not a necessary step. *Int J Cancer.* 132: 1487–95. 2013

10. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science.* 342: 1234580. 2013

11. Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *The EMBO journal.* 22: 2453-62. 2003

12. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 14: 818-29. 2008

13. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 139: 871-90. 2009

14. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1.

*Nat Cell Biol.* 10: 593-601. 2008

15. Lamouille S, Subramanyam D, Belloch R, Derynck R. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 25: 200-7. 2013

16. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2: 442-54. 2002

17. Busch EL, McGraw KA, Sandler RS. The potential for markers of epithelial-mesenchymal transition to improve colorectal cancer outcomes: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 23: 1164-75. 2014

18. Bates RC, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther.* 4: 365-70. 2005

19. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194: 23-28. 1976

20. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature.* 467: 1114-7. 2010

21. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D,

Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C.

Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 366: 883-92. 2012

22. Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, Fisher R, McGranahan N, Matthews N, Santos CR, Martinez P, Phillimore B, Begum S, Rabinowitz A, Spencer-Dene B, Gulati S, Bates PA, Stamp G, Pickering L, Gore M, Nicol DL, Hazell S, Futreal PA, Stewart A, Swanton C.

Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet.* 46: 225-33. 2014

23. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer cell.* 27: 15-26. 2015

24. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. TM4: a free, open-source system for microarray data

- management and analysis. *Biotechniques*. 34: 374-8. 2003
25. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 48: 452-8. 2013
26. Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, Somcio R, Bauer TW, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*. 66: 46-51. 2006
27. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. Dual regulation of Snail by GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 6: 931-40. 2004
28. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 10356-61. 2001
29. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 131: 830-40. 2006

30. Peña C, García JM, Silva J, García V, Rodríguez R, Alonso I, Millán I, Salas C, de Herreros AG, Muñoz A, Bonilla F. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum Mol Genet.* 14: 3361-70. 2005
31. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 68: 3645-54. 2008
32. Chetty R, Serra S. Nuclear E-cadherin immunoexpression: from biology to potential applications in diagnostic pathology. *Adv Anat Pathol.* 15: 234-40. 2008
33. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 13: 271-82. 2012
34. Peiró-Chova L, Peña-Chilet M, López-Guerrero JA, García-Giménez JL, Alonso-Yuste E, Burgues O, Lluch A, Ferrer-Lozano J, Ribas G. High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality. *Virchows Arch.* 463: 765-74. 2013
35. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, Waldvogel B, Vannier C, Darling D, zur Hausen A, Brunton VG, Morton J,

- Sansom O, Schüler J, Stemmler MP, Herzberger C, Hopt U, Keck T, Brabletz S, Brabletz T. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 11: 1487-95. 2009
36. Uhlmann S, Zhang JD, Schwäger A, Mannsperger H, Riazalhosseini Y, Burmester S, Ward A, Korf U, Wiemann S, Sahin O. miR-200bc/429 cluster targets PLCgamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene.* 29: 4297-306. 2010
37. 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.* 259: 735-43. 2014