

氏名	武藤雄太
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 511 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 22 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 准教授 土橋 洋 (委員) 教授 藤井 博文 講師 三瀬 名丹

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

大腸癌の治療成績は外科治療や化学療法 of 進歩により向上したが、転移を有する大腸癌患者の予後は依然不良である。転移の制御が現在の大腸癌治療における課題であり、転移の機序の解明が求められている。近年、癌の転移について EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition, 上皮間葉移行) の関与が注目されてきた。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、胎生期での組織や器官の形成、成長、分化に重要な役割を果たしている。EMT は運動能の亢進をもたらすため、癌の浸潤や転移においてもその関与が考えられるようになった。癌細胞は間葉系の表現型になることで浸潤能や転移能を獲得し、原発巣からの遊離が可能になると考えられている。しかし、EMT に関する報告のほとんどが *in vitro* の実験で行われ、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。EMT と転移の関係について臨床検体では十分な証明がされていないのが現状である。臨床検体で EMT の証明が困難な原因として腫瘍内不均一性が考えられる。以前から癌は浸潤する過程で変異を蓄積し、不均一性を有することが知られている。近年では分子生物学的な見地から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明らかとなった。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、大腸癌臨床検体における腫瘍中心部と先進部の遺伝子発現プロファイルの違いに注目し、EMT に関連する遺伝子やマイクロ RNA の発現分布を調べ、転移に関与する分子を同定することを本研究の目的とした。

### 2 研究方法

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、遺伝子発現マイクロアレイ、リアルタイム PCR および免疫組織化学法で EMT に関わる遺伝子やマイクロ RNA の発現を調べ検討した。腫瘍表面から 5-10mm の部位を腫瘍中心部、腫瘍と筋層、漿膜あるいは他臓器との境界から 1-3mm の部位を先進部と定義し、各々の腫瘍で複数箇所から検体を採取した。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た。マイクロアレイには 8 症例から採取した 38 検体の RNA を用い、リアルタイム PCR には 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、中心部と先進部の中からマイクロ 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 症例のパラフィン包埋切片を使用した。

### 3 研究成果

遺伝子発現マイクロアレイから得られた結果を中心部、先進部、転移巣の 3 群に分け分散分析を行ったところ、7920 プローブの発現に有意差を認めた。個体差によるバイアスを除外するため、先進部の発現を中心部の発現で補正した比を用いた解析も行った。転移の有無で 2 群に分け、有意差があった 1512 プローブに対し分子間ネットワーク解析を行うと、EMT を誘導すると考えられている VEGF シグナル伝達経路や Wnt シグナル伝達経路に関連する遺伝子が転移を有する癌で高値を示した。EMT に関連する遺伝子では zinc-finger E-box-binding homeobox (ZEB) 1 の発現が中心部や転移巣と比較し、先進部で有意に高いことが明らかになった ( $p < 0.01$ )。リアルタイム PCR による検証でも ZEB1 発現の腫瘍内不均一性が確認できた。中心部と先進部の発現に関しては転移の有無による分類も行い、4 群で比較した。ZEB1 の先進部での発現は転移を有する癌で転移のない癌よりも高い傾向 ( $p = 0.083$ ) があったが、中心部の発現には転移の有無による差はほとんどなかった。

EMT に関わるタンパク質の検討では、ZEB タンパク質の不均一な発現が確認できたが、転移との関係を示すことはできなかった。また、E カドヘリンタンパク質は先進部では細胞膜上の発現が低下し、細胞質での発現が増加していることもわかったが、転移との関係は明らかではなかった。

遺伝子発現やタンパク質発現では ZEB と転移の間に統計学的に有意な関係を示すことができなかったが、マイクロ RNA の検討では ZEB を介し EMT を制御すると考えられている miR-200c の発現が転移を有する大腸癌の先進部において転移のない癌の先進部と比べ有意に低下しており ( $p = 0.015$ )、ZEB1 と miR-200c の発現が逆相関関係にあることを示した。

### 4 考察

本研究は、ひとつの腫瘍から複数の検体を採取することは、EMT に関連する遺伝子やマイクロ RNA の腫瘍内不均一性を証明し、転移との関わりを示すために有用であることを示した報告である。

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現検索の結果、中心部と先進部では多くの遺伝子発現が異なることが判明した。中心部と先進部の発現比を用いた解析では 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くなることを示した。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促進させると考えられている。先進部で遺伝子発現が高かった ZEB1 は大腸癌の進展に重要な役割を果たし、予後との関係も指摘されているが、過去に臨床検体で ZEB1 と転移の関係について直接言及した報告はなかった。本研究では腫瘍内不均一性を考慮したことで、先進部での ZEB1 発現の転移への関与を示すことができた。

EMT の過程では E カドヘリンの発現が低下すると考えられている。今回は転移の有無による E カドヘリンの遺伝子発現の差は認めなかったが、先進部で細胞質の E カドヘリンタンパク質が増

加することを明らかにした。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。大腸癌の先進部では細胞膜上の E カドヘリン発現が低下するため細胞間接着が弱い状態になっていると考えられた。

マイクロ RNA の検討では miR-200c の先進部での発現が転移に関与することが明らかになった。miR-200 ファミリーは 5 種類のマイクロ RNA から構成され、ZEB の mRNA に結合し転写を抑制することで EMT を調節すると考えられている。miR-200 が ZEB を上流から制御していることとマイクロ RNA は組織中で 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と考えられた。

## 5 結論

本論文では腫瘍内不均一性を考慮に入れ、原発性大腸癌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 を調節する主要な分子である ZEB1 や miR-200c 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していることを同定した。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。

## 論文審査の結果の要旨

大腸癌の治療上、最大の課題である転移について、近年 EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition, 上皮間葉移行) の関与が注目されてきた。しかし、EMT と転移の関係について臨床検体では十分な解析がされておらず、機序については不明であるのが現状であり、申請者は EMT と転移との関連性を腫瘍内不均一性をも考慮した研究計画を立案し、解析した。

大腸癌臨床検体における腫瘍中心部(腫瘍表面から 5-10mm の部位)と先進部(非腫瘍部との境界から 1-3mm の部位)の遺伝子発現プロファイリングから、EMT 関連遺伝子を同定し、マイクロ RNA の発現分布を調べ、転移の機序を明らかにすることを研究目的とした。

方法としては、遠隔転移を伴う大腸癌、伴わない大腸癌、各 8 症例の複数箇所から採取した 133 検体を用い、マイクロアレイ解析、リアルタイム PCR および免疫組織化学法で検討した。転移例 6 症例からは転移臓器の検体も解析した。免疫組織化学法には 80 症例のパラフィン包埋切片を使用した。

本研究は、2 つの重要な知見を提供した。

第一は、マイクロアレイによる網羅的解析の結果から中心部、先進部、転移巣の 3 群で、7920 プローブの発現に有意差を認めた。更に、個体差によるバイアスを除外するため、先進部の発現を中心部の発現で補正した比を用いた解析を行うと、転移の有無で 1512 プローブで発現に有意差があり、分子間ネットワーク解析から、EMT を誘導する VEGF 系、Wnt 系経路関連遺伝子が転移を有する癌で高値を示した。

第二に、マイクロ RNA の検討により EMT 促進転写因子 ZEB を負に制御する miR-200c の先進部での発現が転移を有する大腸癌で有意に低下していることを新規の知見として証明した。よって

miR-200c の測定は ZEB1 の測定よりも転移を正確に反映する可能性が示唆された。ZEB のターゲットである E カドヘリンの遺伝子発現は転移の有無により差は認めなかったが、大腸癌の先進部では細胞膜上の E カドヘリン発現が低下し、細胞間接着が弱い状態になっていることも明らかにした。

本研究では原発性大腸癌が浸潤と共に、VEGF、Wnt シグナル伝達経路といった EMT 誘導シグナル伝達経路の活性化形質を獲得し、同時に miR-200c を抑制し、易転移性状態となることが示唆された。一腫瘍内の多数部位から検体を採取するという労力はかかるがユニークな手法を用いたことで、EMT 関連遺伝子やマイクロ RNA 発現の腫瘍内不均一性を証明し、かつそれらの転移との関連を示した意義のある研究である。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の発表は明瞭で、論理的であり、実験データの解釈やその限界、問題点、特に人体材料と培養細胞系での結果の矛盾についても詳細に、かつ真摯に説明を行った。審査委員からは、本研究の新奇性、分子的な機序、実験結果の解釈、臨床への応用の可能性など、数多くの質問や意見が出された。これらに対しても申請者の研究グループで現在既に準備している liquid biopsy 等の見直しを含め、いずれも適切に回答、議論した。また、本研究もすでに欧米医学雑誌に投稿中であり、審査員の見通しとしても受理される可能性が高いと考えられる。以上より、申請者の今回の発表のみならず、研究能力、指導力も含め、博士の学位に相応しいと審査委員全員で判断した。