

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08962

研究課題名(和文) 大腸癌新規サブタイプ発癌に関わる小分子RNA機能の解明と新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Functional analysis of small RNAs involved in tumorigenesis of a new molecular subtype of colorectal cancer, and investigation of their new molecular targets

研究代表者

高橋 雅信 (TAKAHASHI, MASANOBU)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：00447161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小分子RNAの一つであるmiRNAの一部がBRAF変異陽性の<sup>大腸癌サブグループ</sup>の発癌において重要な役割を果たしている<sup>と仮定し、そのmiRNAを同定、さらに機能を解明するために、ヒト大腸癌組織におけるmiRNA網羅的発現解析とヒト大腸癌細胞株を用いた機能解析を実施した。BRAF変異癌で低発現のある1種類のmiRNAが癌抑制遺伝子の機能を有すること、また抗EGFR抗体などの治療感受性に関与することを新しく見出した。現在、このmiRNAの異常制御機構や関連シグナル伝達経路の解析を行っている。今後本研究の知見が、新規治療標的分子の同定や新規分子治療の開発につながることを期待している。</sup>

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to identify specific miRNAs, a class of small RNAs, that could be involved in oncogenesis of a molecular subgroup, BRAF-mutated colorectal cancer, and clarify biological functions of the miRNAs. A genome-wide miRNA expression analysis and functional analysis using colorectal cancer cell lines revealed that a miRNA, significantly down-regulated in BRAF-mutated colorectal cancer, acts as a tumor suppressor and affects sensitivity to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. We are now investigating the mechanism underlying the dysregulation of this miRNA and analyzing the miRNA-involving signaling pathways that may relate to the carcinogenesis and/or chemosensitivity. The results could lead to further developing novel targeted therapies of colorectal cancer.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：miRNA BRAF 抗EGFR抗体

### 1. 研究開始当初の背景

*BRAF*変異/*CIMP*陽性大腸癌はその他の分子サブタイプに比し予後不良であり、特異的な治療戦略が切に望まれる。しかし、現時点で *BRAF*変異/*CIMP*陽性大腸癌の発癌に特異的に関与する分子機構は未解明であり、実臨床において有効な治療標的分子も同定されていない。

申請者らは、先行研究で *BRAF* 変異大腸癌の発癌過程に重要な役割を發揮していると推定される数種類の *miRNA* を同定した。*BRAF* 変異大腸癌における特定の *miRNA* 群の制御異常が *EGFR* 経路あるいはその他の *BRAF* 関連シグナル伝達経路の活性化につながり、この予後不良の分子サブタイプの発癌機構に寄与していると仮定した。

### 2. 研究の目的

本研究では、*BRAF* 変異/*CIMP* 陽性大腸癌の発癌過程に関与する、ある特定の *miRNA* シグナル伝達経路制御機構の詳細を解明すること、さらに、それにより大腸癌における新規治療標的分子を見出すことを目的とする。また、そうした *miRNA* 群と新規治療標的分子が同定されたとして、その次世代治療予測バイオマーカーとしての、血漿 *miRNA* 発現量の測定が実現可能かどうかについて探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

申請者らは、ヒト大腸癌組織 200 例を用いた網羅的 *miRNA* 発現解析により、*BRAF* 変異大腸癌特異的に異常発現を示す *miRNA* 群を同定した。まず、これらの *miRNA* 群がどのように *BRAF* 変異大腸癌発癌機構に特異的に関与しているかに関する詳細を調べるために、癌の増殖やアポトーシス、癌の浸潤・転移能などへ与える影響を調べる機能解析を、大腸癌細胞株で強制発現系やノックダウン系を用いて行う。

次に、大腸癌細胞における *miRNA* の強制発現下で、網羅的タンパク質発現解析を行うことにより、その *miRNA* 群がどのような分子あるいは分子シグナル経路を直接制御するかどうかを探索する。*miRNA* の強制発現系やノックダウン系の条件下で、western blot 解析や luciferase assay を用いてさらに詳細な *miRNA* シグナル伝達経路を解析する。

さらに、可能であれば *BRAF* 変異大腸癌特異的 *miRNA* の新規治療効果予測バイオマーカーとしての有用性を、大腸癌組織・患者血漿を用いた *miRNA* 発現解析を行うことにより探索する。併せて、新規大腸癌組織を用いて、*miRNA* 発現解析に加えて *CIMP* 解析や *miRNA* プロモーターの DNA メチル化解析を行い、分子統合解析を目指す。

### 4. 研究成果

1. *BRAF* 変異大腸癌で異常発現を呈する *miRNA* のうち、*miR-193a-3p* が、癌抑制遺伝子機能を有することを示した。

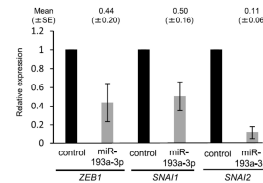


図1 *miR-193a-3p* の overexpression により EMT 遺伝子の発現低下を誘導される

2. *miR-193a-3p* の低発現の大腸癌患者では、抗 *EGFR* 抗体の感受性が低いことを見出した。

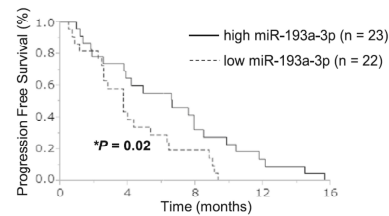


図2 *miR-193a-3p* 低発現の大腸癌患者では、抗 *EGFR* 抗体療法による無増悪生存期間が短縮する

3. 変異型 *BRAF* の強制発現により、*miR-193a-3p* の発現レベルが影響を受けることを示した。*miR-193a-3p* と *BRAF* の間に何らかの制御機構が介在していることが示唆された。

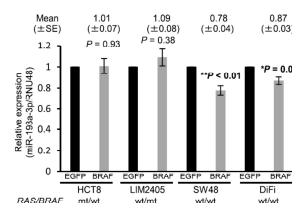


図3 *BRAF* の overexpression により、RAS/*BRAF* 野生型の大腸癌細胞株でのみ *miR-193a-3p* の発現が低下する

ここまでの成果を下記論文 (Takahashi H et al. 2017 BMC Cancer.) として報告した。

4. *miR-193a-3p* の制御異常に異常メチル化が関与しているか、メチル化解析を進行中である。

5. *miR-193a-3p* の下流遺伝子群を、網羅的タンパク質解析で同定中である。

6. 大腸癌患者の血漿 *miRNA* レベルが治療予測バイオマーカー解析として有用か、別コホートを用いて解析中である。

### 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 13 件)

1. Takahashi H, Takahashi M, Ohnuma S, Unno M, Yoshino Y, Ouchi K, Takahashi S, Yamada Y, Shimodaira H, and Ishioka C. microRNA-193a-3p is specifically downregulated and acts as a tumor suppressor in BRAF-mutated colorectal cancer. **BMC Cancer**. 2017 17:723. 査読有り
2. Takahashi M, Takahashi M, Komine K, Yamada H, Kasahara Y, Chikamatsu S, Okita A, Ito S, Ouchi K, Okada Y, Imai H, Saijo K, Shirota H, Takahashi S, Mori T, Shimodaira H, Ishioka C. The G8 screening tool enhances prognostic value to ECOG performance status in elderly cancer patients: A retrospective, single institutional study. **PLoS ONE**. 2017 12: e0179694. 査読有り
3. Takahashi M, Komine K, Imai H, Okada Y, Saijo K, Takahashi M, Shirota H, Ohori H, Takahashi S, Chiba N, Mori T, Shimodaira H, Ishioka C. Efficacy and safety of gemcitabine plus docetaxel in Japanese patients with unresectable or recurrent bone and soft tissue sarcoma: results from a single-institutional analysis. **PLoS One**. 2017;12:e0176972. 査読有り
4. Imai H, Saijo K, Yamada H, Ohuchi K, Okada Y, Komine K, Takahashi M, Takahashi S, Takahashi M, Shimodaira H, Ishioka C. Efficacy and safety of denosumab versus zoledronic acid in delaying skeletal-related events in patients with gastrointestinal cancer, pancreas-biliary system cancer, and other rare cancers. **J Bone Oncol**. 2017 6:37-40. 査読有り
5. Takahashi M, Chiba N, Shimodaira H, Yoshino Y, Mori T, Sumii M, Nomizu T, Ishioka C. *OLA1* gene sequencing in patients with *BRCA1/2* mutation-negative suspected hereditary breast and ovarian cancer. **Breast Cancer**. 2017. 24:336-340. 査読有り
6. Zhang X, Shimodaira H, Soeda H, Komine K, Takahashi H, Ouchi K, Inoue M, Takahashi M, Takahashi S, Ishioka C. CpG island methylator phenotype is associated with the efficacy of sequential oxaliplatin- and irinotecan-based chemotherapy and EGFR-related gene mutation in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. **Int J Clin Oncol**. 2016 21:1091-1101. 査読有り
7. Shiono M, Takahashi S, Takahashi M, Yamaguchi T, Ishioka C. Current situation of central venous port implantation procedures and complications: A questionnaire-based survey of 11693 implantations in Japan. **Int J Clin Oncol**. 2016. 21:1172-1182. 査読有り
8. Sugiyama S, Ishizuka M, Takahashi M, Komine K, Imai H, Saijo K, Takahashi M, Shirota H, Takahashi S, Shimodaira H, Ishioka C. Successful sequential treatment of a patient with advanced gastrointestinal stromal tumor using four different molecularly targeted drugs. **Int Canc Conf J**. 2016 5:163-167. 査読有り
9. Imai H, Komine K, Takahashi S, Saijo K, Okada Y, Kobayashi A, Okita A, Chikamatsu S, Kasahara Y, Takahashi M, Oishi T, Shirota H, Takahashi M, Shimodaira H, Ishioka C. Efficacy and Safety Assessment of Paclitaxel in Patients with Docetaxel-Resistant Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Chemotherapy**. 2016 61:262-8. 査読有り
10. Kobayashi A, Takahashi M, Imai H, Akiyama S, Sugiyama S, Komine K, Saijo K, Takahashi M, Takahashi S, Shirota H, Sato N, Fujishima F, Shuin T, Shimodaira H, Ishioka C. Attainment of a Long-term Favorable Outcome by Sunitinib Treatment for Pancreatic Neuroendocrine Tumor and Renal Cell Carcinoma Associated with von Hippel-Lindau Disease. **Intern Med**. 2016 55:629-34. 査読有り
11. Imai H, Shirota H, Okita A, Komine K, Saijo K, Takahashi M, Takahashi S, Takahashi M, Shimodaira H, Ishioka C. Efficacy and Safety of Carboplatin and Etoposide Combination Chemotherapy for Extrapulmonary Neuroendocrine Carcinoma: A Retrospective Case Series. **Chemotherapy**. 2015 61:111-116. 査読有り
12. Ouchi K, Takahashi S, Yamada Y, Tsuji S, Tatsuno K, Takahashi H, Takahashi N, Takahashi M, Shimodaira H, Aburatani H, Ishioka C. DNA methylation status as a biomarker of anti-EGFR treatment for metastatic colorectal cancer. **Cancer Sci**. 2015 106:1722-9. 査読有り

13. Komine K, Shimodaira H, Takao M, Soeda H, Zhang X, Takahashi M, Ishioka C. Functional complementation assay for 47 MUTYH variants in a MutY-disrupted Escherichia coli strain. *Hum Mutat.* 2015; 36:704-11. 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Takahashi, H. , Takahashi, M. , Takahashi, S. , H., S. , Ishioka, C. : microRAN-193a-3p acts as a tumor suppressor in BRAF-mutated colorectal cancer AACR 2016 Apr 18 , 2016 . New Orleans, USA .

〔図書〕(計 7 件)

1. 高橋 雅信【大腸癌化学療法の最新知見】切除不能進行再発大腸癌に対する全身化学療法 バイオマーカーを用いた予後予測と治療適応の実際 最新のトピックスを含めて(解説/特集) 消化器の臨床(1344-3070)20 巻 2 号 Page 104-109 (2017.04)
2. 高橋雅信 特集 免疫チェックポイント制御障害療法の新展開 がん細胞の遺伝子異常集積と治療効果 癌と化学療法 癌と化学療法社 43:Page 678-82 (2016)
3. 高橋雅信 14 各種抗がん薬 1. 殺細胞性抗がん薬 C)代謝拮抗薬 新臨床腫瘍学 がん薬物療法専門医のために 改訂第4版(日本臨床腫瘍学会 編集) 南江堂, Page 242-247 (2015)
4. 高橋雅信【家族性腫瘍学-家族性腫瘍の最新研究動向-】症候群 Peutz-Jeghers syndrome (ポイツ・ジェガーズ症候群) 日本臨床 73 巻増刊6 家族性腫瘍学 Page 220-224 (2015)
5. 高橋雅信【膵癌・胆道癌-基礎と臨床の最新研究動向-】膵癌 新しい化学療法と臨床試験 エルロチニブ、スニチニブ、エベロリムス 日本臨床. 73 巻増刊 3 膵癌・胆道癌 Page 409-413 (2015).
6. 高橋雅信【抗がん剤の副作用と支持療法-より適切な抗がん剤の安全使用をめざして-】系統別抗がん剤の副作用 分子標的薬 抗体薬 抗 EGFR 抗体薬(解説/特集) 日本臨床 73 巻増刊 2 抗がん剤の副作用と支持療法 Page 219-223 (2015)
7. 高橋雅信【がん薬物療法の最前線～抗体医薬品を中心に～】抗 EGFR 抗体による固形がん治療(解説/特集) 医薬ジャーナル (0287-4741) 51 巻 1 号 Page 97-103 (2015)

〔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：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.co.idac.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
高橋 雅信 (TAKAHASHI, Masanobu)  
東北大学・加齢医学研究所・准教授  
研究者番号：00447161

(2)研究分担者  
( )  
研究者番号：

(3)連携研究者  
( )  
研究者番号：

(4)研究協力者  
高橋秀和 (TAKAHASHI, Hidekazu)  
石巻赤十字病院・腫瘍内科・医師  
小林輝大 (KOBAYASHI, Akihiro)  
東北大学・加齢医学研究所・大学院生