

令和元年5月22日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07145

研究課題名(和文) 大腸癌の分子異常サブタイプ別のmicroRNA解析と次世代診断・標的治療への応用

研究課題名(英文) Identification of microRNA and epigenome abnormality in colorectal cancer based on molecular subtype

研究代表者

能正 勝彦 (NOSHO, KATSUHIKO)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10597339

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)：我々は大腸癌患者の血液を用いて、その超早期診断を目的としたmolecular classificationに基づいたmicroRNA発現解析を施行。さらに分子標的薬剤の効果予測因子の同定を目指した血中microRNAによる新たな非侵襲的分子診断方法の開発を行った。その結果、大腸癌組織でのmicroRNA-31(miR-31)発現レベルは抗EGFR抗体薬の感受性予測に有用であると考えられた。また大腸癌のmiR-31の発現制御としてポリコーム蛋白のEZH2は重要な働きをしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、我々は大腸癌においてEZH2がmiR-31の発現を制御することを世界で初めて明らかにした。癌の発育進展に関わるmicroRNAを制御するポリコームタンパク阻害剤やHDAC阻害剤、DNA脱メチル化酵素などを同定することは新たな治療方法を開発できる可能性があるため、今後も本研究をさらに発展させたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs can function as oncogenes or tumour suppressors. Therefore, they have been increasingly recognized as useful biomarkers for various human cancers. With regard to colorectal cancers (CRCs), using miRNA array analysis, we recently discovered that microRNA-31(miR-31) expression is significantly up-regulated in BRAF-mutated colorectal cancers (CRCs) compared with that in wild-type CRCs. Moreover, associations were identified between miR-31 expression, proximal tumor location and poor prognosis for CRCs. Moreover, the results of functional analysis showed that miR-31 may regulate BRAF activation and that the oncogenic role of miR-31 and its possibility of therapeutic target in CRCs. Thus, our current data suggest that miR-31 may be a diagnostic biomarker and therapeutic target in CRC. These novel data may lead to the establishment of a new therapeutic target or a theranostic procedure in gastroenterological cancers.

研究分野：大腸癌

キーワード：EZH2 microRNA 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国において癌は死亡原因の第1位であり、癌好発年齢である中・高年者の増加と共に著しい増加を示している。よって消化器癌の新規バイオマーカーの探索としてこれらの役割を明らかにすることは、非常に重要である。近年、microRNAの発現異常は様々な消化器癌で報告され、消化器癌においても診断や治療のバイオマーカーになる可能性が示唆されている。本邦において大腸癌は男女共に癌死亡原因の上位を占めており、特に高齢者の右側結腸癌が増加してきている。近年、転移性大腸癌の治療として抗EGFR抗体薬等の分子標的薬が出現し、日常臨床で用いられているが、その感受性を予測するmicroRNAはまだ同定されていない。よって大腸癌の分子診断や治療に応用可能なmicroRNAを同定することで治療の個別化が進めば、大腸癌の治療方針が大きく変わる可能性がある。

2. 研究の目的

microRNAに関しては、我々は最近、大腸癌症例を対象にアレイを用いてBRAF遺伝子変異と有意な相関を示すmicroRNA-31(miR-31)の同定に成功。さらに癌組織のmiR-31発現が転移性大腸癌における抗EGFR抗体薬の効果予測因子となることも明らかにしてきた。さらに大腸癌細胞株を用いた実験でmiR-31阻害薬は有意な抗腫瘍効果をもたらすことも合わせて報告している。よって従来の分子標的薬剤にmicroRNA阻害薬を上乗せした併用療法は、大腸癌の新たな治療戦略として期待される。

転移性大腸癌の日常臨床で用いられている抗EGFR抗体薬はKRAS遺伝子変異陽性のようなEGFR下流シグナルが活性化している症例では効果が期待できず、使用できる症例は全大腸癌の半数にも満たない。しかしながらそのような症例でも、従来の抗EGFR抗体薬にその下流シグナルを制御するmicroRNA阻害薬を併用することで抗腫瘍効果が得られる可能性がある。

3. 研究の方法

大腸癌は前癌病変からの発生経路が単一でなく、また遺伝子異常も多様であることから、その異常のサブタイプ別に癌患者の血中や組織で特異的に発現するmicroRNAを同定する必要がある。それが実現可能になれば診断や治療の個別化が進み、大腸癌患者数の減少や治療薬の選択等により医療費削減に大きく貢献できるものと考えられる。そこで我々は研究期間内に以下の計画を行った。

(1) バイオマーカー探索として大腸癌 molecular classification に基づいた血中 microRNA 解析

対象は血中と癌組織のDNAとRNA解析が可能な約200例の大腸癌患者。それらの症例を分子異常サブタイプ別に分類し、血中と癌組織におけるmicroRNA発現をアレイで網羅的に解析し、両者の発現を比較検討。それぞれのサブタイプで発現が相関するmicroRNAを探索した。

(2) 従来の分子標的薬剤に microRNA 阻害薬を併用した新たなオーダーメイド治療の可能性

治療のターゲットとなりうるmicroRNAに関しては大腸癌細胞株を用い、その阻害薬を分子標的薬剤に併用することで、更なる抗腫瘍効果が期待できるか大腸癌の分子異常別に検討した。

(3) 同定された microRNA を制御するヒストン修飾などのエピジェネティックな異常を解明

同定されたmicroRNAはポリコムタンパクの変化によるヒストン修飾やDNAメチル化などのエピジェネティックな異常によって制御されている可能性がある。よって遺伝子変異などの分子異常が異なる多種の大腸癌細胞株を用いてポリコムタンパク阻害剤やHistone Deacetylase(HDAC)阻害剤、DNA脱メチル化酵素などを投与することでmicroRNA発現レベルに変化をきたすか検証した。

4. 研究成果

血中と癌組織におけるmiR-31の両者の発現を比較検討したが、血中でのmiR-31の発現量が少ないためか両者に相関は認められなかった。またアレイ解析でmiR-31以外のmicroRNAに関して網羅的に解析を行ったが血清サンプルでの発現量が低く、癌組織と血中で相関は得られなかった。

治療のターゲットとなりうる microRNA に関しては細胞株や動物実験を用いて、その阻害薬を抗 EGFR 抗体薬 (cetuximab) に併用することで、更なる抗腫瘍効果が期待できるかどうか検討。その結果、BRAF 遺伝子変異陽性の大腸癌細胞株においてのみ抗 EGFR 抗体薬に miR-31 阻害薬の上乗せ効果が認められた。

同定された microRNA はポリコームタンパクの変化によるヒストン修飾や DNA メチル化などのエピジェネティックな異常によって制御されている可能性がある。よって遺伝子変異などの分子異常が異なる多種の大腸癌細胞株を用いてポリコームタンパク阻害剤や HDAC 阻害剤、DNA 脱メチル化酵素などを投与することで microRNA 発現レベルに変化をきたすか検証した。その結果、microRNA-31 はポリコームタンパクである EZH2 によって抑制的に制御されることが分子異常サブタイプに関わらず解析した全ての大腸癌細胞株で明らかとなった。大腸癌細胞株を用いた検討では、EZH2 をノックダウンすることで miR-31 発現の上昇が認められた。また ChIP assay では EZH2 ノックダウンにより miR-31 プロモーター領域の H3K27me3 が減少することも判明した。

今回の検討から血中と癌組織の microRNA 発現は必ずしも相関するわけではないことから、血中 microRNA を用いた早期分子診断や薬剤感受性のバイオマーカーとしての応用は困難のように思われた。今後、microRNA 抽出試薬を変更するなどして、血中からの microRNA 抽出について引き続き検討していきたいと考える。また大腸癌細胞株を用いた従来の分子標的薬剤 (抗 EGFR 抗体薬) に miR-31 阻害薬を併用した新たなオーダーメイド治療については、今回の検討で分子異常サブタイプ (BRAF 遺伝子変異の有無) によって上乗せ効果がことなることが今回の検討で明らかとなった。今後、動物実験などを行って分子標的薬剤に microRNA 阻害薬を併用した個別化治療をさらに検証してみたいと考えている。さらに今回、我々は大腸癌において EZH2 が miR-31 の発現を制御することを世界で初めて明らかにした。癌の発育進展に関わる microRNA を制御するポリコームタンパク阻害剤や HDAC 阻害剤、DNA 脱メチル化酵素などを同定することは新たな治療方法を開発できる可能性があるため、今後も本研究をさらに発展させたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) Eto T, Miyake K, **Nosho K**, Ohmuraya M, Imamura Y, Arima K, Kanno S, Fu L, Kiyozumi Y, Izumi D, Sugihara H, Hiyoshi Y, Miyamoto Y, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Furukawa T, Araki K, Baba H, Ishimoto T. Impact of loss-of-function mutations at the RNF43 locus on colorectal cancer development and progression. *J Pathol.* 2018;245:445-455.
- (2) Ishigami K, **Nosho K**, Koide H, Kanno S, Mitsuhashi K, Igarashi H, Shitani M, Motoya M, Kimura Y, Hasegawa T, Kaneto H, Takemasa I, Nakase H. MicroRNA-31 reflects IL-6 expression in cancer tissue and is related with poor prognosis in cholangiocarcinoma. *Carcinogenesis.* 2018;39:1127-1134. 査読有
- (3) Kanno S, **Nosho K**, Ishigami K, Yamamoto I, Koide H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Shitani M, Motoya M, Sasaki S, Tanuma T, Maguchi H, Hasegawa T, Kimura Y, Takemasa I, Shinomura Y, Nakase H. MicroRNA-196b is an independent prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2017;38:425-31. 査読有
- (4) Yamamoto I, **Nosho K**, Kanno S, Igarashi H, Kurihara H, Ishigami K, Ishiguro K, Mitsuhashi K, Maruyama R, Koide H, Okuda H, Hasegawa T, Sukawa Y, Okita K, Takemasa I, Yamamoto H, Shinomura Y, Nakase H. EZH2 expression is a prognostic biomarker in patients with colorectal cancer treated with anti-EGFR therapeutics. *Oncotarget.* 2017;8:17810-8. 査読有
- (5) **Nosho K**, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Igarashi H, Maruyama R, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22:557-66. 査読有
- (6) Kurihara H, Maruyama R, Ishiguro K, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Mitsuhashi K, Igarashi H, Ito M, Tanuma T, Sukawa Y, Okita K, Hasegawa T, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y, **Nosho K***. The relationship between EZH2 expression and microRNA-31 in

colorectal cancer and the role in evolution of the serrated pathway. Oncotarget. 2016;7:12704-12717. 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

- (1) **能正勝彦**, 栗原弘義, 山本至, 菅野伸一, 石上敬介, 石黒一也, 丸山玲緒, 沖田憲司, 竹政伊知朗, 山本博幸, 篠村恭久, 仲瀬裕志: 大腸癌における EZH2 発現とエピゲノム異常との関連の検討と抗 EGFR 抗体薬の効果予測バイオマーカーとしての可能性 (ワークショップ) 第 13 回日本消化管学会総会学術集会. 2017.2.18. 名古屋
- (2) **能正勝彦**, 栗原弘義, 山本至, 菅野伸一, 石上敬介, 石黒一也, 三橋慧, 伊藤美樹, 丸山玲緒, 沖田憲司, 竹政伊知朗, 篠村恭久, 仲瀬裕志. 大腸癌の次世代分子診断・治療のバイオマーカーとしてのポリコーム蛋白 EZH2 と microRNA-31 の可能性. 第 71 回日本大腸肛門病学会学術総会. 2016.11.18-19. 伊勢
- (3) **Nosho K**, Sukawa Y, Kanno S, Yamamoto I, Ishigami K, Mitsuhashi K, Ito M, Kurihara H, Yamamoto H, Shinomura Y, Nakase H. Association of Fusobacterium species in Japanese gastrointestinal cancers with tumor molecular abnormalities and prognosis. The 75th Annual meeting of the Japanese cancer association. 2016.10.6-8. Yokohama
- (4) **能正勝彦**, 栗原弘義, 丸山玲緒, 菅野伸一, 山本至, 石上敬介, 石黒一也, 三橋慧, 沖田憲司, 竹政伊知朗, 山本博幸, 篠村恭久, 仲瀬裕志. 大腸癌におけるポリコーム蛋白 EZH2 発現と分子異常・生命予後との関連と microRNA-31 の制御機構. 第 27 回日本消化器癌発生学会総会. 2016.9.15-16. 鹿児島

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。