

令和元年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19195

研究課題名(和文) 高発現遺伝子と低発現遺伝子を組合せた大腸癌の新規腫瘍マーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of a new tumor marker of colorectal cancer that is a combination of high expression genes and low expression genes

研究代表者

西岡 光昭 (NISHIOKA, Mitsuaki)

山口大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：70738963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナル経路は大腸癌の発生・進展に關する重要なシグナルである。本研究者は大腸癌におけるWntシグナル経路關連遺伝子であるTROY遺伝子が大腸癌患者の予後予測に有用なマーカーの可能性を發見した。特にステージII、III大腸癌の術後の再発予測においてTROY遺伝子が大きく關与していること發見した。このTROY遺伝子は大腸においては比較的低発現であるため、デジタルPCRを用いて發現量を測定することでリアルタイム定量PCRよりも感度よく予後を判定できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の進行度を示すステージ分類(I～IV)において、ステージI～IIIのほぼ全てで外科的切除が第一選択となる。手術後の再発率はステージI、II、IIIでそれぞれ4.1%、13.1%、30.8%と、ステージが上がると再発率も上昇している。そのため大腸癌の手術後は必要に応じて化学療法を行うが、その明確な適応基準がなく曖昧である。また、切除不能な転移再発を起こした場合、予後に大きく寄与すると考えられるため、再発を予測の評価方法の開発が課題である。本研究によりII、III大腸癌の術後の再発予測においてTROY遺伝子が大きく關与していること發見した。この成果は今後の大腸癌手術後の再発予防に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling plays an important role in development and progression of colorectal cancer (CRC). We found that TROY gene involved in the Wnt/ β -catenin signaling pathway can be a prognostic biomarker in CRC patients. Especially, in patients with stage II and III CRC, TROY overexpression was the independent prognostic factor of disease-free survival after operation. These results suggest that analysis of TROY might help predict clinical outcome in patients with CRC. Since TROY is relatively low expression in colon, we found that the measurement of digital PCR is more sensitive than that of real time quantitative PCR on the prognosis in CRC patients when we measured TROY mRNA expression level.

研究分野：腫瘍検査学

キーワード：TROY LGR5 大腸癌 デジタルPCR

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

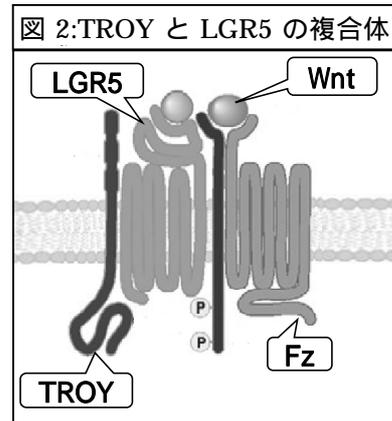
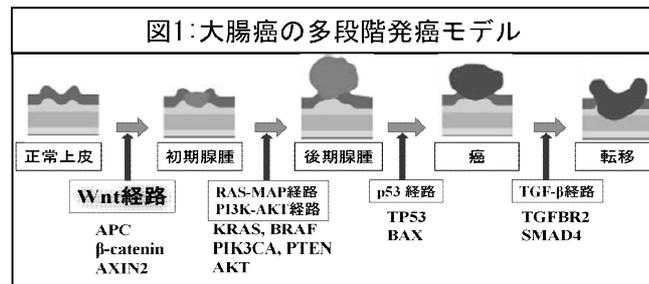
1. 研究開始当初の背景

【研究背景】

近年の日本における大腸癌死亡率および罹患率は著しく増加している。2013年の国立がん研究センターのがん統計によれば、女性の大腸癌死亡は全悪性新生物による死亡のなかで最多であり、男性では肺癌、胃癌に次いで多い。大腸癌の半数は診断時すでに進行癌であり、その化学療法・分子標的治療における個別化治療の必要性の高まりから予後予測や治療効果予測のための新規マーカー開発が期待されている。

大腸癌の発生・進展においては多段階発癌モデルが提唱されており、正常細胞が癌細胞へと変化していく過程において様々な遺伝子の関与が現在までに明らかとなっている。Wnt経路(図1)はこの多段階発癌モデルの中の初期段階から活性化しており、この経路に関連した遺伝子群の発現状況は大腸癌の発生・進展・転移に深く関与している。近年、消化器系細胞の幹細胞や大腸癌の癌幹細胞のマーカーであるLGR5がWnt、Wntの受容体(Frizzled:Fz)、そして新規Wnt経路関連遺伝子であるTROYと複合体を形成し、大腸癌の進展に関与しているという新たな報告があった(Gastroenterology 2013;144:381-919、図2)。これら遺伝子を組み合わせた大腸癌の早期発見や予後予測としての腫瘍マーカーの確立及び機能解析は未だされていない。

一方、癌の増殖・転移に関与している癌幹細胞の割合は全癌細胞の数%であり、この癌幹細胞由来の分子は全癌組織から見ると低発現であるものの、その微細な変化を観察することは癌の早期発見や予後予測マーカーとして有用性が非常に高い。LGR5は消化器系細胞の幹細胞や大腸癌の癌幹細胞のマーカーであり、大腸癌の発生や大腸癌幹細胞に深く関与している可能性があり、たとえ低発現であってもその推移を観察することは重要である。



2. 研究の目的

本研究では従来用いられているリアルタイムPCRよりも感度が良く、且つ再現性に優れ、遺伝子の数(コピー数)の絶対数が定量可能なデジタルPCRを用いた低発現遺伝子の発現量を定量化し、TROYとLGR5の定量値を組み合わせることによる臨床応用可能な腫瘍マーカーの確立とその機能解析を目指した。

3. 研究の方法

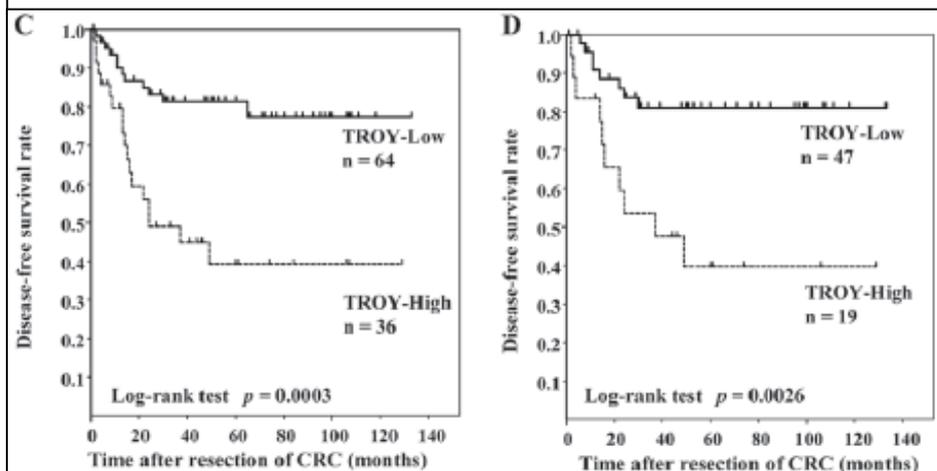
Wnt経路関連遺伝子の発現定量値を組み合わせた臨床応用可能な腫瘍マーカーの確立のために以下の2点で研究を進める。

- (1) 外科的手術により得られた大腸癌組織からRNA抽出を行う。得られた臨床検体のRNA中のTROY及びLGR5の発現量をリアルタイム定量PCR及びデジタルPCRにて測定し、臨床病理学的因子や予後との関連性を検討する。対象検体は初回検討群として100例を準備し、その後の確認検討群として88例を準備する。
- (2) 大腸癌細胞株を用い、TROYの機能解析を行い、これら分子と腫瘍の発生・進展・転移の関連性の解明を行う(in vitro実験)。

4. 研究成果

- (1) 初回検討群である100症例の大腸癌患者の腫瘍部組織中のTROY遺伝子発現レベルをリアルタイム定量PCRにて測定し、再発予後との関連性を検討したところ、TROY高発現群は低発現群と比較し有意に無病再発期間が短く、再発を予測する因子として有用であった。特にステージII、III大腸癌患者に限定して同様に解析しても、TROY高発現群は手術後から再発までの期間が有意に短いことが確認され、この報告は世界初の知見である(図3)。一方でLGR5遺伝子においても同様の解析を行ったが有意な差は認められず、多変量解析の結果からもLGR5遺伝子では大腸癌患者の手術後の再発予測として有用ではなく、TROY遺伝子のみが再発期間と有意に関連性があることが示された(5.主な発表論文等の)。このことからTROY遺伝子の発現量解析は大腸癌患者

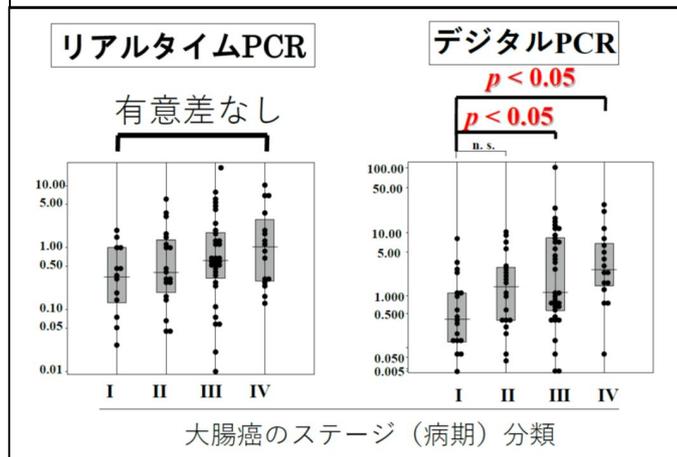
図3 TROY 過剰発現群(High)は発現の低い群(Low)に比べ、無病生存期間が有意に短い。左図は全大腸癌患者からの解析結果、右図はステージII、III 大腸癌患者限定での解析結果(5.主な発表論文等より抜粋)



(2) の手術後の再発予測を可能とする有用なマーカーであることが示唆された。検出感度や大腸癌悪性度評価の点においてリアルタイム定量 PCR 法とデジタル PCR

法との比較を行うために、確認検討群である 88 例の大腸癌患者の腫瘍部組織中の RNA から TROY 遺伝子の発現量測定解析を両測定法を用いて行った。検出感度に関して TROY 遺伝子はリアルタイム定量 PCR 法では 88 例中 4 例が検出感度以下であったが、デジタル PCR 法ではそのうち 2 例の定量測定が可能であった。また、Stage I~IV に分けて発現量の比較を行ったところ、リアルタイム定量 PCR 法による測定値では有意な差を認めなかったが、デジタル PCR 法による測定値では Stage I に比べ Stage III と Stage IV で有意に発現量が高値であった($p < 0.05$ 、図 4)。低濃度領域における正確性を考慮するとリアルタイム定量 PCR 法よりもデジタル PCR 法の方がより信頼性があると考えられる。TROY 遺伝子発現は大腸組織において比較的低発現であることがこれまでの我々の予備実験より確認されているため、TROY 遺伝子の検出感度や大腸癌悪性度評価の点において本結果よりデジタル PCR 法はリアルタイム定量 PCR 法よりも有用であった。本結果は 2018 年 11 月に行われた第 65 回日本臨床検査医学会学術集会にて報告している。

図4 大腸癌ステージ別の TROY 発現量をリアルタイム定量 PCR 法とデジタル PCR 法にて比較



(3) 培養細胞を用いた in vitro 実験を行うために TROY 遺伝子のバリエーション 1 (TROYv1) 及びバリエーション 2 (TROYv2) の遺伝子を組み込んだプラスミドを大腸癌細胞株である RKO 細胞及び HCT116 細胞にトランスフェクションする実験を行った。また、作成した TROYv1 または TROYv2 過剰発現細胞に LGR5 遺伝子を組み込んだプラスミドを再度トランスフェクションし TROY/LGR5 過剰発現細胞の作製も行った。現在これらの細胞を用いた機能解析実験を行っている途中であり、今後その結果を関連学会等にて発表予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- (1) **Mitsuaki Nishioka**, Yutaka Suehiro, Kouhei Sakai, Toshihiko Matsumoto, Naoko Okayama, Hidekazu Mizuno, Koji Ueno, Nobuaki Suzuki, Shinichi Hashimoto, Taro Takami, Shoichi Hazama, Hiroaki Nagano, Isao Sakaida, Takahiro Yamasaki. TROY is a promising prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Oncology letters*. 15(4):5989-5994;2018. doi: 10.3892/ol.2018.8079. 査読有
- (2) Yuko Yamaoka, Yutaka Suehiro, Shinichi Hashimoto, Tomomi Hoshida, Michiyo Fujimoto, Michiya Watanabe, Daiki Imanaga, Kouhei Sakai, Toshihiko Matsumoto,

- Mitsuaki Nishioka, Taro Takami, Nobuaki Suzuki, Shoichi Hazama, Hiroaki Nagano, Isao Sakaida, Takahiro Yamasaki. Fusobacterium nucleatum as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. Journal of gastroenterology. 53(4):517-524;2017. doi: 10.1007/s00535-017-1382-6. 査読有
- (3) Yutaka Suehiro, Kouhei Sakai, Mitsuaki Nishioka, Shinichi Hashimoto, Taro Takami, Shingo Higaki, Yoshitaro Shindo, Shoichi Hazama, Masaaki Oka, Hiroaki Nagano, Isao Sakaida, Takahiro Yamasaki. Highly sensitive stool DNA testing of Fusobacterium nucleatum as a marker for detection of colorectal tumours in a Japanese population. Annals of clinical biochemistry. 54(1):86-91;2017. doi: 10.1177/0004563216643970. 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

西岡光昭 他、大腸癌患者における droplet digital PCR を用いた TROY 発現解析の有用性について、第 65 回日本臨床検査医学会学術集会、2018 年 11 月。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。