

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07993

研究課題名(和文) 予後不良大腸癌の発癌に関与するノンコーディングRNAの機能解析と新規治療開発

研究課題名(英文) Analysis of non-coding RNA involved in tumorigenesis of colorectal cancer with poor prognosis, and discovery of novel therapy using non-coding-RNA-related mechanism

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、BRAF変異/CIMP陽性大腸癌における、特定のnon-coding RNAが関与する発癌機構の解明、さらに新規治療標的分子の同定を目的とした。研究者らは、BRAF変異大腸がん特異的に、miR-193a-3pががん抑制的に働くことをin vitroの解析にて初めて明らかにし既に誌上発表している。さらに、そのがん遺伝子としての詳しい機能を調べるために、ヒト大腸がん細胞を用いて、網羅的miRNA発現解析やプロテオーム解析に加えて、機能解析を行い、その機能を明らかにし、またそのmiR-193a-3pが分子標的薬の効果を増強する可能性を明らかにした(論文投稿中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見から、BRAF変異大腸がんでの新規標的分子の候補をいくつか見出した。現在、それらを標的とした分子標的治療の開発に着手し、臨床開発を目指している。この取り組みがさらに順調に進めば、予後不良のBRAF変異大腸がんでの治療成績向上につながり、大きな社会的意義が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the mechanisms underlying carcinogenesis of BRAF-mutated/CIMP-positive colorectal cancer in which certain non-coding RNAs are involved, and to identify novel therapeutical molecular targets involved in the carcinogenesis. We have previously published our research demonstrating that miR-193a-3p acts as a tumor-suppressor in BRAF-mutated cancer. To clarify its more detailed functions, we performed comprehensive miRNA expression analysis, proteome analysis, and some functional assays regarding cellular proliferation, apoptosis, and invasion/metastasis using human colorectal cancer cell lines. As a result, we found that miR-193a-3p acts as a tumor-suppressor and modulated sensitivity by some molecularly-targeted agents in BRAF-mutated cancer (a manuscript is being submitted).

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：BRAF non-coding RNA miRNA 発がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行再発大腸癌、特に *BRAF* 変異/*CIMP* 陽性大腸癌は予後不良であり、特異的な治療戦略が切に望まれている。申請者は、先行研究で、miR-193a-3p が *BRAF* 変異大腸癌で癌抑制 miRNA として働き、抗 EGFR 抗体に対する感受性にも影響することを見出した(*Takahashi H et al. BMC Cancer 2017 17:723*)。miR-193a-3p 自体あるいは miRNA 関連経路分子が新規治療標的として有望な可能性が示唆される。しかし、miRNA だけでなく、様々な癌腫の発癌過程に関与していることが明らかになりつつある lncRNA など他の non-coding RNA の異常が、*BRAF* 変異大腸癌の癌化機構に関与している可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、*BRAF* 変異/*CIMP* 陽性大腸癌の大腸癌発癌過程に関与する、ある特定の non-coding RNA 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、血漿 non-coding RNA 発現量が次世代治療予測バイオマーカーとして有用かどうかを探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *BRAF* 変異/*CIMP* 陽性大腸癌の発癌過程に関与する non-coding RNA のスクリーニングとそれらの機能の解明

研究者は大腸癌組織 200 例を用いた網羅的 miRNA 発現解析により、*BRAF* 変異大腸癌に特異的に異常発現を示す miRNA 群を同定した。さらに、それら大腸癌組織 200 例を用いた網羅的 lncRNA 発現解析により、*BRAF* 変異大腸癌特異的に異常発現を示す lncRNA を同定する。候補 miRNA や lncRNA がどのように癌の増殖やアポトーシスへの抵抗性へ寄与しているか、また癌の遊走・浸潤・転移能を賦与しているかを調べるさらに詳細な機能解析を複数の大腸癌細胞株、さらに癌皮下移植マウスモデル下でノックダウン系などのシステムを用いて実施する。

(2) non-coding RNA の *BRAF* 変異/*CIMP* 陽性大腸癌の発癌過程に関与する分子機構の解明と新規治療標的分子の同定

大腸癌細胞株を用いて、候補 miRNA の precursor や lncRNA の cDNA をリポフェクションし、細胞内タンパク質発現量の変化を、iTRAQ 法を用いて網羅的に解析する(*D'Ascenzo et al. Brief Funct Genomic Proteomic 2008, 7:127-35*)。有意に発現量が変化したタンパク質分子群の関連経路を同定し、各々の候補標的タンパク質発現量の変化を western blot 解析で検証する。さらに、候補標的遺伝子を miRNA が標的としているか luciferase assay などにより実証する。*BRAF* 阻害薬などの効果を増強・減薬する分子も見出す。

(3) 癌組織中の non-coding RNA 発現ステータス、さらに血漿中 non-coding RNA 発現ステータスが次世代治療予測バイオマーカーとして応用可能かどうかを検証する

既に研究者は、ヒト大腸癌組織 200 例を用いて、*RAS*、*BRAF* などの癌関連遺伝子の変異解析を行い、*BRAF* 変異/*CIMP* 陽性のサブタイプを 20 例抽出した。さらに、別コホートでの *BRAF* 変異/*CIMP* 陽性のサブタイプもさらに 30 例集積でき、これらをも対象に、網羅的 miRNA 発現解析や *CIMP* 解析を行い、より多数の *BRAF* 変異大腸癌の分子学的また臨床的特徴の解明を目指す。さらに、その miRNA や lncRNA の発現量やメチル化ステータスと癌薬物療法の効果との相関を解析する。さらに将来的には、全ゲノムシーケンシングや CNV 解析を加えて、分子学的統合解析を行うことでこのサブタイプの発癌機構の徹底解明を目指す。

4. 研究成果

(1) *BRAF* 変異型大腸癌細胞において *BRAF* 阻害薬及び *MEK* 阻害薬併用療法の感受性増強を認める *miR-193a-3p* を含む 5 種類の *miRNA* を同定した。そのうち、*BRAF* 変異型大腸癌での発現異常が報告されている *miR-193a-3p* は、大腸癌細胞株において、アポトーシスを誘導することにより細胞増殖を抑制した (図 1)。

(2) 網羅的タンパク質発現解析により、*miR-193a-3p* は大腸癌細胞株においてがん関連経路や *PI3K-AKT* 経路を制御しがん抑制遺伝子として機能することを示した。また、*miR-193a-3p* の発現誘導で減少するタンパク質として *FOXO3a* と *ATF2* を新規に同定した (図 2)。

(3) *miR-193a-3p* 発現誘導による *BRAF* 阻害薬、*MEK* 阻害薬及び抗 *EGFR* 抗体併用療法の感受性変化の検証と分子機序の解析を行った。*BRAF* 変異型大腸癌細胞株で *miR-193a-3p* の過剰発現は、*MAPK* 再活性化の抑制により *BRAF* 阻害薬及び *MEK* 阻害薬の併用下で増殖抑制を増強した (図 3)。

図2

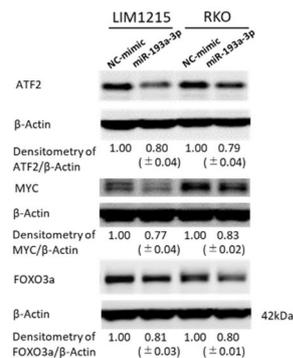


図1

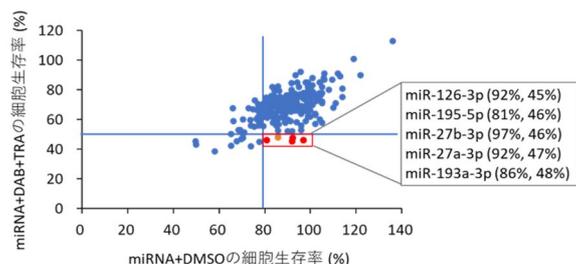
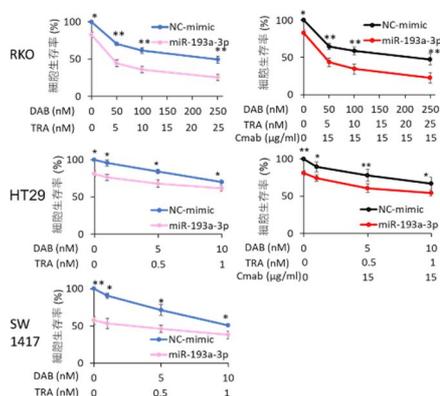


図3



これらの結果をまとめ、現在論文を投稿中である (Hiraide et al.unpublished)。
方法 2 の一部、方法 3 に関する実験は現在進捗中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Hideharu, Takahashi Masanobu, Watanuki Munenori, Watanabe Mika, Hiraide Sakura, Saijo Ken, Komine Keigo, Ishioka Chikashi	4. 巻 21
2. 論文標題 lncRNA HAR1B has potential to be a predictive marker for pazopanib therapy in patients with sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12716	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平出桜, 高橋雅信, 小峰啓吾, 石岡千加史
2. 発表標題 BRAF遺伝子変異型大腸癌においてmiR-Xはがん抑制遺伝子的に働きBRAF/MEK阻害療法の感受性を亢進させる
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiraide S, Takahashi M, Yoshida Y, Komine K, Ishioka C
2. 発表標題 The functional roles of miRNA-193a-3p in colorectal cancer.
3. 学会等名 AACR Virtual Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	平出 桜 (Hiraide Sakura)	東北大学・医学系研究科・大学院生 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山田 英晴 (Yamada Hideharu)	東北大学・医学系研究科・大学院生 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関