

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09216

研究課題名（和文）大腸癌Tumor Buddingを同定する新たなエピゲノムマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of novel epigenetic biomarker for identification of tumor budding in CRC

研究代表者

廣 純一郎（Hiro, Junichiro）

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：70444437

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）：別添の資料に詳細を記載させて頂いたが、大腸癌組織より抽出したRNAにてmiRNA microarray法を用いてBudding high gradeに特異的に異常発現するmiRNAを11個選定し、testing cohortと validation cohortで左記の候補miRNAの発現値とbudding gradeとの相関を検証。各miRNAともhigh budding gradeを高精度に同定しうる結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tumor budding gradeは非常に有用な指標でありながら、内視鏡治療手術標本に基づいて評価されており、大腸癌患者の治療前の戦略に大きく影響していないのが現状であり、high tumor budding gradeを予測しうる分子生物学的バイオマーカーの開発・発展が望まれる現状である。

研究成果の概要（英文）：Please see the attached files. We extracted RNA from tumor tissues of colorectal cancer (CRC) patients. We ordered miRNA microarray, and we identified 11 high budding grade specific dysregulated miRNAs. Then, we investigated the association between the relative expression of each miRNAs and tumor budding grade by using qRT-PCR in testing and validation CRC cohort. As we expected, all of the expression of 11 miRNA were significantly low high-budding grade CRC patients in each clinical cohort.

研究分野：下部消化管悪性腫瘍

キーワード：大腸癌 Tumor Budding grade microRNA バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

本邦における大腸癌患者数は厚生労働省の人口動態調査によると年々増加し、大腸癌死亡数は男女合わせて 42,434 人で(2009 年)、男性では悪性新生物の中では肺癌、胃癌に次いで 3 番目に多く、女性では最も死亡数が多い。したがって大腸癌の死亡数を減らすため、前癌病変あるいは早期癌の段階での診断、あるいは治療が非常に重要である。

早期大腸癌に対して内視鏡下摘除術を施行した症例では、摘除標本の病理所見に基づくリンパ節転移のリスク因子を有する症例においてリンパ節郭清を伴う腸切除(手術治療)が推奨されている(大腸癌治療ガイドライン)。一方で実際に手術治療をおこなった早期大腸癌症例のうちリンパ節転移を認めたのは 8-16%と報告され(Surg Endosc 2016. Brunner W)、手術という過剰治療を防ぐ目的でも、的確なリンパ節転移予測マーカーが必要である。内視鏡治療/手術で得られた大腸癌標本の病理学的評価にて、癌発育先進部間質に浸潤性に存在する単個または 5 個未満の構成細胞から成る癌胞巣である Tumor Budding(簇出)の概念が Ueno らによって提唱されたが、High Budding grade は結腸癌ならびに直腸癌においてリンパ節転移予測因子、遠隔転移予測因子、再発高リスク因子、予後不良因子として複数の報告があり広く知られてきている(Histopathology 2002. Ueno H)(Br J Cancer 2015. Rogers) (Virchows Arch 2016. De Smedt)。このように Tumor budding grade は非常に有用な指標でありながら、内視鏡治療手術標本に基づいて評価されており、大腸癌患者の治療前の戦略に大きく影響していないのが現状であり、high tumor budding grade を予測しうる分子生物学的バイオマーカーの開発・発展が望まれる現状である。

2. 研究の目的

近年、癌化機序としては DNA 変異に伴う Genetic 変化と遺伝子配列変異を伴わない遺伝子発現調節を来す Epigenetic 変化が大きく考慮されてきたが、Epigenetic 変化に関する代表的な分子として microRNA(以下 miRNA)がある。miRNA は 21-25 塩基程度から成る非翻訳 RNA であるが、mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、標的遺伝子の発現を抑制することで、発生、分化、代謝、ウイルス耐性、発がんなど様々な生物学的機能に関与するとされる。miRNA は前述の通り塩基対が短いため、組織中あるいは循環血中でも RNA 分解酵素の影響を受けにくく安定した形で存在する事が知られる(Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2018. Toyama Y)。本研究では、まず次世代シーケンサーによる網羅的解析のもと High Budding grade 症例と強く関与する miRNA パネルを作成し、後ろ向き検証では手術検体を用いて同パネルの High Budding grade 症例同定精度を検証するが、次段階としては早期大腸癌あるいは直腸癌の患者より術前の生検検体を収集し同検体から抽出した RNA より候補 miRNA の定量をおこない、実際に手術をおこなった時の手術病理標本から得られた Tumor budding grade と照らし合わせ、この miRNA パネルの High Budding grade 予測能を前向きに検証する計画とする。術前の検体から得られる RNA は手術検体から得られるものより収量が著明に低いと予想するが、安定した状態で存在する miRNA の定量には支障がないものと期待しており、本研究において定量する対象は miRNA が適切であると考えらる。

3. 研究の方法

(1)次世代シーケンサーを用いた High Budding Grade に特異的な miRNA のプロファイリング
大腸癌症例の手術標本由来癌組織のうち、病理医の評価で High budding grade 症例(n=20)、ならびに low budding grade 症例(n=20)を共同研究先に輸送し共同研究先で次世代シーケンス(Small RNA sequence)を施行する High budding grade 症例に特異的な発現パターンをきたしている候補 miRNA を同定する。

(2)多数サンプルでの qPCR 定量による miRNA パネルの High Budding Grade 同定率に関する検証(Retrospective phase)

Training cohort(合計 100 例-120 例。High budding grade の症例を少なくとも 30 例は含める)、ならびに Validation cohort(合計 300 例-350 例。High budding grade の症例を少なくとも 90 例は含める)の 2 コホートで大腸癌手術標本由来癌組織から RNA を抽出し、また Tumor Budding grade の評価は本学腫瘍病理学医師に依頼し、前述の過程で同定された各候補 miRNA ごとに購入した Taqman-primer を用いて、Reverse-Transcription(以下 RT)をおこない、作成した cDNA をもとに qRT-PCR を施行する。Normalizer の U6 snRNA においても RT ならびに qRT-PCR を施行し、各候補 miRNA の相対発現量を定量し、候補 miRNA の相対発現値の大小と High budding grade の正診率を統計学的に解析する。

(3)生検検体での qPCR 定量による miRNA パネルの High Budding Grade 同定率に関する検証(Prospective phase)

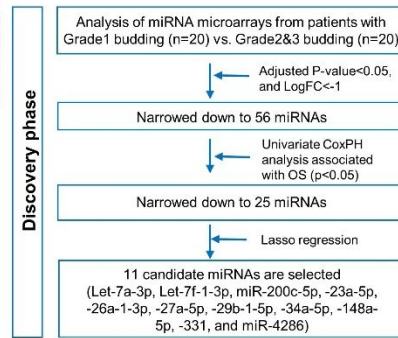
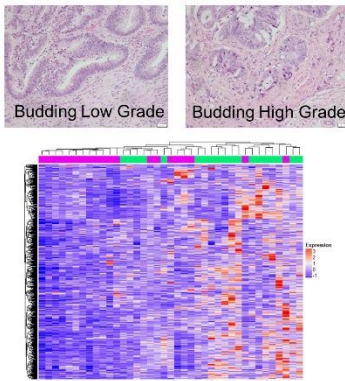
結腸癌/直腸癌にて手術/内視鏡的摘除あるいは化学放射線療法(nCRT)施行予定の症例で生検をおこなう。各症例の Tumor Budding grade の評価を本学腫瘍病理学医師に依頼する。癌組織から RNA を抽出し(早期大腸癌 100 例、直腸癌 50-70 例を目標とする)、前述の Retrospective phase で有用な結果が得られた各候補 miRNA のみ相対発現量を定量し、各症例における miRNA 発現値の大小と high tumor budding grade の正診率を統計解析し、さらに各症例の再発、予後を前向きにフォローアップする。

(4)候補 miRNA の in-vitro, in-vivo モデルにおける機能解析 (Backup plans)

候補 miRNA のうち Retrospective phase の複数 cohort で、有用な結果が得られた miRNA があれば、レンチウイルスベクター/miRNA-mimick などを用い大腸癌細胞株(HCT116, SW480, HT29 など)において候補 miRNA をノックダウン/過剰発現させる。ノックダウン/過剰発現効率を mRNA レベルならびにタンパクレベルで評価後、癌細胞の proliferation/migration/invasion に関する regular assay をおこなう。Bioinformatic tool(target scan, miRTarBase)などで候補 miRNA の標的遺伝子(できれば EMT 関連遺伝子が望ましい)を幾つか選択し、ノックダウン/過剰発現をおこなった細胞株から抽出した mRNA ならびにタンパクを用いてノックダウン群/対照群での標的遺伝子/タンパクの発現を比較評価する。

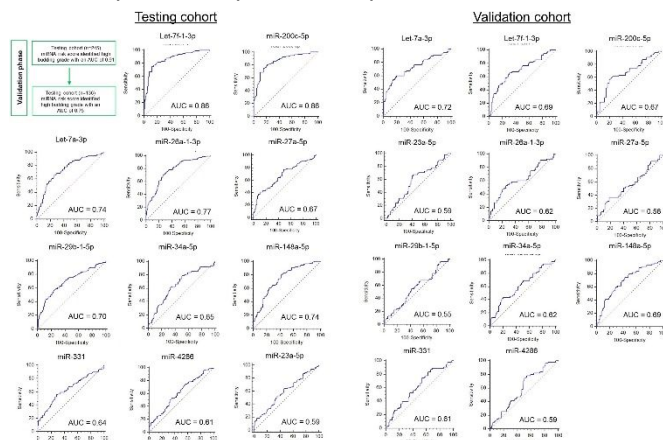
4 . 研究成果

前述の研究計画に基づき実際に研究計画を進めた。結果を以下に示す。



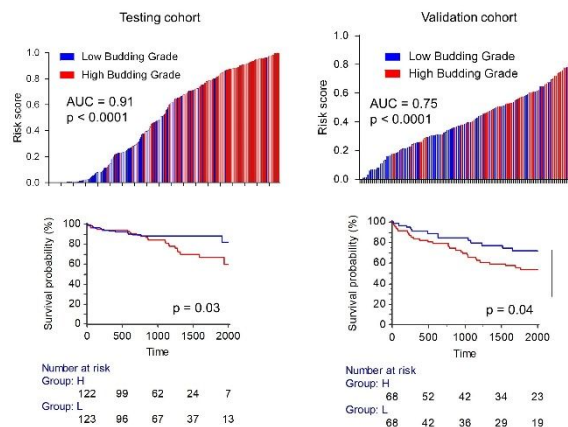
Budding High Grade 症例 (Grade2/3、Budd-High-G)と、 Budding low grade 症例 (Grade1、Budd-low-G)の選定は三重大学病院病理部の 2 名の医師にて評価を頂いた。 Budd-high-G 症例 20 例、Budd-low-G 症例 20 例の腫瘍組織から抽出した RNA を用いて外注で miRNA microarray を施行し、生データを得た。当講座と共同研究をおこなっている生物統計学者(Dr.Jasjit K

Banwait)に生データの解析を依頼し、Adjusted P-value,LogFC, Univariate CoxPH analysis associated with OS で Budd-high-G で異常発現する miRNA を狭小化しさらに Lasso regression にて選定したところ、Let-7a-3p, Let-7f-1-3p, miR-200c-5p, -23a-5p, -26a-1-3p, -27a-5p, -29b-1-5p, -34a-5p, -148a-5p, -331, ならびに miR-4286 の 11 の候補 miRNA が同定された。



引き続き validation phase では、 Testing cohort として 245 例、 Validation cohort として 136 例の大腸癌症例の腫瘍組織より抽出した RNA を用いて qRT-PCR 法にて前述の discovery phase で同定された 11 の候補 miRNA の相対発現値と、 budding grade の関連について検証した。 testing cohort では 11 の候補 miRNA のいずれもが Area Under Curve (AUC)0.59 から 0.86 と有意あるいは有意傾向をもって Budd-high-G で著明低発現である事が判明した。さらに Validation cohort では AUC0.55 から

0.72 と、有意あるいは有意傾向をもって testing cohort と同様に Budd-high-G で著明低発現であるという結果が得られた。



前述の Validation phase の結果をもとに各症例での候補 miRNA の発現値ならびに Budding grade のデータをもとに統計ソフトウェアを用いて複合パネルスコア(リスクスコア)を作成。リスクスコアによる Budd-high-G 症例の検出能を検証したところ Testing cohort では AUC : 0.91、 ならびに Validation cohort では AUC : 0.75 と有意差を持って高い高精度で Budd-high-G 症例を検出する事が判明した。加えて全生存期間(OS)における Youden index でリスクスコア高値群/低値群に 2 群分けして Kaplan meier 分析をおこなったところ、リスクスコア高値群は両コホートとも著明に OS 不良である事が判明した。以上、 前述の方法に記載した(1)と(2)の計画をもとに上記知見が得られ成果を論文化し英文誌に現在投稿中である。

(3)ならびに(4)に記載した計画に関しては、 今後更なる知見が得られるかどうかを検証中で今後も研究活動を継続予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Tadanobu Shimura, Yoshinaga Okugawa, Takahito Kitajima, Akira Yamamoto, Shozo Ide, Hiroyuki Fujikawa, Yoshiki Okita, Takeshi Yokoe, Masaki Ohi, Ajay Goel, and Yuji Toiyama
2. 発表標題 The association between tumor tissue miR-34a expression, tumor budding grade, and the clinical significance in surgically resected colorectal cancer patients
3. 学会等名 The 30th Biennial Congress of ISUCRS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志村匡信、問山裕二、奥川喜永、北嶋貴仁、井出正造、安田裕美、藤川裕之、廣純一郎、大井正貴、荒木俊光、今井裕、渡邊昌俊、Ajay Goel、楠正人
2. 発表標題 大腸癌組織におけるmiRNA-375の発現とhigh grade簇出との関連、ならびにその臨床的意義
3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	問山 裕二 (Toiyama Yuji) (00422824)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
研究分担者	藤川 裕之 (Fujikawa Hiroyuki) (40616091)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	

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 分 担 者	楠 正人 (Kusunoki Masato) (50192026)	三重大学・医学系研究科・寄附講座大学教員 (14101)	
研究 分 担 者	荒木 俊光 (Araki Toshimitsu) (70343217)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	

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