

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：22701  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K08738  
研究課題名(和文) エンハンサー解析手法を用いた大腸癌リンパ節転移の有無による原発巣の差異の解明  
研究課題名(英文) Elucidation of the differences in primary tumor by lymph node metastasis of colorectal cancer using enhancer analysis.  
研究代表者  
渡邊 純 (Watanabe, Jun)  
横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授  
研究者番号：40616075  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：消化器癌(食道、胃、肝臓、膵臓、胆嚢、大腸)の患者305人から癌部305サンプル、非癌部153サンプルの合計458例の臨床検体を収集した。これらの検体に対し、Cap Analysis of Gene Expression解析とShort-read RNA sequence解析、独自のLong-read RNA sequence解析を施行した。臨床情報と統合することで、大腸癌に特異的な転写開始点やリンパ節転移、術後再発に關与する遺伝子とその構造を同定した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は早期診断により良好な予後が期待できる疾患であるが、特異的な血清バイオマーカーはない。主要な消化器臓器(大腸、食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓)の臨床検体を用いて、Cap analysis of gene expression解析と独自のRNA sequence解析を実施することで、大規模なトランスクリプトームアトラスを構築し、大腸癌に特異的な遺伝子やリンパ節転移、術後再発に關与する遺伝子を探索し、その構造を同定した。これらの知見はバイオマーカーの探索だけでなく、転移や再発のリスクに合わせた個別化医療の提供や新たな治療標的の同定など、これまでの大腸癌治療の更なる発展に貢献する。

研究成果の概要(英文)：A total of 458 clinical specimens (305 cancerous and 153 non-cancerous samples) were collected from 305 patients with gastrointestinal cancer (esophagus, stomach, liver, pancreas, gallbladder, and colon). Cap Analysis of Gene Expression, Short-read RNA sequence analysis, and unique Long-read RNA sequence analysis were performed on these specimens. By integrating the clinical information, we identified genes and their structures involved in colorectal cancer-specific transcription start sites, lymph node metastasis, and postoperative recurrence.

研究分野：遺伝子解析

キーワード：Long-read RNA sequence 大腸癌 バイオマーカー CAGE

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は消化器系臓器の中で発症率と死亡率が最も高い悪性腫瘍である。2020年における大腸癌の新規発症者数は1.9百万人で全悪性腫瘍の中で3番目、死亡者数は93万人で全悪性腫瘍の中で2番目に多い結果であり、いずれも増加傾向を示している。大腸癌は初期症状が乏しく、進行して発見されることが多いが、一方で早期診断により良好な予後が期待できる疾患である。血清バイオマーカーとして **Carcinoembryonic antigen (CEA)** や **carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9)** などが用いられているが、大腸癌に特異的なマーカーではなく、感度と特異度も低いため使用用途は限られている。また、リンパ節転移の予測因子についても十分に検討されていない。そのため真に大腸癌特異的なバイオマーカーや、リンパ節転移に関する遺伝子の同定が望まれる。

エンハンサーは遺伝子の発現を遠位から、プロモーターは遺伝子の発現を近位から調節する領域であり、大腸癌を含めた様々な癌腫における発癌や腫瘍形成において重要な役割があることが報告されている。そのため大腸癌の発癌メカニズムの解明や、リンパ節転移の予測に関するバイオマーカーの同定のためには、エンハンサーやプロモーターを網羅的に解析する必要がある。

### 2. 研究の目的

臨床データベースと、**Cap analysis of gene expression** 解析 (CAGE) や **RNA-sequence** 解析 (RNA-seq) で得られた RNA 情報をオミックス解析し、大規模なトランスクリプトームアトラスを構築することで、大腸癌に特異的な遺伝子や、リンパ節転移、術後再発に関与する遺伝子を検索する。

### 3. 研究の方法

本研究では食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓、大腸といった主要な消化器臓器の臨床検体を用いて、CAGE と **Short-read RNA-seq**、**Full-length RNA-seq** を統合した大規模なトランスクリプトーム解析を実施した。CAGE は転写産物の5'末端に存在する **Cap** 構造を特異的に捉え、転写開始点を一塩基レベルで同定することができる技術である。**Full-length RNA-seq** は従来の **Long-read RNA sequence** の手法である **FLAM-seq (Full-length poly(A) mRNA sequencing)** を改良したもので、完全長 RNA を高精度に取得することができる。CAGE で得られた転写開始点に関する情報と RNA-seq で得られた遺伝子構造に関する情報を統合解析することで、大腸癌の発生やリンパ節転移に関与する遺伝子を同定し、その遺伝子構造を全長に渡り正確に把握することができる。

患者は2010年から2020年にかけて横浜市立大学附属病院で根治的手術を受けた日本人である。全ての患者において、他の癌の既往や重複癌は認めなかった。検体は手術後速やかに採取され、**2.0 ml Ibis Cryopreservation Tube** に入れ、**-80°C**の冷凍庫で保管された。本研究で使用した臨床組織は、横浜市立大学消化器・腫瘍外科学講座から得た。また、臨床情報は医療記録から収集した。新鮮凍結検体を **gentleMACS Dissociator (Miletenyi Biotec)** を用いて粉碎・均質化し、**miRNeasy Mini Kit** を用いて、製造元のプロトコールに従って RNA の抽出・精製を行った。定量は **NanoDrop** 微量分光光度計を用いて行い、**Quality control** のため、自動電気泳動装置 **Agilent 2200 TapeStation System, RNA ScreenTape** を用いて

**RNA Integrity Number (RIN)** を測定した。

**RIN 2.0** 以上で **total RNA** 量が **1,000 ng** 以上ある検体に対して **CAGE** 解析の **library** 作成を実施した。シーケンスは、**Illumina Novaseq 6000** プラットフォームで実施された。

**RIN 6.0** 以上で **total RNA** 量が **1,000 ng** 以上ある検体に対して **Short-read RNA-seq** のため **library** 作成を実施した。**Library** 作成には **total RNA 1,000ng** を使用し、**Invitrogen Colibri Stranded RNA Library Prep Kit for Illumina with Colibri Human/Mouse/Rat rRNA Depletion Kit** を用いて、製造元の指示に従ってリボソーム **RNA** を除去し、相補的 **DNA (cDNA)** ライブラリーを作成した。**Sequence** は **S4 flow cell** を用いて **Illumina Novaseq 6000** プラットフォームで行った。

**RIN 7.0** 以上で **total RNA** 量 **10 $\mu$ g** 以上ある癌検体に対して **Long-read RNA-seq** を実施した。**Library** 作成には **total RNA** を **10 $\mu$ g** 使用した。大腸組織では **RIN 6** 以上の癌サンプルと、**RIN 7** 以上の正常部位サンプルを使用した。**Sequence** には **PacBio Sequel e system** を用いた。

#### 4. 研究成果

収集した大腸検体は **245** 例 (癌部 **187** 例、非癌部 **58** 例) であり、その他の臓器と比較するため、食道検体 **11** 例 (癌部 **6** 例、非癌部 **5** 例)、胃検体 **57** 例 (癌部 **30** 例、非癌部 **27** 例)、肝臓検体 **51** 例 (癌部 **27** 例、非癌部 **24** 例)、胆嚢検体 **39** 例 (癌部 **22** 例、非癌部 **17** 例)、膵臓検体 **55** 例 (癌部 **33** 例、非癌部 **22** 例) を収集した。合計サンプル数は **458** 例であった。シーケンスしたデータの質や妥当性を評価した後、実際に解析に用いたサンプル数は、**CAGE** で大腸 **185** 例 (癌部 **146** 例、非癌部 **39** 例)、食道 **6** 例 (癌部 **3** 例、非癌部 **3** 例)、胃 **23** 例 (癌部 **13** 例、非癌部 **10** 例)、肝臓 **45** 例 (癌部 **24** 例、非癌部 **21** 例)、胆嚢 **18** 例 (癌部 **9** 例、非癌部 **9** 例)、膵臓 **26** 例 (癌部 **19** 例、非癌部 **7** 例) の合計 **303** 例であった。

**Short-read RNA-seq** は大腸 **14** 例 (癌部 **10** 例、非癌部 **4** 例)、食道 **2** 例 (癌部 **1** 例、非癌部 **1** 例)、胃 **4** 例 (癌部 **2** 例、非癌部 **2** 例)、肝臓 **17** 例 (癌部 **9** 例、非癌部 **8** 例)、胆嚢 **11** 例 (癌部 **8** 例、非癌部 **3** 例)、膵臓 **15** 例 (癌部 **12** 例、非癌部 **3** 例) の合計 **68** 例であった。

**Long-read RNA-seq** は大腸 **13** 例 (癌部 **10** 例、非癌部 **3** 例)、食道 **1** 例 (癌部 **1** 例、非癌部 **0** 例)、胃 **1** 例 (癌部 **1** 例、非癌部 **0** 例)、肝臓 **4** 例 (癌部 **4** 例、非癌部 **0** 例)、胆嚢 **4** 例 (癌部 **3** 例、非癌部 **0** 例)、膵臓 **2** 例 (癌部 **2** 例、非癌部 **0** 例) の合計 **25** 例であった。

**MDS plot** では、肝臓とその他の臓器で遺伝子発現の傾向に差があることが示された (図 1)。また、癌検体と正常粘膜組織で一部遺伝子発現の傾向の類似を認めるが、癌検体内にも正常細胞が含まれること、早期癌では異形度が低く正常組織と発現傾向が似ることにより起因すると推察された。

また、大腸癌とそれ以外のサンプル

で **2** 群間比較を行った (図 2)。赤い点は、**logFC** **2** かつ **FDR < 0.01** の大腸癌に特徴的な転写開始地点を示す。特に黄色の点で示す転写開始地点では、**ROC** 曲線における **AUC** 値が **0.95** 以上と、極めて高い診断能を示した (図 3)。このように、多数の大腸癌に極めて

図1. MDS plot (CAGE 303 samples)

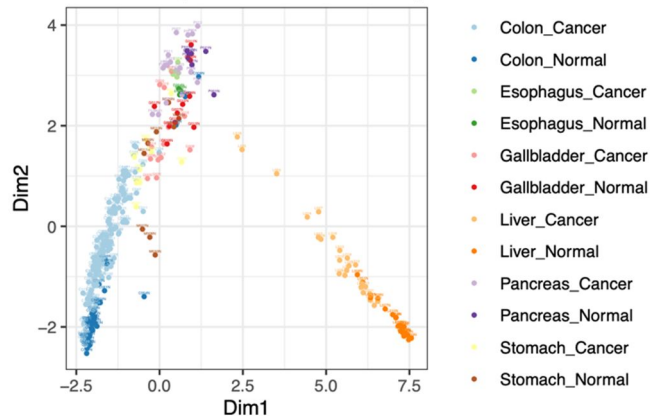


図2. Volcano plot (CAGE 303 samples)

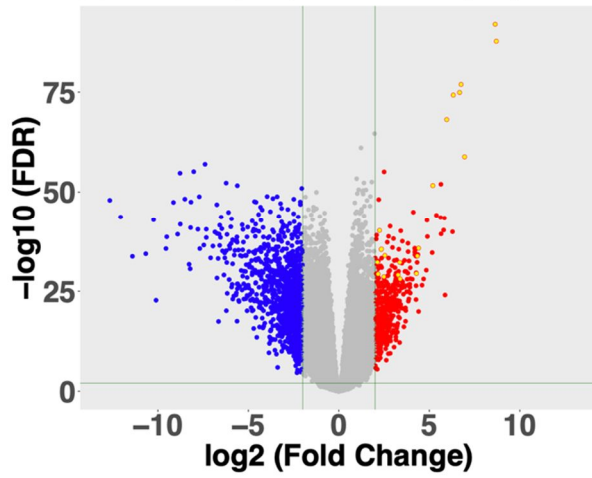
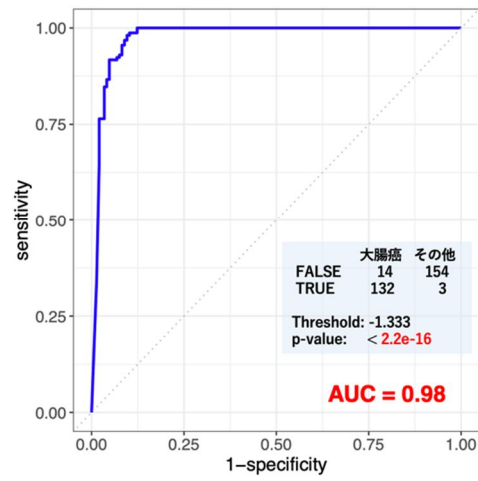


図3. ROC曲線



特異的な遺伝子が同定され、その中にはこれまでに報告がない新規遺伝子や新規アイソフォームも存在した。更に、同様の手法でリンパ節転移陽性症例に高い発現を示す遺伝子も検出された。いずれも統計学的な有意差が認めることから、今後バイオマーカーとなる可能性を有する。現在、これらのバイオマーカー候補の妥当性や再現性を検証しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	村川 泰裕  (Hirai Tomoya)  (50765469)	京都大学・高等研究院・教授    (14301)	

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