

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 10 日現在

機関番号 : 20101

研究種目 : 基盤研究 (B)

研究期間 : 2011~2013

課題番号 : 23390200

研究課題名 (和文) 消化管癌におけるマイクロ RNA およびエピゲノム異常の解析とその臨床応用

研究課題名 (英文) Analysis of the abnormalities of microRNA and epigenome and the clinical application in gastroenterological cancers

研究代表者

篠村 恭久 (SHINOMURA YASUHISA)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 90162619

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 14,900,000 円、(間接経費) 4,470,000 円

研究成果の概要 (和文) : ノンコーディング RNA の一つであるマイクロ RNA の発現異常は多くの癌で報告され、新規バイオマーカーとして有望であると報告されている。我々は内視鏡切除された早期胃癌患者の非癌部の胃粘膜における microRNA-34b/c (miR-34b/c) 遺伝子のメチル化レベルが癌の異時性発生リスクを予測する有望なバイオマーカーとなる可能性を明らかにした。また我々は大腸癌症例においてもマイクロ RNA アレイによって同定された BRAF 遺伝子変異と有意な相関を示す microRNA-31 (miR-31) の同定に成功した。miR-31 が大腸癌の不良な予後とも相関し、大腸癌細胞株を用いた機能解析では miR-31 は RAF の活性化を制御することや標的治療のターゲットとなる可能性についても明らかにした。またこの miR-31 は EGFR 下流シグナルを制御する可能性があるため、抗 EGFR 抗体薬投与例を対象に効果予測マーカーとしての有用性についても検討した。その結果、miR-31 高発現群では無増悪生存期間が有意に短いことが明らかとなったことから miR-31 が大腸癌の分子診断・標的治療の有望なバイオマーカーとなる可能性を示唆している。このように消化器癌を対象としたマイクロ RNA やエピゲノムの解析は新たな治療戦略として有望と考えられる。

研究成果の概要 (英文) : MicroRNAs (miRNA) constitute a class of small non-coding RNA molecules that function as post-transcriptional gene regulators. miRNAs can function as oncogenes or tumour suppressors. Therefore, they have been increasingly recognized as useful biomarkers for various human cancers. Metachronous gastric cancer (GC) can develop after endoscopic resection of GC and cannot be predicted based on clinical signature. We identified that DNA methylation of microRNA-34b/c (miR-34b/c) in the mucosa of the noncancerous gastric body may be a useful biomarker for predicting the risk of metachronous GC. 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 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード : 上部消化管学

科学研究費助成事業 研究成果報告書

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、non-coding RNA (ncRNA) 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。

胃癌は欧米と比較してわが国で多い消化器癌であるが、早期癌であれば、多くの症例は内視鏡的切除で根治可能である。しかしながら治療後の残胃の異時性再発する胃癌を予測するバイオマーカーは明らかにされていない。

また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 ncRNA 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 ncRNA 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

内視鏡切除された早期胃癌患者を対象に内視鏡的なフォローアップを行い、非癌部の胃粘膜の遺伝子のメチル化レベルを検討し、残胃に異時性に発生する胃癌のリスクを予測するマーカーの同定を目的とする。

また大腸癌を対象にその重要なシグナルである RAS-RAF-MEK-ERK、PI3K/Akt 経路を制御する ncRNA を同定する。それらの経路で重要な役割を果たす *KRAS*、*BRAF*、*NRAS*、*PIK3CA* 遺伝子変異陽性癌で特異的に発現する ncRNA を最新のアレイで網羅的に解析する。

また同定された有望な ncRNA に関しては我々の保有する 1000 例を超える大腸癌症例で生物学的悪性度との相関や分子標的薬の効果予測マーカーとしての可能性を検討する。更に大腸癌細胞株を用いた分子細胞生物学的手法による機能解析も行い、その ncRNA を標的とした新たな治療法の開発を目指す。

また大腸癌の前癌病変として注目されている sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) 等の鋸歯状病変の発生・発癌機構解明のために CpG island methylator phenotype (CIMP) status 等のエピジェティックな異常とそれに関与する ncRNA を同定する。

3. 研究の方法

本研究では 100 例をこえる内視鏡切除後の早期胃癌患者を対象に DNA を抽出。非癌部の胃粘膜における *miR-34b/c*、*SFRP1*、*SFRP2*、*SFRP5*、*DKK2*、*DKK3* 遺伝子のメチル化レベルを検討し、異時性に発癌するリスクを予測する新規バイオマーカーを探索した。

また約 1500 症例の大腸腫瘍を対象に DNA と ncRNA を抽出。その重要なシグナル経路である RAS-RAF-MEK-ERK、PI3K/Akt 等のシグナルに関与する *KRAS*、*BRAF*、*NRAS*、*PIK3CA* 遺伝子や ncRNA を最新のアレイで網羅的に探索。それらのデータはバイオインフォマティクス等を用いて解析し、診断や治療の新規バイオマーカーとしての可能性を明らかにする。

更に大腸癌細胞株を用いた分子細胞生物学的手法による機能解析で ncRNA の働きを検証した。また大腸鋸歯状病変についても同様に、上記シグナル経路のジェネティック、エピジェネティックな異常や ncRNA 発現を解析した。

(1) 早期胃癌内視鏡治療後の異時性残胃発癌リスクを予測する新規バイオマーカーの探索

バイサルファイトパイロシークエンス法で *miR-34b/c*、*SFRP1*、*SFRP2*、*SFRP5*、*DKK2*、*DKK3* 遺伝子のメチル化レベルの定量化解析を行い、Kaplan-Meier と Cox proportional hazards model を用いて異時性の残胃発癌のリスクを予測する新規バイオマーカーの解明を目指した。

(2) 大腸癌における分子標的薬の感受性バイオマーカーおよび治療のターゲットとなりうる ncRNA 等の分子異常の網羅的解析

パイロシークエンサーで大腸癌の RAS-RAF-MEK-ERK シグナル活性化に関与する *KRAS* (codon12, 13, 61, 146)、*BRAF* (V600E)、*NRAS* (codon12, 13, 61) の遺伝子変異を解析。また PI3K/Akt シグナルで重要な役割を果たす *PIK3CA* (exon9, 20) 遺伝子変異も独自に作成した高感度 primer や dispensation order を用いた。それらの変異陽性の大腸癌で特異的に発現亢進・低下がみられる ncRNA をアレイシステムにより網羅的に解析した。

(3) 大腸鋸歯状病変における ncRNA 発現やエピジェネティックな異常の解明

500 例近い大腸鋸歯状病変を対象に検討を行った。それらの病変の中でも特に発癌ポテンシャルが高いと考えられ、本邦で増加する高齢者右側結腸癌の前癌病変として注目されている sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) の遺伝子変異、癌関連遺伝子のメチル化マーカー、ncRNA においても同様に発現解析を行い、発癌やエピジェネティックな異常を引き起こす分子異常のメカニズムの解明も行った。

4. 研究成果

胃癌における検討で我々は内視鏡切除された早期癌患者の非癌部の胃粘膜における *miR-34b/c* のメチル化レベルが他の因子に影響されずに癌の異時性発癌リスクを予測する独立したバイオマーカーとなる可能性を明らかにした (Suzuki R *et al.* J Gastroenterol, in press)。一方、その他のメチル化マーカー (*SFRP1*、*SFRP2*、*SFRP5*、*DKK2*、*DKK3*) は異時性発癌を予測する因子とはならないことが今回の検討で明らかとなった。

また大腸癌では miRNA アレイによって同定された *BRAF* 遺伝子変異と有意な相関を示す microRNA-31 (miR-31) の同定に成功した。またこの miR-31 が大腸癌の独立した予後不良因子であること、また大腸癌細胞株を用いた機能解析では miR-31 は RAF の活性化を制御する可能性についても明らかにしている (Nosho K *et al.*, Carcinogenesis 2014)。またこの miR-31 は EGFR 下流シグナルを制御する可能性があるため、抗 EGFR 抗体薬投与例を対象に効果予測マーカーとしての有用性についても検討した。その結果、miR-31 高発現群では無増悪生存期間が有意に短いことを明らかにし、主要学会の主題演題で報告した。また国際医学雑誌に投稿中であり、特許も出願している。

また大腸鋸歯状病変における検討では SSA/P 由来の大腸癌は全例 CIMP 陽性例で、*MLH1* 遺伝子のメチル化によるマイクロサテライト不安定性を示す症例も多かったことから、エピジェネティックな異常が SSA/P の癌化において重要な役割を果たす可能性が示唆された。また miR-31 についても SSA/P 由来の大腸癌で高発現していることを我々は明らかにしており serrated pathway の癌

化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された(投稿中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- (1) Nosho K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2014;35:776-83. 査読有
- (2) Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Nosho K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H, Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. *J Gastroenterol*. 2013 in press 査読有
- (3) Adachi Y, Ohashi H, Imsumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, Taniguchi H, Nosho K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Tumour Biol*. 2014;35:973-85. 査読有
- (4) Sukawa Y, Yamamoto H, Nosho K, Ito M, Igarashi H, Naito T, Mitsuhashi K, Matsunaga Y, Takahashi T, Mikami M, Adachi Y, Suzuki H, Shinomura Y. HER2 Expression and PI3K-Akt Pathway Alterations in Gastric Cancer. *Digestion*. 2014;89:12-7. 査読有
- (5) Sukawa Y, Yamamoto H, Nosho K, Kunimoto H, Suzuki H, Adachi Y, Nakazawa M, Nobuoka T, Kawayama M, Mikami M, Matuno T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K, Shinomura Y. Alterations in the HER2-PI3K-Akt pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18:6577-86. 査読有
- (6) Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, Taniguchi H, Nosho K, Suzuki H, Arimura Y,

Imai K, Carbone DP, Shinomura Y. IGF-I receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci*. 2012;103:252-61. 査読有

(7) Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Nosho K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 2012;72:1126-36. 査読有

(8) Nosho K, Shinomura Y. The effective molecular targeted therapies for gastroenterological tumors, *Medical Science Digest.*, Japan, 2012;38:154-7. 査読無

(9) Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Nosho K, Suzuki H, Shinomura Y. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18:2745-2755. 査読有

(10) Maruyama R, Suzuki H, Yamamoto E, Imai K, Shinomura Y. Emerging links between epigenetic alterations and dysregulation of noncoding RNAs in cancer. *Tumour Biol*. 2012;33:275-285. 査読有

(11) Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano H, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011;71:5646-58, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

(1) 鈴木 亮, 山本英一郎, 鈴木 拓, 野島正寛, 丸山玲緒, 能正勝彦, 山本博幸, 山野泰穂, 菅井 有, 篠村恭久. microRNA-34b/c 異常メチル化率測定による胃癌の異時性多発リスク予測. 第 110 回日本内科学会総会講演会. 2013 年 4 月, 東京

(2) 能正勝彦, 篠村恭久: 大腸腫瘍における KRAS、BRAF、PIK3CA 変異と相関を示す microRNA の同定を目指したアレイシステムによる網羅的: 第 99 回日本消化器病学会総

会 2013年3月鹿児島

(3) 鈴木 亮, 篠村恭久: microRNA-34b/c の異常メチル化は胃癌の異時性多発リスクに関与する: シンポジウム6 HP 除菌後の病態と対応: 第99回日本消化器病学会総会 2013年3月鹿児島

(4) Katsuhiko Nosh, Yasuhisa Shinomura: The relation of LINE methylation level and macroscopic type in colorectal adenoma and pT1 colorectal cancer: Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference 2013年2月Hawaii, USA

(5) 能正勝彦, 篠村恭久: 大腸癌におけるLINE-1メチル化レベルとmicroRNA発現を標的とした診断・個別化治療への応用: 第9回日本消化管学会総会学術集会 2013年1月東京都

(6) 能正勝彦, 篠村恭久: 大腸癌のグローバルDNAメチル化、microRNA異常発現の解析とそれらを標的とした新規バイオマーカーの探索と大腸癌の検討: 第23回日本消化器癌発生学会 2012年11月鳴門

(7) 能正勝彦, 篠村恭久: 大腸癌の分子診断学におけるLINE-1メチル化レベルの重要性とmicroRNA発現の網羅的解析: JDDW2012 2012年10月神戸

(8) 能正勝彦, 篠村恭久: Comprehensive analysis of the genome-wide DNA methylation and microRNA expression in gastrointestinal cancers and the identification of new biomarkers targeting those alterations: 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月札幌

(9) 鈴木 拓, 新沼 猛, 野島正寛, 丸山玲緒, 山本英一郎, 甲斐正広, 能正勝彦, 山本博幸, 時野隆至, 今井浩三, 篠村恭久. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. 第71回日本癌学会学術集会. 2012年9月, 札幌

(10) 鈴木 拓, 新沼 猛, 野島正寛, 山本英一郎, 丸山玲緒, 山本博幸, 篠村恭久. 消化管間質腫瘍におけるmicroRNA発現プロファイル解析. 第49回日本臨床分子医学会学術集会. 2012年4月, 京都

(11) 新沼 猛, 鈴木 拓, 野島正寛, 高丸博之, 山本英一郎, 能正勝彦, 山本博幸, 篠村恭久. GISTの悪性度マーカーおよび治療標

的としてのnon-coding RNA. 第8回日本消化管学会総会学術集会. 2012年2月, 仙台

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 大腸癌を治療および/または診断するための組成物ならびにその利用

発明者: 篠村 恭久, 能正勝彦, 山本博幸, 鈴木拓

権利者: 北海道公立大学法人 札幌医科大学
種類:

番号: 特願2013-126021

出願年月日: 平成25年6月14日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/iml/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠村 恭久 (Shinomura Yasuhisa)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90162619

(2) 研究分担者

能正 勝彦 (Nosh Katsuhiko)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 10597339

(3) 研究分担者

山本 博幸 (Yamamoto Hiroyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40332910

(4) 研究分担者

鈴木 拓 (Suzuki Hiromu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20381254