

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870048

研究課題名(和文)大腸癌の新規サブグループの発癌機構に関するmicroRNAの同定・機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of miRNAs that are involved in carcinogenesis of a new molecular subgroup of colorectal cancer

研究代表者

高橋 雅信 (TAKAHASHI, Masanobu)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：00447161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、特定のmiRNAがMSI/CIMP/BRAF変異陽性の⁶大腸癌サブグループの発癌において重要な役割を果たしている⁶と仮定し、そのmiRNAを同定、さらに機能を解明するために、ヒト大腸癌組織におけるmiRNA網羅的発現解析とヒト大腸癌細胞株を用いた機能解析を行った。BRAF変異大腸癌で特異的に発現の異なるmiRNAを数種類選出し、その内1種類が癌抑制遺伝子の機能を有することを新しく見出した。以上のように、特定のmiRNAがこの分子サブタイプの発癌過程や治療感受性に何らかの寄与をしていることを示した。今後本研究の知見が、新規治療標的分子の同定につながることを期待している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify specific miRNAs that could be involved in oncogenesis of a molecular subgroup, the MSI/CIMP/BRAF-mutant colorectal cancer, and clarify biological functions of the miRNAs. By using genome-wide miRNA expression analysis, we found some miRNAs specifically dysregulated in BRAF-mutant colorectal cancer, and identified a specific miRNA that acts as a tumor suppressor in colorectal cancer. We further revealed a correlation between the miRNA expression and therapeutic outcome of those who received anti-EGFR therapy. These results suggest that the miRNA contributes to oncogenic process of colorectal cancer, particularly BRAF-mutant cancer, and influences clinical outcome of patients with colorectal cancer. The results could lead to further developing novel targeted therapies of colorectal cancer.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：大腸癌 miRNA BRAF CIMP MSI

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は genetic かつ epigenetic な異常を複合的に持つ heterogenic な腫瘍である。例えば、大腸癌細胞 DNA において、*TP53*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* などの遺伝子変異、simple nucleotide repeat の不安定性 (MSI) プロモーターメチル化異常 (CIMP) など様々な分子学的特徴を持ち合わせる (De Roock *W et al.*, *Lancet Oncol* 2011 12:594-603, van Engeland *et al.* *J Clin Oncol* 2010, 29:1382-91)。この中で MSI 陽性、CIMP 陽性、*BRAF* 遺伝子陽性のサブグループはお互いに大部分 overlap するとされており、全体の大腸癌のおよそ 10% を占めるが (図 1) それらがどのように腫瘍の発癌に特異的に関わっているかの分子学的原因はいまだ不明である (van Engeland *et al.* *J Clin Oncol* 2010, 29:1382-91)。

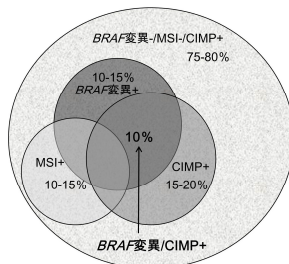


図1 大腸癌における分子学的サブグループ

一方、小分子 RNA である microRNA (miRNA) は癌の発生・進行の様々な段階に深く関与していることが最近の研究により明らかにされてきている (Garzon *R et al.*, *Ann Rev Med* 2009 60:167-179)。大腸癌において比較的少数例の臨床検体を用いた miRNA の発現解析を行った報告は散見され (Schetter *AJ et al.*, *JAMA* 2008 299:425-36)、申請者らの研究グループもある miRNA (miR-148a) の発現ステータスが III 期や IV 期の進行大腸癌において有用な予後・化学療法効果予測マーカーになりうる可能性を最近報告しているが (Takahashi *M et al.*, *PLoS One* 2012 7:e46684) MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性のサブグループに特別着目し特定の miRNA の機能的意義を調べた研究は未だ報告されていない。

我々の研究により、MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性のサブグループにおける、miRNA が関与する発癌メカニズムの解明、さらには miRNA やその miRNA に関連する標的遺伝子群を含めた新規治療標的分子の同定の一助となる結果を得ることが期待される。大腸癌は genetic かつ epigenetic な異常を併せ持つ heterogenic な疾患であり、個別化医療の開発の観点から、特定の分子学的特徴を持つサブグループに着目して研究・治療法を開発していく必要性が提唱されてきている。他癌種であれば、*BRCA1* 変異陽性乳癌に対する PARP inhibitor (Fong *PC et al.*, *N Engl J Med* 2009 361:123-34) や *ALK-EML4* 陽性肺

腺癌に対する ALK inhibitor の例 (Kwak *EL et al.*, *N Engl J Med* 2010 363:1693-703) が挙げられる。しかし、大腸癌の実地臨床においては抗 EGFR 抗体の治療予測マーカーとして *KRAS* 遺伝子変異が用いられているのみである (Karapetis *CS et al.*, *N Engl J Med* 2008 359:1757-1765, Amado *RG et al.*, *J Clin Oncol* 2008 26: 1626-1634)。

我々の本研究結果により、特定の miRNA やその標的遺伝子の発現プロファイリングのバイオマーカーとしての有用性が示唆され、大腸癌の個別化医療、新規分子標的治療へのさらなる開発につながることを期待する。

2. 研究の目的

本研究では、ある特定の miRNA 群がこの MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性のサブグループの発癌において重要な役割を果たしていると仮定し、その miRNA 群の大腸癌組織における発現解析や、さらに引き続き機能解析を行うことにより、MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性のサブグループにおける、新規分子標的治療の開発につながりうる、発癌機構のさらなる解明を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性大腸癌において特異的な発現変化を認める miRNA の同定

まず当研究室で所持しているヒト大腸癌組織 (パラフィン切片) 約 200 例を用いて、*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* などのがん関連遺伝子の変異検索、MSI 解析、CIMP 解析を行いジェネティックかつエピジェネティックに網羅的に分子学的プロファイリングを行うことにより、MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性のサブグループを抽出する。これらの解析は申請者や本研究室で過去行った方法に準じて行う (Soeda *H et al.*, *Int J Clin Oncol* 2012, Takahashi *M et al.*, *PLoS One* 2012 7:e46684)。アジア人でも MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性のサブグループは 10% 弱程度と推測され、約 20 例抽出できると推定する。その 20 例に加えて、コントロールとして MSI 陰性/CIMP 陰性/*KRAS*・*BRAF*・*PIK3CA* 野生型のグループを 20 例選出し、計 40 例の大腸癌組織から Total RNA を抽出する。その Total RNA を用いて GeneChip miRNA 3.0 array による網羅的 miRNA 発現解析 (対象ヒト miRNA 1,789 種類) を行う。さらに両サブグループ間で発現の異なる miRNA 群を種々の統計解析法を用いて選び出す。またこれらの miRNA の発現を Taqman realtime RT-PCR 法を用いて確認する。

(2) 候補 miRNA の機能解析

続いて MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性と MSI 陰性/CIMP 陰性/*KRAS*・*BRAF*・*PIK3CA* 野生型の両サブグループ間で発現の異なる前述の候補 miRNA が、がんの増殖やアポトーシスへの抵抗性への関与、がんの遊走・浸

潤・転移能への関与などを調べる機能解析を大腸癌細胞株 (HCT116、HT29、SW80、SW620) や、さらに可能であれば、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行い、これらの MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性大腸癌に特異的な miRNA 群の癌遺伝子もしくは癌抑制遺伝子としての役割を見出すことを目指す。

(3) MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性大腸癌に特異的に発現変化をきたす miRNA の別コホートをを用いた検証

さらには、本研究室が参加する臨床試験の別コホート (“切除不能大腸癌 1 次治療における S-1、irinotecan、bevacizumab 併用療法の有用性を検証する臨床第 III 相試験 (TRICOLORE)” ; UMIN00007834) として 300 例の大腸癌組織を集積予定であり、MSI 陽性/CIMP 陽性/*BRAF* 変異陽性の大腸癌サブグループもさらに 30 例集積できることを見込んでいる。これらのサンプルを用いて、上述の実験から得られた結果の検証を近い将来的に行う予定とする。

4. 研究成果

(1) 研究代表者らが保有している大腸癌患者 200 例の大腸癌組織から DNA を抽出し、*KRAS* や *BRAF* 遺伝子変異の解析、MSI 解析、CIMP 解析を行った。当コホートでは、当初推定していたのとは異なり、*BRAF* 変異陽性の腫瘍群と MSI 陽性腫瘍群が大きく重なり合うわけではないことが判明したため、*BRAF* 変異陽性群において発現異常を呈する miRNA 群の同定を目指した。

BRAF 変異陽性、*KRAS*/*BRAF* 変異陰性例に対して miRNA の網羅的発現解析により、両群間で発現の異なる miRNA を数種類選り出した。別コホートでもその結果を再現できた。

その miRNA の発現が低い大腸癌患者では、抗 EGFR 抗体の感受性が低いことを見出した (図 2)。

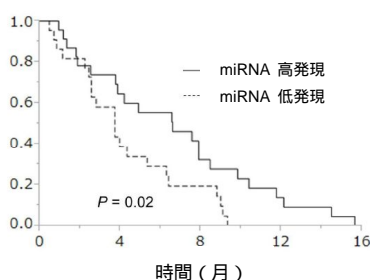


図 2 大腸癌患者におけるある miRNA 発現の違いによる抗 EGFR 抗体療法による治療効果の差異

(2) その候補 miRNA の 1 種類が癌抑制遺伝子の機能を有することを、ヒト大腸癌細胞を用いた機能解析で見出した。

ここまでの結果をまとめて、論文投稿中である。

(3) さらに、前述の前向き臨床試験でのコホートで (1) の結果を検証する予定であ

る。

以上のように、本研究では、*BRAF* 変異大腸癌で特異的に発現異常が起きている miRNA を同定し、その miRNA がこの分子サブタイプの発癌過程や治療感受性に何らかの寄与をしていることを示した。今後この miRNA の発癌機構への関与の詳細を明らかにすることにより、新規治療標的分子の同定につながることを期待している。

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 4 件)

Shiono M, Takahashi S, Kakudo Y, Takahashi M, Shimodaira H, Kato S, Ishioka C. Upper arm central venous port implantation: a 6-year single institutional retrospective analysis and pictorial essay of procedures for insertion. PLoS One. 2014;9:e91335.

Soeda H, Shimodaira H, Watanabe M, Suzuki T, Gamo M, Takahashi M, Komine K, Kato S, Ishioka C. KRAS mutation in patients with metastatic colorectal cancer does not preclude benefit from oxaliplatin - or irinotecan - based treatment. Mol Clin Oncol. 2014;2:356-362.

Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, Hemmi H, Koi M, Boland CR, Goel A. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. Gut. 2013 62:1315-26.

Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, Goel A. Serum miR-21 as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. J Natl Cancer Inst. 2013 105:849-859.

[学会発表](計 2 件)

高橋秀和、高橋雅信、下平秀樹、高橋信、石岡千加史. *BRAF* 変異陽性大腸癌において癌抑制 miRNA として機能する miRNA-X の同定 (Identification of miRNA-X as a tumor suppressor in *BRAF* mutant colorectal cancer) 第 73 回日本癌学会総会、2014 年 9 月 25-27 日、パシフィコ横浜、(神奈川県横浜市)。

Hidekazu Takahashi, Masanobu Takahashi, Masahiro Inoue, Hiroshi Soeda, Kota Ouchi, Xiaofei Zhang, Shin Takahashi, Hideki Shimodaira, Shunsuke Kato, Chikashi Ishioka. Clinical characteristics of microsatellite instable metastatic or recurrent colorectal cancer in a Japanese population.

第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2013 年
8 月 29-31 日、仙台国際センター、(宮城県仙
台市)。

〔図書〕(計 1 件)

高橋雅信、下平秀樹、古川洋一、石
岡千加史．EPCAM 遺伝子に胚細胞性変異を認
めたリンチ症候群の 1 例．INTESTINE, 日本
メディカルセンター, 17 巻 5 号 Page 521-522
(2013)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 雅信 (TAKAHASHI, Masanobu)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：00447161