

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870582

研究課題名(和文)糖鎖遺伝子発現による大腸癌マーカー開発と糖鎖を制御するマイクロRNAの同定と解析

研究課題名(英文)The expression of glycogenes as potential biomarkers for colorectal cancer

研究代表者

岡山 洋和 (Okayama, Hirokazu)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20583397

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)：癌の発癌・進展の過程で糖鎖プロファイルは大きな変化を来す。糖鎖遺伝子発現異常が癌細胞の糖鎖構造異常、さらに生物学的特性を規定することから、糖鎖遺伝子はバイオマーカー候補として魅力的である。大腸癌マイクロアレイデータを糖鎖遺伝子を用いてクラスタリングすることで、予後不良な新規サブタイプを同定し、かつ複数のデータセットでこれを検証した。TCGAデータ解析等により、このサブタイプが病理学的特徴、および特定のゲノム異常と関連することを発見した。候補となる糖鎖遺伝子の免疫染色および癌細胞株における機能解析により、糖鎖遺伝子バイオマーカーが大腸癌のサブタイプ同定、個別化医療につながる研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：Glycans undergo drastic changes during malignant transformation and tumor progression in colorectal cancer (CRC). Altered expression of glycogenes can cause aberrant glycosylation that is associated with tumor characteristics, thereby making glycogenes as cancer biomarkers. We performed an unsupervised clustering of a microarray dataset of CRC, leading to the development of glycogene-derived transcriptomic subtype. The prognostic significance of our signature was validated in additional cohorts, consisted of more than 200 CRC patients. Analysis of TCGA data revealed that this subtype was characterized by distinct pathological features with specific genomic alterations. Immunohistochemistry for candidate glycogenes was performed in our cohort of more than 400 CRC patients who underwent surgery. We here report the challenge of developing glycogene-based biomarkers that may stratify heterogeneous patients with distinct molecular characteristics with various outcomes.

研究分野：大腸癌

キーワード：糖鎖 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸、蛋白質に次ぐ第三の生命鎖として、特に大腸癌などの消化器癌において生物学的、臨床的意義が示されてきた。糖鎖は細胞表面で糖鎖はたんぱく質、脂質に結合しており、細胞間コミュニケーションの中心的役割を果たしている。古くから知られるシアリル路易斯 A/X (CA19-9/SLX) などの糖鎖抗原は癌細胞表面に発現し細胞間接着を介し転移を促進している。またそれらは大腸癌等の診断や再発を示唆する血清腫瘍マーカーとして、すでに広く臨床応用されている。したがって大腸癌における糖鎖の機能的・生物学的意義、臨床的有用性については疑いの余地はない。近年のオミクス (omics) 研究の進歩の一方で、糖鎖研究はその生物学的重要性にも関わらず、核酸、タンパク質研究に比べ著しく遅れをとっている。それは糖鎖の複雑性に起因する。糖鎖そのものは DNA に直接コードされないため、糖鎖生合成に関連する膨大な糖転移酵素遺伝子群を DNA/RNA レベルから個別にアプローチすることは非現実的である。また極めて複雑・不均一な分枝構造をとるため、糖鎖合成や配列決定も困難である。

糖鎖合成には多数の酵素が必要であり、現時点で 200 種類に迫る糖鎖合成遺伝子が知られ、そのうちいくつかについては癌における意義が知られている。例えば ST6GALNAC6 は癌組織でメチル化などでエピジェネティックに発現抑制されており、FUT7 は低酸素に誘導され癌組織で発現亢進している (Kannagi R. Cancer Sci 2010)。一方、その他多くの遺伝子については癌における役割や調節はほとんど不明であるうえ、糖鎖遺伝子発現と癌の臨床的特徴や予後との関連は検討されていない。

マイクロ RNA (miRNA) は、相補的な配列を持った mRNA の翻訳に対する抑制的な調節機構である。多様な生物学的プロセスの多くにおいてほとんどの遺伝子が miRNA による制御を受ける。癌領域でも癌促進的・抑制的に働く miRNA が多数知られ、それぞれ癌抑制遺伝子、癌遺伝子を標的とし、大腸癌の多段階発癌機構においてもその意義は明らかである。糖鎖が癌細胞機能 (例えば接着能) に直接関わり癌促進的あるいは抑制的に働き得るという事実から、糖鎖生合成に関わる多数の遺伝子群も低酸素やエピジェネティックな制御に留まらず、癌関連 miRNA による調節を受けていることは想像に難くない。事実、メラノーマで高発現する miR-30b/30d は GALNT7 を抑制し転移を促進していることが最近報告された (Gazieli-Sovran. Cancer Cell 2011)。しかし大腸癌において、糖鎖と糖鎖関連遺伝子群、miRNA の関係については全く手付かずの領域といつてよい。

2. 研究の目的

糖鎖が癌細胞の機能的特徴 (例えば易転移性) を規定し得ることから、糖鎖関連遺伝子 (群) の発現が大腸癌の臨床的特徴、臨床転帰とも相関し得ることは疑いなく、網羅的糖鎖遺伝子発現解析をベースとした糖鎖遺伝子発現バイオマーカーの臨床的有用性が期待できる。

本研究の目的は複数の独立した大腸癌の網羅的遺伝子発現データセットから、臨床的意義のある糖鎖遺伝子群を同定しその発現に基づく予後予測マーカーの確立と臨床応用に向けた多段階の検証を行うこと、それら糖鎖遺伝子を調節するマイクロ RNA を同定しその生物学的機能を解析すること、さらに遺伝子レベルからタンパク・酵素・糖鎖レベルへ、多層的に細胞機能研究と臨床関連研究を展開することである。

3. 研究の方法

- 複数の網羅的発現解析データセットを用いた新規糖鎖遺伝子予後 signature の作成と検証
- パラフィン切片を用いた免疫染色と統計学的解析
- 糖鎖遺伝子を制御しうる miRNA の同定; ターゲット検索と関連解析
- 免疫染色や qRT-PCR などによる糖鎖遺伝子・miRNA 発現解析
- 癌細胞株を用いた機能解析

4. 研究成果

(1) GlycoGene Database より得られた約 190 個の糖鎖関連遺伝子を 2400 個超の Affymetrix 社のマイクロアレイプローブと対応させた。これら糖鎖遺伝子により大腸癌約 170 例のアレイデータを用いて、unsupervised hierarchical clustering を行ったところ、低分化な組織型と関連し、際立って予後不良な群である「糖鎖 Cluster A」が得られた (Fig. 1A)。この Cluster に特異的に発現変動する 15 の糖鎖遺伝子セットを抽出した。

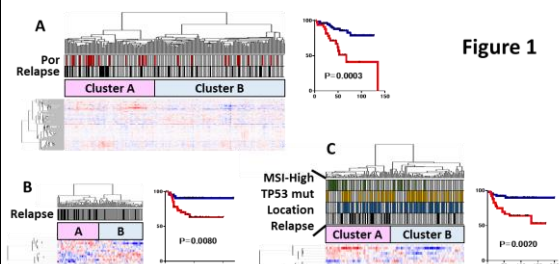
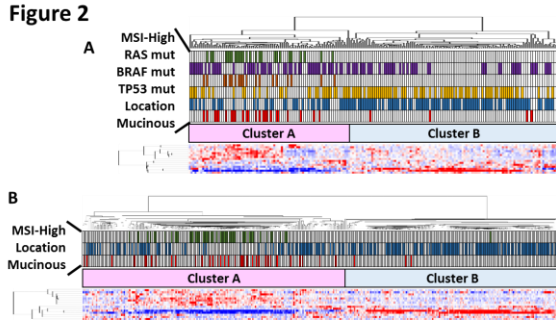
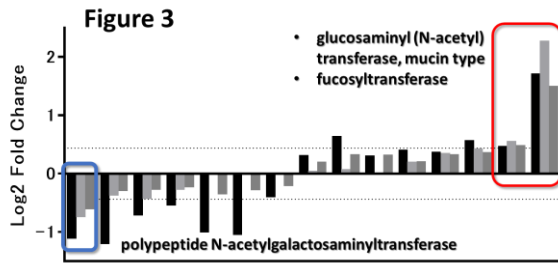


Figure 1

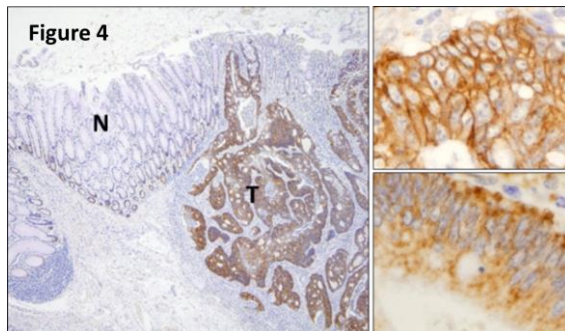
(2) 糖鎖 signature によってサブタイプ判定を試みたところ、約 90 例および約 120 例の大腸癌データセットにおいていずれも予後不良な「糖鎖 Cluster A」を抽出することができた (Fig. 1B-C)。さらにこの Cluster は MSI-High、野生型 P53、右側結腸にも関連しており、新規大腸癌サブタイプ同定への端緒となった。



(3) さらに検証 (validation) のため、TCGA の RNA シークエンスデータを使用した (Fig. 2A-B)。異なる 2 つの TCGA データセットについてそれぞれ「糖鎖 Cluster A」を抽出した。したがってこのサブタイプが、一貫して右側結腸、MSI-High、BRAF 変異型、P53 野生型、低分化癌～粘液癌、予後不良とそれぞれ極めて明瞭な相関を認めることが検証された。

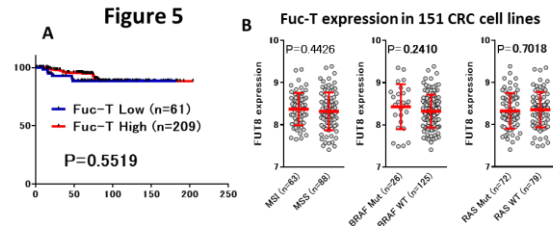


(4) 15 遺伝子のうち特に臨床的、生物学的意義が示唆される 3 つの遺伝子 (Fig. 3) につき、上述のデータとはさらに異なる独立した 6 つのデータセットを追加し、2000 例以上の大腸癌データを用いた解析により、これらの糖鎖遺伝子が MSI、BRAF、P53 といった既知の遺伝子異常の有無で優位に発現上昇な



いし低下していることが示された。

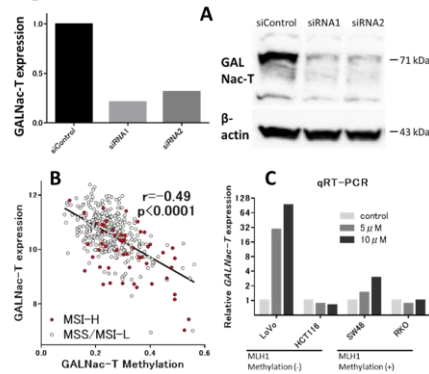
(5) これらの糖鎖遺伝子がコードする糖鎖生成に関連する酵素が臨床サンプルにおいてどのように発現するかを免疫組織学的に検討した。Fig. 4 はフコシル基転移酵素 (Fuc-T) が大腸癌組織において、非癌部粘膜や間質には発現せず、癌細胞の細胞質・細胞膜に発現することを示す。アレイデータからは Fuc-T と P53 との関連が期待されたが免疫染色ではこの関係は再現できなかった (下記 Table)。また予後との相関も認めなかった (Fig. 5A)。細胞株においてもゲノム異常と Fuc-T 発現との相関は得られていない (Fig. 5B)。



		Total (n=335)	Low n=71 (21.2%)	High n=264 (78.8%)	P
Age	Mean±SD	67.0±11.8	65.8±12.0	67.3±11.7	0.338
Gender	Male	198	45 (63.4)	153 (58.0)	0.497
	Female	137	26 (36.6)	111 (42.0)	
Location	Proximal colon	106	26 (36.6)	80 (30.3)	0.319
	Distal colon	103	21 (29.6)	82 (31.1)	
	Rectum	126	24 (33.8)	102 (38.6)	
Histological differentiation	Well	161	36 (50.7)	125 (47.3)	0.643
	Moderately	145	27 (38.0)	118 (44.7)	
	Poorly	9	3 (4.2)	6 (2.3)	
	Mucinous	20	5 (7.0)	15 (5.7)	
Stage(UICC)	0	14	1 (1.4)	13 (4.9)	0.705
	I	65	16 (22.5)	49 (18.6)	
	II	122	22 (31.0)	100 (37.9)	
	III	89	25 (35.2)	64 (24.2)	
	IV	45	7 (9.9)	38 (14.4)	
Tumor invasion	Tis (m)	17	1 (1.4)	16 (6.1)	0.866
	T1 (sm)	33	6 (8.5)	27 (10.2)	
	T2 (mp)	49	14 (19.7)	35 (13.3)	
	T3 (ss-a)	138	32 (45.1)	106 (40.2)	
T4 (se-si/ai)	98	18 (25.4)	80 (30.3)		
Lymph node metastasis	Absent	213	40 (56.3)	173 (65.5)	0.127
	Present	119	31 (43.7)	88 (33.3)	
	Not available	3	0 (0.0)	3 (1.1)	
Distant metastasis	Absent	290	64 (90.1)	226 (85.6)	0.433
	Present	45	7 (9.9)	38 (14.4)	
Microsatellite instability	MSS	310	63 (88.7)	247 (93.6)	0.201
	MSI	25	8 (11.3)	17 (6.4)	
P53 expression	Negative	106	24 (33.8)	82 (31.1)	0.869
	Positive	98	24 (33.8)	74 (28.0)	
	Not available	131	23 (32.4)	106 (40.2)	

(6) 並行して上述の糖鎖遺伝子の癌における生物学的意義の裏付けを進めている最中である。大腸癌細胞株を用いて、特定の遺伝子のノックダウン (Fig. 6A) 等による種々の機能解析とともに、ゲノム異常、エピゲノム異常に伴う特定の遺伝子発現の制御機構の解明を目指している。現段階の検討では GALNAc-T の発現とメチル化レベルが逆相関し (Fig. 6B) メチル化によりエピジェネティックに発現抑制されることが示唆されている (Fig. 6C)。

Figure 6



(7) 上述のように糖鎖酵素遺伝子の機能的、臨床的意義に関してはかなりの知見が得られている。一方で miRNA と糖鎖については大きな進展に至っていない。TCGA の mRNA および miRNA に対しての RNA シークエンスデータを用いて、上述の糖鎖遺伝子と逆相関する miRNA の検出を試みている。BRB-Arraytools を用いての網羅的検討では、統計学的に有意に逆相関する (つまり遺伝子を負に調節し得る) miRNA がリストアップできる (以下に示すリスト)。しかし TargetScan、miWalk、miRanda、Pictar、RNA22、miRMap など多数の miRNA ターゲット予測アルゴリズムを用いてもそれらの miRNA が当該糖鎖遺伝子を標的にし得る可能性は低いと考えている。したがって糖鎖遺伝子と miRNA に関しては新規の知見を得るには至らなかった。

Table 1. Fuc-T と相関する miRNA (P<0.0001)

Genes significantly correlated with Quantitative Trait:
Table - Sorted by p-value of the univariate test
The first 140 genes are significant at the nominal 0.05 level of the univariate test

	Correlation coefficient	Parametric p-value	FDR	UniqueID
1	0.729	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-625
2	-0.448	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-592
3	0.442	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-92b
4	-0.422	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-552
5	-0.411	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-92a-1
6	-0.407	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-196b
7	-0.405	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-181d
8	0.372	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-31
9	0.361	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-375
10	0.351	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-215
11	0.349	< 1e-07	< 1e-07	hsa-mir-1180
12	0.332	1e-07	3.01e-06	hsa-mir-155
13	-0.349	1e-07	3.01e-06	hsa-mir-1269
14	-0.324	2e-07	5.59e-06	hsa-mir-92a-2
15	-0.316	4e-07	1.04e-05	hsa-mir-181c
16	-0.305	1.1e-06	2.69e-05	hsa-mir-217
17	-0.3	1.7e-06	3.91e-05	hsa-mir-20a
18	-0.291	3.6e-06	7.82e-05	hsa-mir-19b-2
19	-0.291	4.7e-06	9.67e-05	hsa-mir-3170
20	0.308	9.9e-06	0.000186	hsa-mir-3173
21	0.278	1e-05	0.000186	hsa-mir-3934
22	-0.291	1.31e-05	0.000233	hsa-mir-216a
23	0.273	1.43e-05	0.000243	hsa-mir-1266
24	0.276	1.67e-05	0.000269	hsa-mir-3940
25	0.27	1.79e-05	0.000269	hsa-mir-223
26	-0.27	1.8e-05	0.000269	hsa-mir-362
27	-0.269	1.86e-05	0.000269	hsa-mir-17
28	-0.268	2.08e-05	0.00029	hsa-mir-224
29	-0.267	2.17e-05	0.000293	hsa-mir-335
30	0.266	2.4e-05	0.000313	hsa-mir-330
31	-0.265	2.57e-05	0.000324	hsa-mir-188
32	-0.274	3.19e-05	0.00039	hsa-mir-204
33	-0.256	4.63e-05	0.000535	hsa-mir-532
34	0.256	4.65e-05	0.000535	hsa-mir-146b
35	0.25	8.04e-05	0.000898	hsa-mir-3614

Table 2. GALNac-T と相関する miRNA (P<0.0001)

Genes significantly correlated with Quantitative Trait:
Table - Sorted by p-value of the univariate test
The first 58 genes are significant at the nominal 0.05 level of the univariate test

	Correlation coefficient	Parametric p-value	FDR	UniqueID
1	0.307	1e-06	0.000391	hsa-mir-592
2	-0.282	6.8e-06	0.00123	hsa-mir-215
3	-0.278	9.4e-06	0.00123	hsa-mir-212
4	0.297	1.56e-05	0.00152	hsa-mir-509-1
5	0.257	4.45e-05	0.00348	hsa-mir-224
6	-0.278	9.77e-05	0.00637	hsa-mir-3199-2
7	0.237	0.0001757	0.00932	hsa-mir-552
8	-0.236	0.0001906	0.00932	hsa-mir-511-1
9	0.233	0.0002254	0.00979	hsa-mir-95
10	-0.228	0.000308	0.012	hsa-mir-132
11	-0.216	0.0006403	0.0228	hsa-mir-582

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 7 件)

- Robles AI, Okayama H et al. An Integrated Prognostic Classifier for Stage I Lung Adenocarcinoma Based on mRNA, microRNA, and DNA Methylation Biomarkers. Journal of Thoracic Oncology 10(7):1037-48 (2015)
- Hiyoshi Y, Okayama H et al. Increased microRNA-34b and -34c predominantly expressed in stromal tissues is associated with poor prognosis in human colon cancer. PLoS One 10(4):e0124899 (2015)
- Ryan BM, Okayama H et al. Identification of a functional SNP in the 3' UTR of CXCR2 that is associated with reduced risk of lung cancer. Cancer Research 75(3):566-75 (2015)
- Okayama H et al. The expression of four genes as a prognostic classifier for stage I lung adenocarcinoma in 12 independent cohorts. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 23(12):2884-94 (2014)
- Oue N, Okayama H et al. High miR-21 expression from FFPE tissues is associated with poor survival and response to adjuvant chemotherapy in colon cancer. International Journal of Cancer 134(8):1926-34 (2014)
- 岡山洋和、竹之下誠一. 大腸癌バイオマーカーとしての microRNA、miR-21. G. I. Research 22 巻 5 号 (2014)
- 岡山洋和、竹之下誠一. 炎症性大腸癌発

癌過程における機能獲得型
(gain-of-function) p53 変異. G. I. Research
22 巻 5 号 (2014)

[学会発表] (計 4 件)

1. 岡山洋和ら. Identification of a glycogene-derived subtype of colorectal cancer. 第 26 回日本消化器癌発生学会総会 (米子)

2. 野田勝、岡山洋和ら. The expression of glycogenes identifies a distinct subtype of colorectal cancer. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 (大阪)

3. 千田峻、岡山洋和ら. Stromal gene expression contributes to poor prognosis in stage II-III colorectal cancer. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 (大阪)

4. 門馬智之、岡山洋和ら. 散発性大腸癌におけるミスマッチ修復タンパク免疫染色の意義. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 (大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 洋和 (OKAYAMA, Hirokazu)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20583397