

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462016

研究課題名(和文) MicroRNAを用いた新規大腸癌治療戦略の開発

研究課題名(英文) Micro RNAs as promising therapeutic targets for anti-metastatic therapy in colorectal cancer

研究代表者

母里 淑子(Mori, Yoshiko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70708081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：予後不良なBRAF変異+Non-MSI大腸癌で発現増加するmiRNA群をGroup A、発現低下群をGroup Bと定義。Group A miRNA高発現、Group B miRNA低発現群は予後不良であることが67例のStage IV癌にて確認。また大腸癌細胞株にGroup B miRNAを導入し、それらmiRNA群の標的であるZEBs、ZEBsの標的であるE-Cadherinの発現量を確認。さらにscratch assay、migration assayを行い、Group B miRNAが腫瘍のmalignant potentialを下げ、大腸癌の新規治療になり得る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The miRNA array analysis revealed that a set of miRNAs was specifically down-regulated in CRC with BRAF V600E mutation without MSI, considered to be the poorer outcome. In vitro, cell lines transfected the set of the miRNAs significantly reduced their malignant potentials. Finally, we analyzed expression level of the set of miRNAs in a cohort of 67 stage IV CRCs. CRCs with the lower expression level of the set of miRNAs showed poor outcome compared with those with the higher expression level. Our data indicate that the miRNAs is promising prognostic biomarkers and therapeutic targets for anti-metastatic therapy in CRC.

研究分野：大腸癌

キーワード：マイクロRNA バイオマーカー 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、本邦において増加の一途を辿っており、2001年以降罹患数は毎年10万人を超えるに至っている。2020年には、胃癌、肺癌を抜き、男女をあわせた大腸癌罹患数、罹患率はともに1位になると予測されている。癌死亡においても、平成23年の大腸癌による死亡者数は上位を占めており、過去50年間でおよそ10倍と肺癌以上にその死亡者数が急増している。

研究代表者らは以前より大腸癌を遺伝子変異に基づいてRAS変異+MSI群、BRAF変異+MSI群、RAS/BRAF野生型+MSI群、RAS変異+non-MSI群、BRAF変異+non-MSI群、RAF/BRFA野生型+non-MSI群6つのカテゴリーに分類し、その各カテゴリーにおける治療戦略の構築の必要性を提示してきた¹。特にBRAF変異癌はMSI(マイクロサテライト不安定性)の有無により、その生物学的特徴はがらりと変わることが示されてきている²。我々は以前から、このBRAF変異癌に注目し、臨床病理学的な特徴の報告を行ってきた。

我々の報告と同様に、様々な大規模臨床試験の後解析において、BRAF変異癌のなかでもBRAF変異+Non-MSI癌(以下、BRAF癌)が極めて予後不良であることが示されており、大腸癌の発生の機序を解明する上においても重要なPhenotypeと考えられている。我々は、この予後不良の原因の一つとしてBRAF癌は多臓器転移を伴う傾向が強いことを突き止め、この多臓器転移を伴いやすいという分子生物学的原因をEpigenetic変異(DNAのメチル化異常やmiRNA発現分布異常など)に求め、ゲノムワイドな解析を用い、その原因の探索を鋭意進めてきた。具体的には、6つのカテゴリーに属し、臨床的予後もはっきりしている大腸癌組織からRNAを抽出し、miRNAマイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、BRAF癌だけに発現増加・低下を認めるmiRNA群を同定した。

驚くべきことに、BRAF癌に強く発現増加を認めるmiRNA(Group A)のターゲット遺伝子はPIK3CAであり、RAS-RAF cascadeのpositive feedbackへの寄与が示唆された。これに加えて、さらに驚くべきことに、BRAF癌に強く発現低下を認めるmiRNA群(Group B)も同定したが、そのGroup B miRNAすべてのターゲット遺伝子はZEB2という1つの転写因子をコードする遺伝子に集約されていた。Group B miRNA発現低下により、ZEB2は活性化される。そして、その活性化はEMT(Epithelial-Mesenchymal Transition)を引き起こすことが示唆されている。すなわち、BRAF癌はGroup B miRNA群によるEMTを介し易転移能を獲得する可能性が示唆された。また、BRAF癌に認められるGroup A/B miRNA群の変化と同様の変化はBRAF癌以外の大腸癌でも認められており、BRAF癌以外の予後不良大腸癌を予測するバイオマーカーとしての可能性を持つ。

2. 研究の目的

本研究は、

① Group A miRNAを用いた新規診断マーカーの開発とRAS-RAF cascade positive feedbackの証明

② Group B miRNAを用いた新規核酸医薬開発の基礎的検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

①に関しては、岡山大学医学部消化器外科にて行っている臨床研究(UMIN ID 7236, 8377, 9698, 11954, 11955)の付随研究にて現在、収集を行っている大腸癌患者のうち、67例のStage IV患者の腫瘍組織のGroup A miRNAsを解析し、後方視的に予後解析を行った。

Group A miRNAs発現群は統計的有意差を持って予後不良であることが示された。

②に関しては、①と同じコホートで原発巣組織と対の正常組織のGroup B miRNA(BRAF癌に強く発現低下を認める5つのmiRNAs, miR-A, miR-B, miR-C, miR-D, miR-E)の発現解析をquantitative reverse transcription PCRで行い、臨床病理学的因子や予後との関連を比較検討し、新規バイオマーカーとしての意義と、新規核酸医薬開発の基礎的検討を行った。

また、大腸癌細胞株HT29(BRAF変異+non-MSI癌)とHCT116(KRAS変異+MSI癌)を用いて、miRNAsを導入して発現量の経時的な変化を確認。発現が増加している時期のZEBsをWestern Blotで測定した。また逆にHT29、HCT116を用いてscratch assayおよびmigration assayでmiRNA導入による遊走能・浸潤能の抑制効果を確認した。

4. 研究成果

① Group A miRNAに関しては、岡山大学医学部消化器外科にて行っている臨床研究(UMIN ID 7236, 8377, 9698, 11954, 11955)の付随研究にて現在、収集を行っている大腸癌患者のうち、67例のStage IV患者の腫瘍組織のGroup A miRNAsを解析し、後方視的に予後解析を行ったところ、Group A miRNAs発現群は統計的有意差を持って予後不良であることが示された。

② Group B miRNAに関しては、cell lineにmiRNAsをTransfectionすると、ZEBsが発現低下、E-Cadherinが増加し、miRNAsをsilencingすると、E-cadherinの発現が減少し、Group B miRNAの抑制によりEMTを介した易転移能を獲得する可能性が示唆された。また、HCT116とHT29にGroup B miRNAsをtransfectionし、scratch assay(図1)、migration assay(図2)、invasion assay(図3)を行ったところ、mockと比較して浸潤能・遊走能が低下していた。このことは即ち、Group B miRNAsを用いた新規核酸医薬が腫瘍

浸潤抑制や遠隔転移の抑制につながる可能性を示唆した。

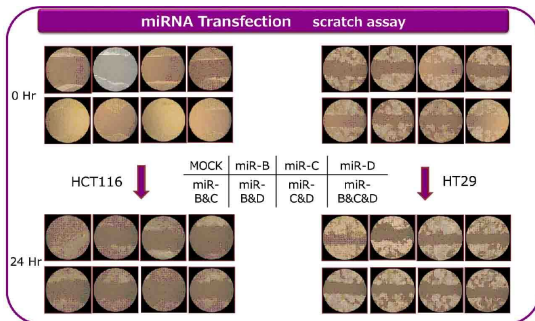


図 1

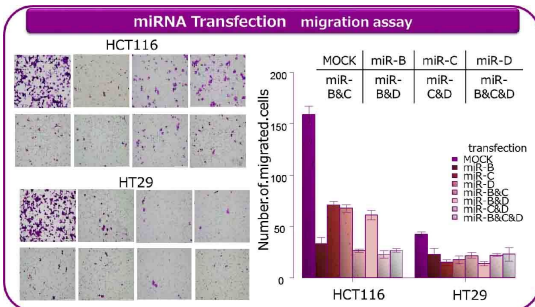


図 2

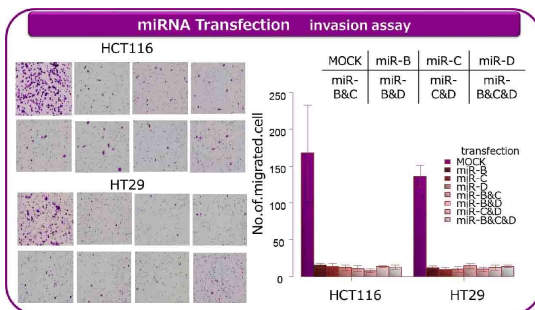


図 3

さらに、大腸癌患者のうち、67 例の Stage IV 患者の腫瘍組織と対の正常組織を比較した Group B miRNAs を解析し、後方視的に予後解析を行ったところ、Group B miRNAs 高発現群は低発現群に比較して予後不良な傾向を認め、そのうち一つの miRNA では統計学的有意差を持って予後不良であった (図 4)。残りの 4 つの miRNAs では有意差は認めなかったが、症例数が少ない事が影響している可能性がある。

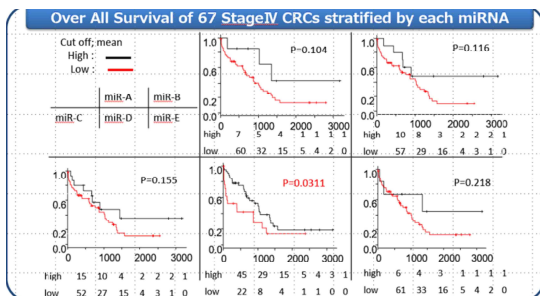


図 4

結論として、Group B miRNAs は新規核酸医薬として応用しうる可能性が示された。

< 引用文献 >

1. Nagasaka, T., et al. (2012). "[Biomarker for colorectal cancer]." *Nihon Rinsho* 70(5): 802-808. "[Biomarker for colorectal cancer]." *Nihon Rinsho* 70(5): 802-808.
2. Lochhead, P., et al. (2013). "Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication." *J Natl Cancer Inst* 105(15): 1151-1156.

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 6 件)

Yoshida K, Nagasaka T, Umeda Y, Tanaka T, Kimura K, Taniguchi F, Fuji T, Shigeyasu K, Mori Y, Yanai H, Yagi T, Goel A, Fujiwara T, Expansion of epigenetic alterations in EFEMP1 promoter predicts malignant formation in pancreatobiliary intraductal papillary mucinous neoplasms. *J Cancer Res Clin Oncol*. 査読有、2016 Jul;142(7):1557-69. DOI: 10.1007/s00432-016-2164-x. Epub 2016 Apr 19.

Inada R, Nagasaka T, Kondo Y, Watanabe A, Toshima T, Kubota N, Kikuchi S, Ishida M, Kuroda S, Mori Y, Kishimoto H, Fujiwara T, A Case-matched Comparative Study of Laparoscopic and Open Total Proctocolectomy for Ulcerative Colitis. *Acta Med Okayama*. 査読有、2015;69(5):267-73.

Inada R, Nagasaka T, Toshima T, Mori Y, Kondo Y, Kishimoto H, Kiraki T, Oshiro T, Kanemitsu Y, Fujiwara T, Aggressive multimodality treatment for advanced rectal cancer. *Acta Med Okayama*. 査読有、2015;69:113-118 PMID:25899633

Shigeyasu K, Nagasaka T, Mori Y, Yokomichi N, Kawai T, Fuji T, Kimura K, Umeda Y, Kagawa S, Goel A, Fujiwara T, Clinical Significance of MLH1 Methylation and CpG Island Methylator Phenotype as Prognostic Markers in Patients with Gastric Cancer. *PLoS One*. 査読有、2015 Jun 29;10(6):e0130409. doi: 10.1371/journal.pone.0130409. eCollection 2015.

Mori Y, Nagasaka T, Mishima H, Umeda Y, Inada R, Kishimoto H, Goel A, Fujiwara T, The rare BRAF V600-601E mutation as a possible indicator of poor prognosis

in rectal carcinoma- a report of a case. BMC Medical genetics 査読有、(2015)16:1, DOI 10.1186/s12881-015-0144-7

Shigeyasu K, Tazawa H, Hashimoto Y, Mori Y, Nishizaki M, Kishimoto H, Nagasaka T, Kuroda S, Urata Y, Goel A, Kagawa S, Fujiwara T. Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumour cells for non-invasive companion diagnostics. Gut. 査読有、2015 Apr;64(4):627-35. doi: 10.1136/gutjnl-2014-306957. Epub 2014 May 28.

[学会発表](計23件)

1. 永坂岳司, 母里淑子, 岸本浩行, 神原健, 河合毅, 中谷紳, 嶋村廣視, 富岡憲明, 森谷行利, 瀧上隆夫, 佃和憲, 藤原俊義、StageIV大腸がんの治療 遺伝子変異情報を考慮した StageIV大腸癌に対する予後の検討及び治療戦略の構築、第71回日本大腸肛門病学会学術集会、2016年11月19日、三重県営サンアリーナ(三重県)
2. 河合毅、永坂岳司、藤智和、安井和也、母里淑子、藤原俊義、転移性大腸癌における治療標的となりうるマイクロRNAの同定、第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6日-2016年10月8日、パシフィコ横浜(神奈川県)
3. 母里淑子, 田端雅弘, 西森久和, 久保寿夫, 枝園和彦, 森田瑞樹, 富田秀太, 江見裕美, 峠和美, 豊岡伸一、岡山大学におけるがんクリニカルシーケンスの臨床実装-抗がん剤適応遺伝子検査外来、第二回クリニカルバイオバンク研究会シンポジウム、2016年7月23日-2016年7月24日、北海道大学医学部学友会館フラテ大ホール(北海道)
4. 谷口文崇, 永坂岳司, 藤智和, 母里淑子, 岸本浩行, 河合毅, 榎田祐三, 藤原俊義、難治性固形癌のためのオーダーメイド医療 Orthodox & Serendipity 転移性結腸直腸癌における抗上皮増殖因子受容体治療に対する獲得耐性、第71回日本消化器外科学会、2016年7月14日、あわぎんホール(徳島)
5. Mori Yoshiko, Nagasaka Takeshi, Tazawa Hiroshi, Umeda Yuzo, Shigeyasu Kunitoshi, Yoshida Kazuhiro, Goel Ajay, Fujiwara Toshiyoshi、MGMT inactivation arrest tumor growth and serves as a promising predictive biomarker for treatment response in colorectal cancer、Digestive Disease Week 2016、2016年5月24日、San Diego
6. Kawai T, Nagasaka T, Mori Y, Fuji T, Taniguchi F, Kimura K, Yasui K, Umeda Y, Tazawa H Goel A, Fujiwara T., Micro RNAs as promising therapeutic targets for anti-metastatic therapy in colorectal cancer, American Association for Cancer Research, 2016年4月18日、Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)
7. Mori Y, Shigeyasu K, Nagasaka T, Toyooka S, Fujiwara T, Clinical Significance of MLH1 Methylation and CpG Island Methylator Phenotype as Prognostic Markers in Patients with Gastric Cancer, The 13th International Congress of Human Genetics, 2016年4月4日、Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)
8. 母里淑子, 永坂岳司, 稲田涼, 河合毅, 岸本浩行, 藤原俊義、Extended RAS/BRAF/MSI genetic 変異、MGMT epigenetic 変異を用いた StageIV大腸癌 Precision Strategy、第84回大腸癌研究会、2016年1月15日、ホテル日航熊本(熊本)
9. 母里淑子, 永坂岳司, 河合毅, 竹原裕子, 佃和憲, 中谷紳, 嶋村廣視, 瀧上隆夫, 富岡憲明, 森谷行利, 藤原俊義、大腸癌卵巣転移に対する治療と予後、第70回日本大腸肛門病学会学術集会、2015年11月13日、名古屋観光ホテル(名古屋)
10. 母里淑子, 永坂岳司, 谷口文崇, 河合毅, 藤原俊義、家族性大腸腺腫症におけるデスモイド腫瘍に対するタモキシフェンの有効性の検討、第21回日本家族性腫瘍学会学術集会、2015年6月5日、ラフレさいたま(埼玉県)
11. 稲田涼, 永坂岳司, 渡邊彩子, 八木朝彦, 松本聖, 母里淑子, 近藤喜太, 岸本浩行, 浅野博昭, 佃和憲, 藤原俊義、高齢者大腸癌に対するD3郭清の短期・長期成績の検討、第76回日本臨床外科学会総会、2014年11月22日、郡山市民文化センター(福島県)
12. 母里淑子, 永坂岳司, 重安邦俊, 豊岡伸一, 藤原俊義、ターナー症候群に合併した若年性大腸癌の一例、日本人類遺伝学会第59回大会、2014年11月19日、タワーホール船堀(東京都)

13. Nagasaka T, Mori Y, Umeda Y, Takehara Y, Kawai T, Taniguchi F, Fuji T, Toshima T, Inada R, Kondo Y, Ohara T, Kishimoto H, Nishizaki M, Kagawa S, Shirakawa Y, Yagi T, Fujiwara T, Clinical role of promoter hypermethylation in the MGMT gene during colorectal tumorigenesis, 第25回日本消化器癌発生学会総会・第8回国際消化器癌発生会議、2014年11月14日、ホテル日航福岡
14. 母里淑子, 永坂岳司, 稲田 涼, 戸嶋俊明, 竹原裕子, 中谷 紳, 竹原清人, 森川達也, 久保田暢人, 宇野 太, 滝上隆夫, 嶋村廣視, 森谷行利, 富岡憲明, 藤原俊義、Stage 大腸がんの予後マーカーとしての MGMT メチル化ステータスの有用性、第69回日本大腸肛門病学会学術集会、2014年11月8日、パシフィコ横浜
15. 戸嶋俊明, 稲田 涼, 永坂岳司, 母里淑子, 竹原裕子, 竹原清人, 佃 和憲, 藤原俊義、大腸癌検診の短期・長期治療成績における有用性の検討、第69回日本大腸肛門病学会学術集会、2014年11月8日、パシフィコ横浜
16. Mori Y, Nagasaka T, Umeda Y, Shiwaku R, Inada R, Nishida N, Kishimoto H, Kagawa S, Tanioka H, Mishima H, Fujiwara T, Goel A, Hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter as a prognostic biomarker for stage and colorectal cancers, ESMO 2014 Congress, 2014年9月28日, Madrid
17. Kubota N, Nagasaka T, Umeda Y, Mori Y, Kimura K, Taniguchi F, Tanioka H, Fujiwara T, Goel A, MicroRNA-89 expression as a promising prognostic biomarker for advanced colorectal cancer, ESMO 2014 Congress, 2014年9月28日, Madrid
18. Yokomichi N, Nagasaka T, Nishida N, Taniguchi F, Yoshida K, Tomokazu F, Kawai T, Takehara Y, Kimura K, Mori Y, Inada R, Umeda Y, Yagi T, Goel A, Fujiwara T, Cytokeratin 19, a novel prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma, is regulated by DNA methylation, ESMO 2014 Congress, 2014年9月28日, Madrid
19. Yoshida K, Nagasaka T, Umeda Y, Yokomichi N, Mori Y, Takehara Y, Takehara K, Kawai T, Tomokazu F, Taniguchi F, Yagi T, Goel A, Fujiwara T, Extensive methylation of epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) promoter could predict malignant formation in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN), ESMO 2014 Congress, 2014年9月28日, Madrid
20. 母里淑子, 永坂岳司, 稲田 涼, 岸本浩行, 近藤喜太, 竹原裕子, 河合 毅, 藤智和, 谷口文崇, 藤原俊義、切除可能高リスク直腸癌に対する術前 CapeOX + RT の安全性・有効性の検討、第52回日本癌治療学会学術集会、2014年8月29日、パシフィコ横浜
21. 永坂岳司, 岸本浩行, 母里淑子, 稲田 涼, 近藤喜太, 竹原裕子, 河合 毅, 藤智和, 谷口文崇, 横道直佑, 久保田暢人, 吉田一博, 榎田祐三, 八木孝仁, 藤原俊義、臨床病期 & 直腸癌の遺伝子変異情報及び臨床病理学的所見と予後の検討、第52回日本癌治療学会学術集会、2014年8月29日、パシフィコ横浜
22. 稲田 涼, 永坂岳司, 母里淑子, 榎田祐三, 吉田一博, 久保田暢人, 竹原裕子, 竹原清人, 河合 毅, 藤原俊義、KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA/MSI 解析による多発大腸癌の遺伝子変異の不均一性の検討と臨床的意義、第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日、郡山市民文化センター(福島県)
23. 母里淑子, 永坂岳司, 稲田 涼, 岸本浩行, 近藤喜太, 藤智和, 谷口文崇, 浅野博昭, 佃 和憲, 藤原俊義、局所進行直腸癌に対する術前放射線化学療法 CapeOx RT の有効性・安全性の検討、第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日、郡山市民文化センター(福島県)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

母里淑子 (Mori Yoshiko) 岡山大学大学院
医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70708081

(2) 研究分担者

榎田祐三 (Umeda Yuzo)
岡山大学病院 肝胆膵外科 助教
研究者番号：10573735

永坂岳司 (Nagasaka Takeshi)
岡山大学病院 消化器外科 講師
研究者番号：30452569

中村圭一郎 (Nakamura Keiichiro)
岡山大学病院 産婦人科 講師
研究者番号：90359886

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()