

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10154

研究課題名(和文) 家族性大腸腺腫症患者における分子マーカー探索と新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of molecular marker and novel therapy for FAP

研究代表者

山野 智基 (Yamano, Tomoki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00599318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血液中のmiRNAがFAPのバイオマーカーとなるか検討した。大腸全摘前FAP患者5名と健康者3名のmiRNAを次世代シーケンサーで解析した。FAP患者で変化しているmiRNAとして、miR143-5p(7.6倍)、miR143-3p(6.2倍)、mir96-5p(10.9倍)、mir183-5p(2.9倍)、mir885-5p(8分の1)が抽出された。Validationとしてmir-143の定量的PCRを行ったがNGSを行った3例では0.76倍～1.9倍と差は小さかった。大腸全摘前では増加傾向であったが、大腸全摘後の患者では減少しており、大腸腺腫との関係が示唆される結果であった。

研究成果の概要(英文)：We looked for biomarker of FAP in plasma miRNA to detect existence of FAP and associated comorbidities. We compared plasma from five FAP patients before total proctocolectomy and three healthy volunteers using next generation sequence. Candidates included mir143-5p (7.6 times increase), mir143-3p (6.2 times increase), mir96-5p (10.9 times increase), mir183-5p (2.9 times increase), mir885-5p (one-eighth decrease). Among these candidates, we validated mir-143 because mir143-3p demonstrated high copy number in plasma. Decrease of mir143 in polyp of FAP patients was also reported. We measure relative expression of mir143 in eight FAP patients included three patients assessed by NGS. Relative expression of mir143 was 1.48, 1.28, 1.9, 1.46 and 0.76 in FAP patients before surgery. Relative expression of mir143 was 0.42, 0.44 and 0.2 in FAP patients after surgery. These data indicated mir143 expression might decrease after surgery, which meant polyposis influenced mir143 expression.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：家族性大腸腺腫症 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患についてはその原因遺伝子が同定された時点でその病態が全て解明出来たと考えられがちであるが、実際は同定された遺伝子異常だけでは説明出来ない病態が多い。原因遺伝子以外の遺伝子変異、エピジェネティックな変化、外的因子も大きく病態に関与しており、病態解明にはこれらを考慮する必要がある。

家族性大腸腺腫症(Familial adenomatous polyposis: FAP)は、がん抑制遺伝子 APC(Adenomatous polyposis coli)変異による遺伝性疾患として非常に有名であるが、APC 遺伝子変異を伴わない患者が 20-40%存在し、APC 遺伝子変異からだけでは大腸腺腫の数・分布は必ずしも予測出来ない。またデスマイドは FAP 患者の 10-15%に合併し、病理学的には良性とされ緩徐に増殖するが、FAP では腸間膜に発生することが多く、診断がついた時点で外科的切除が困難なことがほとんどである。そのため治療は困難で予防的大腸全摘を受けた FAP 患者の主要な死因となっている。デスマイド発生も APC 遺伝子変異の部位が関係しているとされるものの、実臨床ではデスマイド発生予測には用いられず、デスマイドの発生原因は依然として不明であり早期診断も困難である。

FAP 患者における大腸腺腫の発生、デスマイド発生には APC 遺伝子変異以外に外的因子の影響が強いと考えられる。特にデスマイドは病理学的には良性腫瘍とされるが局所進行性が強く臨床的には悪性腫瘍である。しかし増殖速度は一定ではなく、病勢が不変の期間と増殖が早くなる期間があり、20-40 代の若年者が多く罹患するがそれ以上の年齢では少なく遺伝子変異以外に外的因子が引き金となって増殖が進むと考えられる。また COX2 インヒビターなどの抗炎症剤が一般には効果があり、ホルモン剤であるタモキシフェン、分子標的薬であるイマチニブにも反応する場合があります非常に多様性に富む病態を示す。

血清中のマイクロ RNA が疾患の病態と関係しているとの知見は多い。同一患者で大腸全摘の前後、デスマイド発生の前後でのマイクロ RNA 変化を調べることで腺腫の発生、デスマイド発生に関連するマイクロ RNA を同定することが期待される。

ノックアウトマウスの研究から APC 遺伝子異常が消化管ポリポシス発生に関与すること、デスマイドの発生に Hedgehog(HH) シグナル系の異常が関与していることが示唆されているものの、実際に患者由来の細胞で遺伝子変異を導入し確認することはこれまで不可能であった。しかし佐藤らにより確立された腸管上皮幹細胞の長期培養法(オルガノイド培養、Sato T, Gastroenterology:2011)は、これまでの細胞培養やマウスへの組織片移植とは異なり、実際の大腸組織を再現することからウイルス

ベクターなどによる遺伝子改変や薬剤の影響を直接確認できるなど大腸疾患の病態解明や創薬、再生医療への応用も期待される画期的な方法である。APC 遺伝子変異を伴わない FAP 患者での病態解明や、大腸癌でも遺伝子異常が報告されている HH シグナル系の関与やその分子標的薬(デスマイドと病態が似ている皮膚基底細胞がんでは臨床応用されている)の有効性を検討出来る。また FAP と診断された患者でのオルガノイド培養の条件と APC 遺伝子変異の有無・部位を検討することで、新しい FAP の診断基準が出来る可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では FAP 患者由来の血清中マイクロ RNA、大腸粘膜・大腸腺腫から得られたオルガノイド、腸間膜から得られた間葉系幹細胞などを用いて Hedgehog (HH) シグナル系異常を含め APC 遺伝子異常以外の病態に関係する因子の解明を目的とする。本研究により FAP 患者での大腸癌・デスマイドの早期発見に有用な分子マーカーの発見、腺腫発生予防とデスマイド治療への HH シグナル系阻害分子標的薬の臨床応用が期待される。

KAKEN データベースで研究課題「デスマイド」で検索すると、この 5 年間では 2 件の課題が採択されているのみで、FAP とは関係しない整形外科、皮膚科で採択されている。FAP に関連するデスマイドは若年発症であり、腹腔内デスマイドが多数を占めるため一度発症すると手術困難で根治は不可能であるため病期期間が長くなる。それにも関わらずデスマイドに関する基礎研究論文は極めて少なく、トロント大学の Alman のグループのみからと言える状態であり、研究代表者が参加した 2014 年度米国癌学会 (AACR2014)でも、デスマイドに関するポスター発表は 1 件の症例報告のみであった。従って腹腔内デスマイドに対する研究基盤は本邦のみならず世界的にも極めて脆弱である。

当科は宇都宮譲二元教授の時代から FAP に対する外科治療 (J 式ポーチを用いた大腸全摘術)、デスマイドに対する化学療法 (ドキシソルピシン/ダカルバジン併用療法: J Clin Oncol. 2006; 24:102-5)を開発して来た。当科は症例数も多くサンプルを集めることも容易であり、病状に関係する分子マーカーを見出すこと、HH シグナル系に対する分子標的薬を臨床応用すること、FAP 患者における病態を解明することは当科の責務である。

3. 研究の方法

(サンプルの採取)

FAP 患者に対する外科手術の際に、大腸腺腫、正常粘膜、大腸癌組織を採取する。また外科で手術を既に行い併存疾患の無い患者、既にデスマイドを発症し治療中の患者については外来での血液検査に合わせて研究用の血液を随時採取する。研究期間中に大腸全摘手

術を行う患者については手術前と、手術後に研究のための血液採取を行う。採取した血液は速やかに遠心して血清分離を行いマイナス80に保管する。マイクロRNAを抽出して以下の比較解析を行う。

(1)同一患者でデスマイドが発生する前と発生後の比較。

(2)デスマイドが発生している患者とデスマイドが発生していない患者の比較。

(3)大腸全摘前の患者と大腸全摘後の患者の比較。

上記の優先順位でマイクロRNAマイクロアレイを行い、病態変化に伴って変動するマイクロRNAを同定する。

4. 研究成果

FAP患者に特異的なマイクロRNAの検索

1年目にデスマイドが発生した患者がいなかったため、上記(3)の比較を行うことにした。以下のFAP患者5人と健常者3人の血漿を次世代シーケンサーを用いてマイクロRNAを定量し、健常群に比べて患者群で有意に変化しているマイクロRNAを検索した。患者は大腸全摘前に血液を採取し、消化管病変は表1に示す状態であったが、デスマイドは認めなかった。

表1

サンプル	年齢	大腸病変	十二指腸腺腫	胃腺腫
FAP2	30	腺腫のみ	無し	あり
FAP6	22	腺腫のみ	無し	あり
FAP8	33	腺腫のみ	あり	あり
FAP10	24	早期癌	無し	あり
FAP12	56	腺腫のみ	あり	あり
N2	34			
N3	32			
N4	25			

主成分分析では健常者とFAP患者でPC1で差が見られる傾向があったが、健常者間、FAP患者間でも大きな差は見られた。

またクラスタリングをヒートマップ表示すると一部のFAP患者とそれ以外(健常者とその他のFAP患者)で大きな差が見られた。

次に健常者とFAP患者で大きく変化しているマイクロRNAを抽出すると表2のものがFAP患者に対するマーカー候補として挙げられた。

mir-143はTumor suppressor miRNAとされており、FAP患者の大腸腺腫で減少しているとの報告があるが我々の解析では血漿中のmir-143は増加していた。

mir-96はOncomiRNAとされており、Mir183とclusterを形成するとの報告がある。

mir-183はOnco / Tumor suppressor 両方の報告があり大腸癌の再発マーカーの報告がある。

mir885は大腸癌の予後マーカーの報告がある。

表2

マイクロRNA	logFC	P Value	FAP	normal
miR-143-5p	2.76	0.0004	11.1	1.6
miR-96-5p	3.30	0.0005	10.9	1.2
miR-218-5p	2.94	0.002	35.1	4.5
miR-106a-5p	2.20	0.002	11.3	2.4
miR-10b-3p	2.21	0.002	20.0	4.4
miR-143-3p	2.49	0.003	23673	4208
miR-885-5p	-2.83	0.003	2.1	15.0
miR-183-5p	1.69	0.003	1422	440
miR-214-5p	2.43	0.003	29.2	5.4
miR-885-3p	-1.78	0.009	7.09	24.4

この中でmir143は大腸腺腫との関係が報告されている上に、mir143-3pのコピー数が多いことから、マーカーとして最も適していると考えてValidationを行うこととした。

表3

Sample	Cp (mir143)	Cp (mir16)	増減	コメント
Control	29.7	23.7	1	健常者3人平均
FAP-1	29.7	22.4	0.42	術後
FAP-5	27.5	20.4	0.44	術後
FAP-6	27.9	22.5	1.48	NGS
FAP-7	29.4	21.1	0.20	術後
FAP-9	27.1	21.5	1.28	デスマイド
FAP-10	28.1	23.0	1.90	NGS
FAP-11	28.0	22.6	1.46	術前
FAP-12	29.2	22.8	0.76	NGS

NGS:次世代シーケンス施行症例

健常者に比べてNGS症例を含めて術前では増加している場合が多いものの、その程度は小さかった。逆に術後症例では減少しており、腺腫の有無により血漿中のmir143が変化している可能性が示唆された。

本邦における遺伝性大腸癌診療の現状についての報告

当初の研究計画には無かったが、第85回大腸癌研究会において遺伝性大腸癌に関するアンケートを行い、本邦における遺伝性大腸癌診療の現状を調査した。

その結果FAPに関しては、腹腔内デスマイドに対しては症例を多く経験している施設の方が手術以外の治療法を選択しており、経験症例数により治療法が異なる結果であった。

またリンチ症候群と診断された患者数が欧米に比べて著しく少なく(5年間で174人、年間症例数2万件以上)、Universal screeningが行われておらず、多くの症例が見逃されていると考えられた。

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1件)

Yamano T, Hamanaka M, Babaya A,

Kimura K, Kobayashi M, Fukumoto M, Tsukamoto K, Noda M, Matsubara N, Tomita N, Sugihara K. Management strategies in Lynch syndrome and familial adenomatous polyposis: a national healthcare survey in Japan. Cancer Sci. 2017 Feb;108 (2):243-249. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

山野 智基, 木村 慶, 馬場谷 彰仁, 濱中 美千子, 小林 政義, 塚本 潔, 野田 雅史, 今田 絢子, 宋 智亨, 池田 正孝, 富田 尚裕. FAP 患者における血漿中 miRNA のバイオマーカーとしての有効性の検討. 第 87 回大腸癌研究会 2017 年

〔図書〕(計1件)

大腸疾患 Now2017-2018 編集主幹 杉原健一。1 - 199、2017

(分担執筆) 山野智基、富田尚裕。遺伝性大腸癌に関する現状について。131 - 137。

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山野 智基 (YAMANO, TOMOKI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00599318

(2) 研究分担者

富田 尚裕 (TOMITA, NAHIRO)
兵庫医科大学・医学部・主任教授
研究者番号: 00252643

久保 秀司 (KUBO, SHUJI)
兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10441320

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()