

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10598

研究課題名(和文) コホート保存検体RNA解析による消化器癌・肺癌早期診断マーカーに関する研究

研究課題名(英文) Research on RNA as the early diagnostic marker of gastrointestinal and lung cancers using preserved samples of cohort studies

研究代表者

菱田 朝陽 (Hishida, Asahi)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40447339

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)：大腸がん早期診断マーカー候補のマイクロRNA(miRNA)の網羅的解析施行の結果選ばれたmiRNAについて、独立したデータセットを用いた再現性検証の結果、早期大腸がん症例+対照において、miR-26a-5pとmiR-223-3pが診断精度100%(AUC=1.00)と高い診断能を示し、最終的に、日本多施設共同コホート研究(J-MICC Study)の参加2年以内に進行期大腸がんを発症した症例と性年齢をマッチさせた対照を用いた検証の結果、miR-26a-5pがAUC=0.84(P=0.014)と高い診断能を示し、新たな大腸がんの早期診断マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回のコホート研究の保存検体を活用した研究により、従来の検査法より侵襲の少ない、少量の血液中のマイクロRNAであるmiR-26a-5pの濃度を調べることにより、病院の検査で診断を受けるよりも早期に大腸がんが診断できる可能性が示唆された。miR-26a-5pは大腸がんにおけるスーパーエンハンサー関連miRNAであることが知られており、今後の同miRNAの大腸がんを含むがん発症やがん早期診断マーカーとしての役割についての更なる研究が待たれる。今回の研究は限られた症例数での検討結果であるため、今後より多数例での検証により、実用化の可能性を慎重に検討する必要があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：As a result of replication studies of the microRNAs(miRNAs) selected based on the comprehensive expression analyses of miRNAs between colorectal cancer(CRC) cases and controls using microarrays, miR-26a-5p and miR-223-3p demonstrated the strikingly high diagnostic accuracy of 100% (specificity=100%, sensitivity=100%, AUC=1.00), and final analyses using incident CRC cases from cohort samples from the Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study(J-MICC Study) who developed CRC within 2 years after participation and sex- and age-matched controls revealed that miR-26a-5p, which is also known as a super-enhancer associated miRNA in CRC, indicated the good diagnostic accuracy of AUC=0.84(P=0.014), suggesting the possibility that miR-26a-5p could be a novel early diagnostic marker for CRC.

研究分野：予防医学

キーワード：大腸がん がん早期診断 マイクロRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化器がん・肺がんは依然として日本人のがん罹患・がん死亡の大部分を占め、その早期診断等2次予防を含めた予防対策は公衆衛生的にも急務である。

一方、血中マイクロRNA(miRNA)をはじめとする血中遊離核酸によるがん早期診断能に関する研究は国内外で盛んに行われているが、コホート研究参加者のがん発症前検体を用いた研究は稀である。コホート研究参加者検体を用いて、がん発症前(3年以内)にがん早期診断が既に可能であることが示されれば、将来のがん“超”早期診断マーカーの開発・実用化につながる可能性がある。

2. 研究の目的

消化器がん、肺がんにおけるmiRNA早期診断マーカーとなる血中miRNA候補の抽出と、コホート保存検体を用いた発症前“超”早期診断能を検証すること。

3. 研究の方法

文部科学省・コホート生体試料支援プラットフォームの支援活動に基づき、神奈川県立がんセンター臨床研究所から提供された消化器がん検体、独自に同意取得の上、伊賀市立上野総合市民病院で収集を行った消化器がん血清検体と性・年齢をマッチさせたがん既往歴のないコホート参加者血清検体中のmiRNA発現量をSAM(significant analysis of microarray)を用いて解析し、消化器がんで有意に発現量が上昇・低下しているmiRNAを特定し、再現性を確認した上で、日本多施設共同コホート研究(J-MICC Study)参加者検体を用いて、がんの臨床診断前の“超”早期診断能を検証する。

4. 研究成果

本研究の成果として、miRNA大腸がん早期診断マーカーの可能性のある分子としてmiR-26a-5pを同定し、また、miRNAがん早期診断マーカー研究のためのコントロール検体収集を行ったので、以下にその成果を詳述する。

(1) miRNA大腸がん早期診断マーカー研究

背景と目的：

伊賀市立上野総合市民病院の大腸がん罹患症例、コホート生体試料支援プラットフォームの支援活動に基づき、神奈川県立がんセンター臨床研究所から提供された大腸がん症例検体を症例とし、日本多施設共同コホート研究(J-MICC Study)参加者検体を対照とした解析により候補となるmiRNAを抽出、再現性を検証し、同じくJ-MICC Studyの発症前参加者検体を用いて、臨床診断前の“超”早期診断能の評価を行った。

方法：

具体的な研究の流れを図1に示す。

まず、Discovery Phaseとして、神奈川県立がんセンター病院を受診し、2019年から2020年に外科手術を受けた早期大腸がん症例(臨床病期I, II)7例と伊賀市コホート研究に参加した性・年齢をマッチさせた7例の凍結血清検体について、キアゲン社のmiRNA抽出キットを用いてmiRNAを抽出し、東レ社の3D-Geneラベリングキットを用いて蛍光標識後、同じく東レ社の3D-Gene miRNAオリゴチップを用いてハイブリダイズ後、蛍光強度の測定を行った。

マイクロアレイデータの統計解析には、SAM(significant analysis of microarray)(Tusher VG, et al. *PNAS* 2001)を用いた。

再現性の検証(Replication Phase)については、2つの独立したデータセットを用いた。1つ目のデータは、Discovery Phaseと同じく、神奈川県立がんセンター病院を受診し、2019年から2020年に外科手術を受けた早期大腸がん症例(臨床病期I, II)8例と伊賀市コホート研究に参加した性・年齢をマッチさせた8例で、2つ目のデータは、伊賀市立上野総合市民病院を受診した大腸がん症例(臨床病期I-IV)12例と、伊賀市コホート研究に参加した性・年齢をマッチさせた12例である。キアゲン社のmiRNA抽出キットを用いてmiRNAを抽出し、同社のmiRCURY LNA RTキットを用いてcDNAへの逆転写を行った上で、定量的リアルタイムPCR法により解析を行った。miRNA発現量の定量化は、Cq法により行い、内部標準としてmiR-16-5pを用いた。

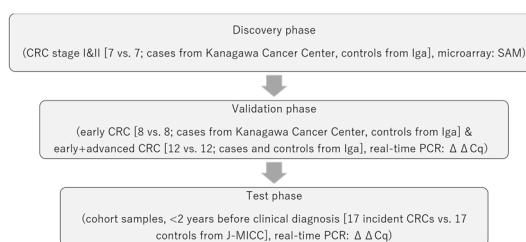


図1. 研究の流れ

最終的に、臨床診断前の大腸がんの「超」早期診断能の検証を、J-MICC Studyの静岡地区、大幸地区、伊賀地区で参加2年以内に大腸がんを発症した17例と性・年齢をマッチさせた17例の対照の凍結保存血清を用いて行った。実験手技については、Replication Phaseと同様の手法で行った(図1)

結果:

参加者特性を表1に示す。大腸がんの早期診断マーカーとして有用なマイクロRNA(miRNA)の網羅的解析として、早期大腸がん7例と性年齢をマッチさせた7例の対照の血清検体を用いたマイクロアレイ発現データに基づくSAM(significant analysis of microarray)解析を行った(Discovery phase)。解析の結果、統計学的に最も有意に大腸がんが発現上昇のみられたmiRNAとして、miR-6765-3p, miR-5100, miR-572が、発現低下のみられたmiRNAとして、miR-518e-5pが抽出され、また大腸がんについて既報で有意なものとして、miR-223-3p, miR-21-5p, miR-22-5p, miR-26a-5p, miR-15a-5pが選ばれた。(表2、図2)

表1. 参加者特性

Variables	Discovery		Validation-1		Validation-2		Test (cohort, J-MICC)	
	Case (n=7)	Control (n=7)	Case (n=8)	Control (n=8)	Case (n=12)	Control (n=12)	Case (n=17)	Control (n=17)
Male (%)	5 (71.4%)	5 (71.4%)	4 (33.3%)	4 (33.3%)	8 (66.7%)	8 (66.7%)	12 (70.6%)	12 (70.6%)
Age, mean ± SD	58.4±6.9	58.0±5.7	74.5±4.2	64.5±1.3	69.0±7.7	63.8±4.5	59.7±8.0	59.5±7.3
Cancer site								
Colon (C)	0 (0.0%)	-	4 (50.0%)	-	2 (16.7%)	-	4 (23.5%)	-
Sigmoid (S)	2 (28.6%)	-	1 (12.5%)	-	6 (50.0%)	-	7 (41.2%)	-
Rectum (R)	5 (71.4%)	-	3 (37.5%)	-	4 (33.3%)	-	4 (23.5%)	-
S-R	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	-	2 (11.8%)	-
Clinical stage								
I	6 (85.7%)	-	3 (37.5%)	-	1 (8.3%)	-	3 (17.6%)	-
II	1 (14.3%)	-	5 (62.5%)	-	4 (33.3%)	-	7 (41.2%)	-
III	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	-	7 (58.3%)	-	3 (17.6%)	-
IV	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	-	2 (11.8%)	-
(Unknown)	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	-	2 (11.8%)	-

表2. Discovery Phase で選ばれた miRNA

miRNAs	Fold-change	q-value (%)
A, miRNAs upregulated in CRCs		
Smallest q-value		
miR-6765-3p	3.356	0
miR-5100	3.114	0
miR-572	3.152	0
CRC associated, smallest q-value		
miR-223-3p	2.867	0
miR-26a-5p	2.862	4.091
CRC associated, reported by our group (9,10)		
miR-21-5p	1.766	9.431
B, miRNAs downregulated in CRCs		
miRNAs	Fold-change	q-value (%)
Smallest q-value		
miR-518e-5p	0.381	15.197
CRC associated, smallest q-value		
miR-22-5p	0.578	15.197
miR-15a-5p	0.474	15.197

CRC, colorectal cancer; miR, microRNA.

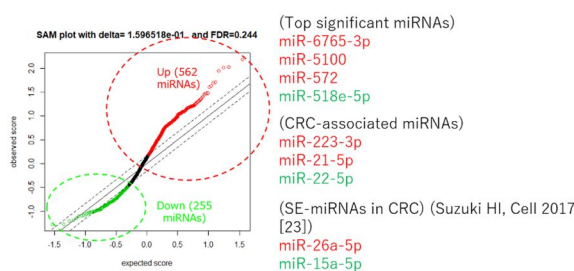


図2. SAMプロット

次に、独立した早期大腸がん8例と性年齢をマッチさせた8例の対照、早期+進行大腸がん12例と性年齢をマッチさせた12例の対照を用いて再現性の検証を行った(Replication phase)ところ、早期大腸がん(8例+8例)において、miR-26a-5pとmiR-223-3pが診断精度100%(感度100%、特異度100%、AUC=1.00)と高い診断能を示し、早期+進行大腸がん(12例+12例)でもAUC>0.6であった(図3、図4)。

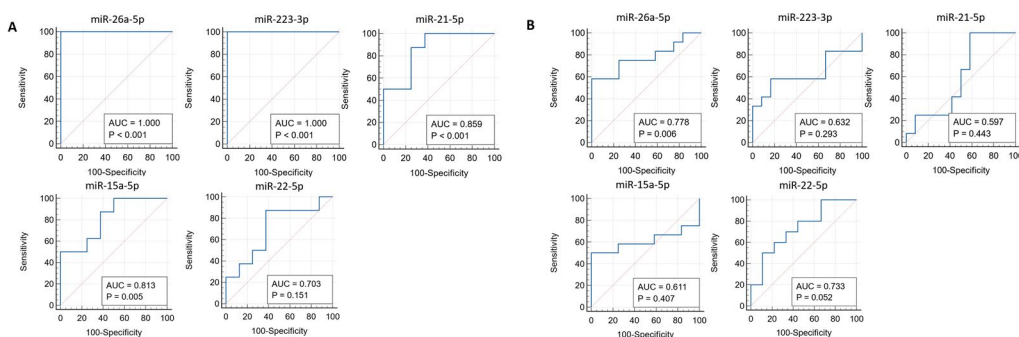


図3. Replication PhaseでのROC曲線

(A: 神奈川県立がんセンターの早期大腸がん症例、B: 伊賀の大腸がん症例)

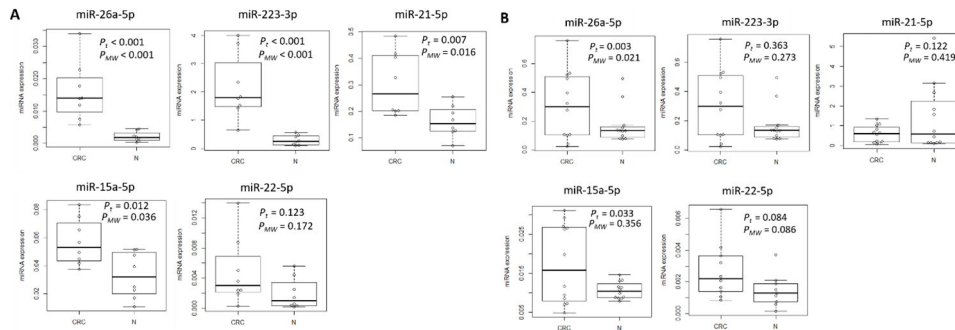


図4 . Replication Phase での各 miRNA 発現量

(A : 神奈川県立がんセンターの早期大腸がん症例、 B : 伊賀の大腸がん症例)

最終的に、日本多施設共同コーホート研究 (J-MICC Study) の静岡地区、大幸地区、伊賀地区で参加 2 年以内に大腸がんを発症した 17 例と性・年齢をマッチさせた 17 例の対照の凍結保存血清を用いて、臨床診断前の大腸がんの「超」早期診断能を検証した (Test phase) 結果、進行大腸がんを発症した 5 例と性年齢をマッチした対照 5 例の比較において、miR-26a-5p が AUC=0.84 (P=0.014) と高い診断能を示し、新たな大腸がんの早期診断マーカーとなる可能性が示唆された (図 5)

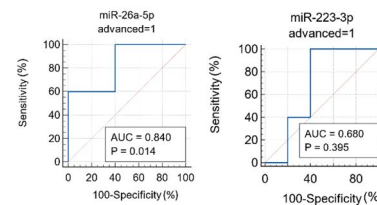


図 5 . “超” 早期診断能検証における

ROC 曲線

考察・結論：

miR-26a の発現は、ヒトの大腸がん組織検体で *PTEN* 発現と逆相関することが報告されており (Coronel-Hernández J, *et al.*, *Cancer Cell Int* 2019)、また大腸がんにおいて *retinoblastoma 1 (Rb1)* 遺伝子の発現を抑制することも報告されている (López-Urrutia E, *et al.*, *Tumour Biol* 2017)。miR-26a-5p は、エンハンサーと複数の転写因子が高密度で集積するゲノム上の領域である、スーパーエンハンサー関連の miRNA (SE-miRNA) の 1 つとしても報告されており (Suzuki HI, *et al.*, *Science* 2017)。今後の SE-miRNA の大腸がんをはじめとする発がんや早期診断マーカーとしての役割の解明が待たれる。Replication Phase で有意な診断マーカーとなった miR-223-3p についても、*PRDM1* の抑制を通じて大腸がんの増殖や浸潤に関与することが分かっており (Chai B, *et al.*, *Am J Transl Res* 2019)。今後の大腸がん早期診断マーカーとしての更なる検証が待たれる。今回の研究の限界としては、比較的少ないサンプルサイズと、miRNA は凍結保存下で比較的安定であるとはいえ、検体収集から測定までの期間には若干のばらつきがあり、今後これらを考慮した更なる研究が必要であろうと思われる。

本研究により、miR-26a-5p の大腸がん早期診断マーカーとしての有用性が示唆された。今後、より良い研究デザインでの更なる関連の検証が望まれる。

(2) miRNA がん早期診断マーカー研究のためのコントロール検体収集

伊賀市立上野総合市民病院 (伊賀市健診センター) において、miRNA がん早期診断マーカー研究のためのコントロール検体収集を説明同意の上実施し、現在も継続中である。

(文献)

Hishida A, Yamada H, Ando Y, Okugawa Y, Shiozawa M, Miyagi Y, Daigo Y, Toiyama Y, Shirai Y, Tanaka K, Kubo Y, Okada R, Nagayoshi M, Tamura T, Mori A, Kondo T, Hamajima N, Takeuchi K, Wakai K.

Investigation of miRNA expression profiles using cohort samples reveals potential early detectability of colorectal cancers by serum miR-26a-5p before clinical diagnosis.

Oncol Lett. 2022;23:87.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hishida Asahi, Yamada Hiroya, Ando Yoshitaka, Okugawa Yoshinaga, Shiozawa Manabu, Miyagi Yohei, Daigo Yataro, Toiyama Yuji, Shirai Yumiko, Tanaka Koji, Kubo Yoko, Okada Rieko, Nagayoshi Mako, Tamura Takashi, Mori Atsuyoshi, Kondo Takaaki, Hamajima Nobuyuki, Takeuchi Kenji, Wakai Kenji	4. 巻 23
2. 論文標題 Investigation of miRNA expression profiles using cohort samples reveals potential early detectability of colorectal cancers by serum miR-26a-5p before clinical diagnosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Asahi Hishida, Hiroya Yamada, Yoshinaga Okugawa, Manabu Shiozawa, Yohei Miyagi, Yataro Daigo, Yuji Toiyama and Koji Tanaka
2. 発表標題 Early detection of colorectal cancers by miRNA expression analysis of cohort samples
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	問山 裕二 (Toiyama Yuji) (00422824)	三重大学・医学部附属病院・准教授 (14101)	
研究分担者	田中 光司 (Tanaka Koji) (10345986)	三重大学・医学系研究科・客員教授 (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川口 晃司 (Kawaguchi Koji) (10402611)	三重大学・医学部附属病院・准教授 (14101)	
研究分担者	中枿 昌弘 (Nakatochi Msahiro) (10559983)	名古屋大学・医学系研究科（保健）・准教授 (13901)	
研究分担者	奥川 喜永 (Okugawa Yoshinaga) (30555545)	三重大学・医学部・助教 (14101)	
研究分担者	三木 誓雄 (Miki Chikao) (50242962)	三重大学・医学系研究科・客員教授 (14101)	
研究分担者	山田 宏哉 (Yamada Hiroya) (80610352)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関