

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15646

研究課題名（和文）早期大腸癌に特異的なmicroRNAの同定とその機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of microRNAs specific for early-stage colorectal cancer

研究代表者

千代 大翔（Chiyo, Taiga）

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50769346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では早期大腸がんの検体から、がん部分と健康部分を取り、microRNA(miRNA)の違いを、2555種類のmiRNAについてを解析したところ、増加したmiRNAが11個、減少したmiRNAが15個検出した。続いて有意な変化の見られるmiR-452-5pを大腸がん細胞に導入し、細胞の増殖やがんの浸潤への影響を調査した。その結果miR-452-5pは、大腸がん細胞の増殖を促進し、浸潤を抑制することが明らかとなった。その機序としてERK経路の活性化やSlugの抑制が関与す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

本研究では早期大腸がんの新しいバイオマーカー候補のmiRNA（特にmiR-452-5p）を同定した。学術的意義として、大腸がんの発症・進行のメカニズムを理解することができ、さらなるがん研究に貢献する可能性がある。また、miR-452-5pが細胞の増殖や上皮間葉転換に関わる鍵となる分子である可能性が示唆されており、がんの進行と関連するシグナル経路を明らかにすることで、新たな治療法開発の糸口となる可能性がある。社会的意義として、早期大腸がんのバイオマーカーの同定は、早期診断や治療戦略の改善につながり、患者の治療成績を向上、医療費を削減につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We took cancerous and healthy portions of early-stage colorectal cancer specimens and analyzed the differences in microRNAs (miRNAs) for 2555 different miRNAs, and detected 11 miRNAs that increased and 15 miRNAs that decreased. Then, miR-452-5p, which showed significant changes, was introduced into colon cancer cells, and its effects on cell proliferation and cancer invasion were investigated. The results showed that miR-452-5p promoted proliferation and inhibited invasion of colon cancer cells. The results suggest that activation of the ERK pathway and suppression of Slug may be involved in the mechanism.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 microRNA EMT 上皮間葉転換 ERK Slug

1. 研究開始当初の背景

本邦における 2017 年の大腸癌の罹患数は約 15.8 万人、2018 年の死亡数が約 5 万人となっており、癌による総死亡の 13.6%を占める主要な癌である。一方 Stage Ⅰの大腸癌における 5 年相対生存率は 95.1%と良好(2010-2011 年,国立がん研究センター)であり、大腸癌の早期発見を推進していく必要がある。しかし、2016 年の大腸癌検診受診率は全国平均で 41.4%と依然低い現状があり、便潜血検査や負担の大きい大腸内視鏡検査が敬遠されることが課題となっている。そこで、簡便かつ有用な早期診断が可能な診断マーカーの開発が急務である。

また、癌の確定診断は、癌組織の一部を穿刺や内視鏡処置などによって採取し、その組織片の病理組織検査を行う、生検法によってなされるのが一般的である。その一方で時に診断が困難な病変が存在し、深達度の推定に難渋し、内視鏡切除、外科的切除の判断の難しい症例が存在する。そのため、さらなる大腸癌の深達度の診断、転移リスク評価の精度の向上のために、これらの検査手段を補助もしくは上乗せするような検査手段が望まれている。

microRNA(以下、miRNA)は、遺伝子発現調節において重要な役割を有し、特定の miRNA 発現異常と、がん・免疫系など様々な疾患の発症・悪性化、転移との間に密接な関連が明らかになっている。例えば、がん抑制性に作用する tumor suppressor miRNA やがん促進性に働く miRNA が報告されている。miRNA は 17-25 塩基の non-coding RNA の一種であり、標的 mRNA の分解、あるいは翻訳を抑制することにより、転写後の遺伝子発現を調節している。このため miRNA はヒト疾患・各種の癌腫の再発・転移を予測するバイオマーカーとして有用な可能性が示唆されている。これまでに miR-21 および miR-92a が大腸癌の血清バイオマーカーとなりうること、また miR-92a が予後と相関がみられることが報告されている(Cancer Lett 360: 89-105, 2015)。しかし、内視鏡的切除可能とされる上皮内癌、粘膜下層浸潤癌に特異的に発現し、診断を補助するような miRNA の研究はまだ報告されていない。

また miRNA には、単なる結果としてのマーカーというだけでなく、そのものが癌の増殖・浸潤や転移に対して機能的な役割を果たしているとの報告がある。最近の研究より、各種消化管癌に特異的に発現する miRNA とその機能について報告されている。miR-96 は RECK の発現を変化させ、腫瘍浸潤に関与することが示されている(Anticancer Res, 38(4):2031-2035, 2018)。しかしながら、既知の報告のほとんどは外科的切除の対象となる浸潤癌を対象としたものであり、内視鏡切除の対象となる早期大腸癌に特異的に発現する miRNA の機能解析についての報告は未だない。

現在のところ早期大腸癌に特異的に発現するバイオマーカーは同定されておらず、miRNA にこれが同定されれば内視鏡切除のみで治癒可能な状態で大腸癌を早期発見可能となり、大腸癌の予後改善に大きく寄与する。また早期大腸癌の抗癌作用に関連する miRNA が同定されれば、新規抗癌剤などの新たな治療法開発の手がかりとなることが期待される。さらに、miRNA の研究は、将来的には癌のみならず、さまざまな疾病の診断、治療、創薬開発を目指したバイオ産業の基盤技術となる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、早期大腸癌に特異的に発現する miRNA の同定を行い、そのキーとなる分子を細胞増殖作用、上皮間葉転換 (EMT) への作用に関して機能解析を行うことである。

3. 研究の方法

2017 年 4 月から 2018 年 3 月にかけて香川大学医学部附属病院で大腸内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) を受けた患者 15 名から、早期大腸癌組織と隣接正常組織のペアサンプルを収集し、以下の解析を行った。

- ・ miRNA のマイクロアレイ解析
- ・ 定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)
- ・ 細胞増殖アッセイ
- ・ Cell Cycle Analysis
- ・ Invasion assays
- ・ western immunoblotting

4. 研究成果

miRNA のマイクロアレイ解析

Human miRNA Oligo Chips (v. 21.0; Toray Industries, Tokyo, Japan)、Gene Scanner 3000 (東レ)を使用し関連する miRNA の変化を網羅的に解析を行った。

定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

アレイ解析で有意な変化を示した miRNA のうち miR-4633-5p、miR-452-5p、miR-887-5p、miR-769-5p、および miR-572 を組織サンプルから抽出した総 RNA から qRT-PCR を行い定量を行った。そのうち、miR-452-5p の発現レベルは、早期大腸癌組織で増加していることが判明した。

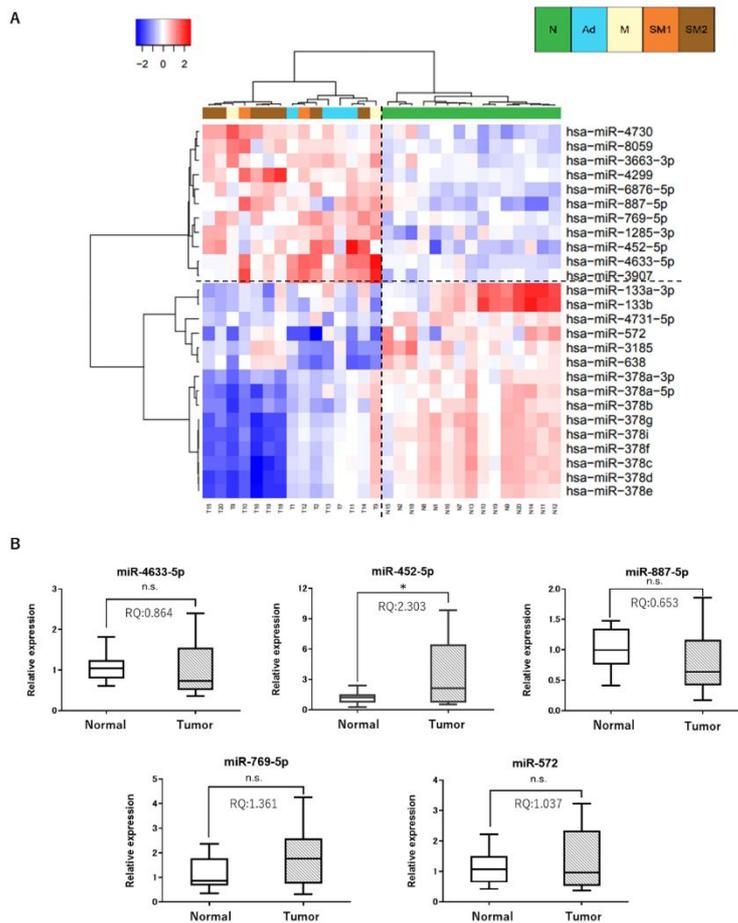


Figure 1

細胞増殖アッセイ

大腸癌細胞株 CACO2 に miR-452-5p mimic を添加し、また HT29 に miR-452-5p mimic inhibitor を添加し細胞増殖アッセイを実施したところ、miR-452-5p は大腸癌細胞を増殖する方向に作用することが判明した。

Cell Cycle Analysis

フローサイトメトリーにより細胞周期の変化を解析した。その結果、CACO-2 細胞では、miR-452-5p が細胞周期の変容を促進することがわかった。一方、HT29 細胞では、統計的な有意性はなかったものの、miR-452-5p 阻害剤が G0/G1 サイクルの割合を増加させた。

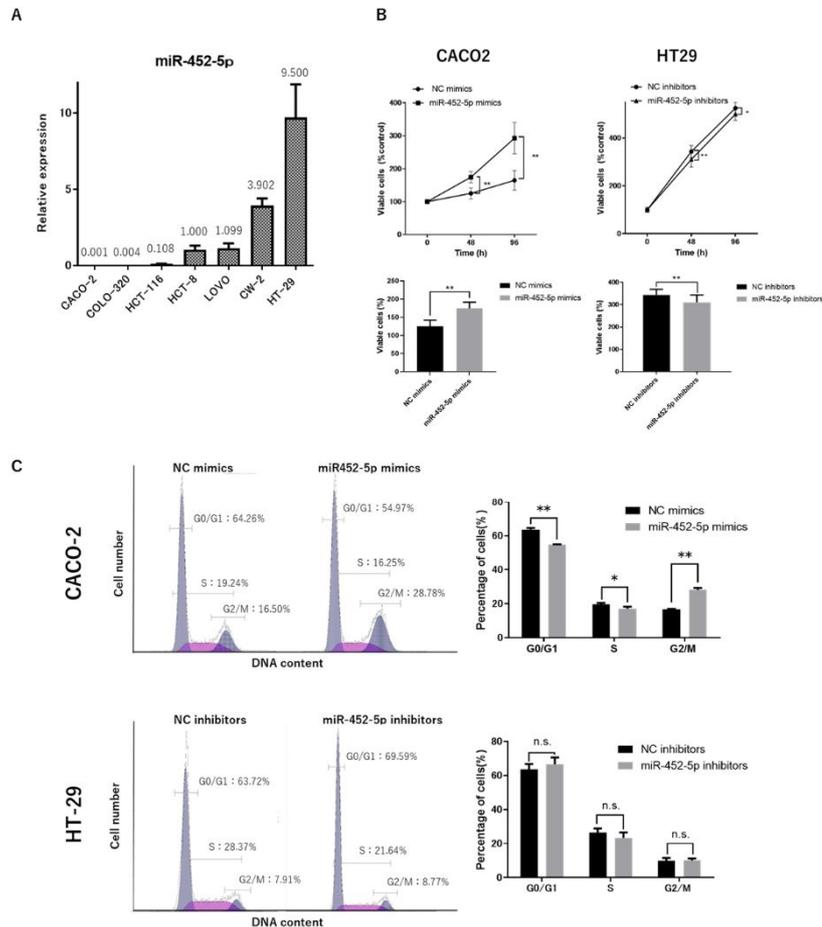


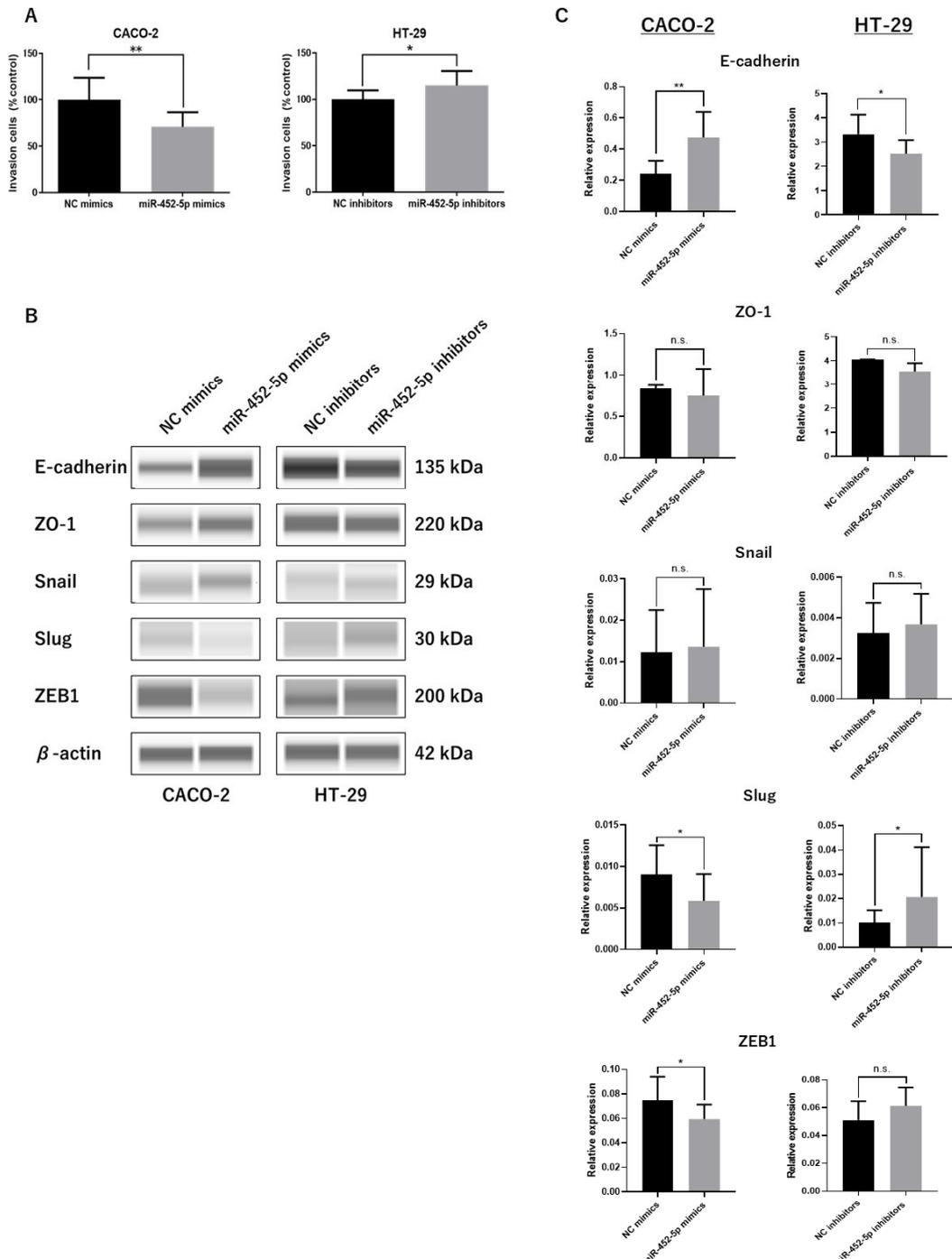
Figure 2

Invasion assays

CACO-2 細胞および HT-29 細胞を用いて、細胞浸潤および EMT 誘導への影響を評価した。CACO-2 細胞の浸潤性は、miR-452-5p mimic のトランスフェクション後に抑制されたが、HT-29 細胞の miR-452-5p 阻害剤のトランスフェクションは逆の効果を示した。

western immunoblotting

EMT 関連タンパク質の発現を評価するためにウェスタンブロッティングを実施すると、miR-452-5p mimic のトランスフェクションは、CACO-2 細胞において Slug の発現レベルを抑制し、E-cadherin の発現を増強した。逆に、HT-29 細胞において miR-452-5p 阻害剤をトランスフェクションすると、逆の効果が検出された。これらの結果は、miR-452-5p が Slug を抑制し、E-カドヘリンの発現を誘導することによって、大腸癌細胞における EMT を抑制することを示唆している。



以上の検討により、miR-452-5p は大腸癌細胞の増殖を促進する一方で、EMT を抑制していた。さらに、miR-452-5p は、ERK 経路の活性化により細胞増殖を促進する一方、Slug の発現抑制と E-cadherin の発現上昇により細胞浸潤を抑制することが明らかとなった。これらの知見は、miR-452-5p が大腸癌の治療標的として機能する可能性を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千代大翔 小原英幹 松井崇矩 小山裕紀子 中谷夏帆 多田尚矢 小塚和博 小林伸也 西山典子 藤原新太郎 谷内田達夫 正木勉
2. 発表標題 早期大腸癌の発生と進展に関するmicroRNAの検討と機能解析
3. 学会等名 第108回日本消化器病総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井 崇矩 小原 英幹 小山 裕紀子 千代 大翔 小塚 和博 多田 尚矢 小林 伸也 藤原 新太郎 西山 典子 谷内田 達夫 正木 勉
2. 発表標題 早期大腸癌における特異的なmicroRNAの検出とその機能解析
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千代大翔
2. 発表標題 ESD検体を用いた早期大腸癌の発生と進展に関するmicroRNAの検討
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井崇矩
2. 発表標題 消化管における translational research 内視鏡治療検体を用いた早期大腸癌の発生と進展に関するmicroRNAの検討
3. 学会等名 第17回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山裕紀子
2. 発表標題 ESD検体を用いた早期大腸癌の増殖に關与するmicroRNAの検討
3. 学会等名 第116回 日本消化器病学会 四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千代大翔
2. 発表標題 早期大腸癌の発生と進展に關与するmicroRNAの検討と機能解析
3. 学会等名 第108回日本消化器病總會
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

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. 本研究に關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