

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462068

研究課題名(和文) CAGE法を用いた大腸癌における新たなリンパ節転移、肝転移予測マーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of novel biomarkers predicting lymph node and liver metastases colorectal cancer with CAGE analysis

研究代表者

奥澤 淳司 (OKUZAWA, Atsushi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00348913

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)：本研究ではCAGE法を用い、転移を伴う大腸がん症例の癌組織における網羅的発現解析を行った。肝転移及びリンパ節転移の有無により、大腸癌原発巣のmRNA発現に差異があった。各転移群から有意に発現上昇、発現低下が見られる遺伝子群を検出し、さらに絞り込みを行った。なお肝転移・リンパ節転移症例で発現亢進している遺伝子群は共通のものの特異的と見られるものが含まれた。今回特定した遺伝子群のマーカーとしての実用により、リンパ節転移、肝転移の早期検出が可能になり、精度の高い医療、臨床応用の確立につながる。

研究成果の概要(英文)：With the cap analysis of gene expression (CAGE), we conducted an exhaustive gene expression analysis in carcinoma tissue of colorectal cancer accompanied by metastases. Between the cases with and without liver metastasis or lymph node metastasis, there were differences in genes of which expression were promoted or suppressed. Some gene expressions were enhanced only in cases with liver metastasis or in those of lymph node, specifically. As a novel biomarker, the clinical application of genes identified in this work will enable us to detect earlier and to predict lymph node and liver metastases in colorectal cancer. It should help to promote clinical diagnosis and medical care of the cancer.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：CAGE法 大腸癌 次世代シーケンサー 腫瘍マーカー 肝転移 リンパ節転移 網羅的発現解析 転移予測

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサー (NGS) 登場以前に完全長 cDNA を作成する技術が開発され、Sanger 法による大規模な cDNA 解析プロジェクトが行われた。この技術のコアとなる手法を用い、理化学研究所によって遺伝子の転写開始点を網羅的に解析する手法である CAGE 法 (cap analysis of gene expression 法) が開発された。

deep CAGE 法を用いた FANTOM4 プロジェクトでは、ヒト単球系細胞株 THP-1 における増殖停止と分化についての転写開始点の使用頻度の動態をゲノム全域にわたり経時的に測定し、重要な転写制御因子、およびその時間依存的な活性と下流の遺伝子を同定した。また siRNA によるノックダウンを体系的に行い、制御ネットワークにおける各因子の役割を確認した。さらに、ヒトゲノムのうち、タンパク質をコードしている部分以外でゲノムの 80% にわたる領域に着目し、ENCODE コンソーシアムが転写領域、転写因子結合領域、クロマチン構造、ヒストン修飾などについて網羅的な解析を行い、遺伝子の発現調節に関する新たな事実が多数発見された。CAGE 法はこのプロジェクトのなかで、転写開始点の定量的解析技術として重要な役割を担った (The ENCODE Project Consortium, Nature 489, 57-74. 2012)。

一方、我々はこれまで大腸癌をはじめとする癌の鋭敏な新規マーカー開発、分子標的治療の可能性を探り研究を進めてきた。とくに大腸癌では転移はリンパ節のほか、肝、肺に多く見られるが、現在は原発巣のみならず、転移巣に対しても内視鏡手術など積極的治療が選択される。転移においても早期発見、早期治療は大腸癌患者の平均余命を向上させると考えられている。しかし現状では転移を検出するための「転移マーカー」は存在しない。そのため一様に抗癌剤投与を施す、あるいは転移が可視的となってから治療が行われるのが現状である。このような事情から転移を予測可能な、あるいは早期に発見するために有効な「転移マーカー」の開発が今後の大腸癌治療の進歩をもたらすものと考えられる。

我々は、先に述べた CAGE 法の適用により、遺伝子の発現を転移有り、無しの 2 群の症例からのサンプル間で比較解析し、転移特異的な遺伝子を特定することで今までに指摘されることのない新たな診断マーカーの開発を行うとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサー (NGS) を用いて大腸癌リンパ節転移、肝転移に関与する遺伝子を突き止め、既存の診断法、治療法よりも精度の高い医療、臨床応用を確立することを目的とした。

CAGE 法を用いて大腸癌リンパ節転移、肝転

移を引き起こしている候補遺伝子を抽出し、リンパ節転移や肝転移の有無を予測するシステムを作成すること、さらにその臨床応用までを目標の範疇とした。

3. 研究の方法

課題 1：大腸癌患者検体に対し、次世代シーケンサーを用いて CAGE 法 (cap analysis of gene expression 法) による解析を行った。リンパ節転移した症例と転移していない症例にわけ、遺伝子発現を比較解析し、リンパ節転移に関わる遺伝子群を抽出した。

課題 2：同様に大腸癌患者検体について、肝転移症例と非肝転移症例にわけ、同様に CAGE 法を用いて 2 群間で比較解析を実施し、肝転移に関わる遺伝子群を抽出した。

同定された遺伝子群のうち、肝転移の有無、リンパ節転移の有無による発現上昇、発現低下遺伝子の比較検証も行った。

4. 研究成果

CAGE 解析の結果、肝転移の有る症例、無い症例の間では、大腸癌の mRNA 発現には差異が見られた。解析を進めた結果、転移群で有意に発現上昇する遺伝子、有意に発現低下がみられる遺伝子群を特定した。

同様の方法で、リンパ節転移においても同様に大腸癌の mRNA 発現には転移のある症例・ない症例間で有意な差異を認め、RNA 発現の発現が有意に上昇する遺伝子、低下する遺伝子群が検出された。

これらの遺伝子を同定し、肝転移群特異的マーカー、リンパ節転移特異的マーカーの候補となる遺伝子を特定した。

このうち肝転移特異的マーカーについては高発現のみられる頻度を検討し、大腸癌転移に特異的な遺伝子の絞り込みを行った。

肝転移・リンパ節転移特異的発現亢進遺伝子群は一部は共通性を持つものの、それぞれに特異的と見られるものも含まれていた。

なお転移群で発現量の低い遺伝子については、亢進遺伝子群にくらべ、少数であるものの、転移抑制に関わる新規遺伝子を含む可能性もあり、今後の研究課題となる。

今回新たに特定した転移マーカー遺伝子については、論文としての公表の準備を行うほか、知財取得のため特許申請も行っている。一方、この成果をもとに大腸癌のリンパ節転移マーカー判定キットの開発も検討している。

今回検出した大腸癌の肝転移・リンパ節転移マーカーは、病巣と転移による所見に依存した既存の stage 分類とは異なり、生検の遺伝子検査を含めた転移予測からの新規な指標作成に役立つものであり、今後の研究進展によりさらなる治療法の進歩・創薬などが期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kawai M,[†] Komiyama H,^{*†} Hosoya M, Okubo H, Fujii T, Yokoyama N, Sato C, Ueyama T, Okuzawa A, Goto M, Kojima Y, Takahashi M, Sugimoto K, Ishiyama S, Munakata S, Ogura D, Niwa S, Tomiki Y, Ochiai T, Sakamoto K: Impact of chromosome 17q deletion in the primary lesion of colorectal cancer on liver metastasis. *Oncology Letters* (査読有), 11, 2016. (in press)

<https://www.spandidos-publications.com/ol>

*Corresponding author, [†]These authors contributed equally to this work.

Yamaga R, Ikeda K, Kawai J et al: Systemic identification of estrogen-regulated genes in breast cancer cells through cap analysis of gene expression mapping. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 447(3), 531-536, 2014.

DOI:10.1016/j.bbrc.2014.04.033

Munakata S, Tashiro Y, Nishida C, Sato A, Komiyama H, Shimazu H, Dhahri D, Salama Y, Eiamboonsert S, Takeda K, Yagita H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Sakamoto K, Heissig B, Hattori K:

Inhibition of plasmin protects against colitis in mice by suppressing matrix metalloproteinase 9-mediated cytokine release from myeloid cells.

Gastroenterology (査読有), 148(3): 565-578, 2015.

DOI:10.1053/j.gastro.2014.12.00

Andersson R, Gebhard C, Kawai J et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* (査読有), 507(7493), 455-461, 2014.

DOI:10.1038/nature12787

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H, Takahashi M, Ishiyama S, Niwa K and Okubo H:

Efficacy of postoperative adjuvant chemotherapy according to prognostic factor in patients with Stage III colon cancer. *Journal of Cancer Therapy* (査読有), 5: 806-816, 2014.

DOI:10.4236/jct.2014.58088

Takahashi M, Niwa K, Ishiyama S, Sugimoto K, Komiyama H, Yaginuma Y, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y, Sakamoto : An effective 5-fluorouracil, levofolinate, and oxaliplatin therapy for recurrent breast cancer: a case report. *J*

Med Case Rep (査読無), 8: 1-6, 2014

DOI: 10.1186/1752-1947-8-234

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H: The validity of predicting prognosis by lymph node ratio in node-positive colon cancer. *Dig Surg* (査読有), 30: 368-374, 2013.

DOI:10.1159/000355444

Nagayasu K, *Komiyama H, Ishiyama S, Ogura D, Takahashi R, Tashiro Y, Niwa K, Sugimoto K, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Niwa S, Sakamoto K:

Investigation of free cancer cells in peripheral blood using CEA mRNA expression in perioperative colorectal cancer patients. *Mol Clin Oncol* (査読有), 1: 668-674, 2013. *corresponding author. DOI: 10.3892/mco.2013.109

〔学会発表〕(計 11 件)

(国際学会)

Sugimoto K, Sakamoto K, Tomiki Y, Goto M, Kojima Y, Komiyama H, Takahashi M, Kamiyama H, Ishiyama S, Niwa K, Ito S, Kawai M, Takehara K, Tashiro T, Munakata S, Aoki J, Okazawa Yu O, Takahashi R, Mizukoshi K, Ro H, Ichikawa R, Kure K, Honjyo K, Tsukamoto R: Comparisons of long-term outcomes for locally advanced colon cancer between laparoscopic colectomy and open colectomy; propensity score analysis 23th International Congress of the EAES. 2015年06月03日~2015年06月06日, Bucharest, Romania.

Sugimoto K, Humbert A, Lu Z, Chen C, Rodgers K, Lee, B Griffin C, Sato K, Orita H, Ito T, Komiyama H, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Sakamoto K, Brock M: CHFR methylation is an independent prognostic marker of poor prognosis in gastric cancer. AACR Annual Meeting 2015. 2015年04月18日~2015年04月22日, Pennsylvania, USA.

(国内学会)

呉 一真, 細谷 理樹, 塚本 亮一, 伊藤 慎吾, 本庄 薫平, 岡澤 裕, 水越 幸輔, 宗像 慎也, 石山 隼, 杉本 起一, 神山 博彦, 小見山 博光, 高橋 玄, 柳沼 行宏, 小島 豊, 五藤 倫敏, 奥澤 淳司, 富木 裕一, 坂本 一博, 大永 崇: Polymeric CTC-chipを用いた大腸癌 CTC の検出. 第116回日本外科学会定期学術集会. 2016年04月14日~2016年04月16日, 大阪

Okazawa Y, Mizukoshi K, Komiyama H, Fujii T, Goto M, Hino O, Sakamoto K, Orimo A: Patient-derived colon carcinoma cells disseminate into distant organs in various different fashions. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月08日~2015年10月10日, 名古屋

吳一眞, 細谷理樹, 小見山博光, 富木裕一, 落合匠, 大永崇, 坂本一博: The detection of colorectal CTC by the use of polymeric microfluidic devices. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月08日~2015年10月10日, 名古屋

河合雅也, 小見山博光, 吳一眞, 本庄薫平, 盧尚志, 岡澤裕, 高橋里奈, 水越幸輔, 高原一裕, 宗像慎也, 丹羽浩一郎, 石山隼, 杉本起一, 神山博彦, 高橋玄, 柳沼行宏, 小島豊, 五藤倫敏, 富木裕一, 坂本一博: Comparative Genomic Hybridization (CGH) を用いた大腸がんの肝転移と予後因子の検討. 2014 JDDW 第56回日本消化器病学会大会 2014年10月23日~2014年10月26日, 神戸

高橋里奈, 吳一眞, 本庄薫平, 盧尚志, 青木順, 岡澤裕, 水越幸輔, 河合雅也, 高原一裕, 宗像慎也, 石山隼, 杉本起一, 小見山博光, 高橋玄, 柳沼行宏, 小島豊, 五藤倫敏, 奥澤淳司, 富木裕一, 坂本一博: 大腸癌における血清 p53 抗体の検討. 2014 JDDW 第12回日本消化器外科学会大会 2014年10月23日~2014年10月26日, 神戸.

Mizukoshi K, Okazawa Y, Komiyama H, Fujii T, Ito Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A: The development of gross hepatic and pulmonary metastases in a patient-derived colorectal tumor xenograft model. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月03日~2013年10月05日, 横浜.

杉本起一, 河合雅也, 小見山博光, 市川亮介, 本庄薫平, 吳一眞, 盧尚志, 伊藤慎吾, 細谷理樹, 藤井智明, 大久保はるな, 柳沼行宏, 奥澤淳司, 富木裕一, 坂本一博: 大腸癌における染色体異常を指標とした肝転移と予後の比較解析. 第24回日本消化器癌発生学会総会 2013年09月05日~2013年09月06日, 金沢.

河合雅也, 小見山博光, 高橋里奈, 杉本起一, 神山博彦, 小島豊, 五藤倫敏, 奥澤淳司, 富木裕一, 坂本一博: CGH による大腸がん原発巣ゲノム変異と肝転移および予後に関する検討. 第68回日本消化器外科学会, 2013年07月17日~2013年07月19日, 宮崎.

〔図書〕(計 1件)

Pascarella G, Lazarevic D, Kawai J et al: NanoCAGE analysis of the mouse olfactory epithelium identifies the expression of vomeronasal receptors and of proximal LINE elements. In: Pizzorusso T et al eds. Regulatory RNAs in the Nervous System: Frontier in Cellular Neurosciences. pp122-131. 2015. (分担執筆)
DOI: 103389/fncel.2014.00041.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: 大腸がんの転移又は再発リスクの評価方法
発明者: 小見山博光, 坂本一博, 奥澤淳司, 塩澤学, 赤池信, 宮城洋平, 大津敬, 林崎良英, 伊藤昌可, 川路英哉, 大宮寛子
権利者: 学校法人順天堂,
地方独立行政法人神奈川県立病院機構,
独立行政法人理化学研究所
種類: 特許
番号: 特願 2014-017945
出願年月日: 2014年01月31日
国内外の別: 国内

名称: 患者原発性大腸癌の個別化転移モデルマウスの作製方法
発明者: 折茂彰, 水越幸輔, 岡澤裕, 五藤倫敏, 小見山博光, 樋野興夫, 坂本一博
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特許
番号: 特願 2013-193525 特開 2015-057974
出願年月日: 2013年9月18日
公開年月日: 2015年3月30日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ
順天堂大学 下部消化管外科
<http://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/daicho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
奥澤 淳司(OKUZAWA ATSUSHI)
順天堂大学 医学部 准教授
研究者番号: 00348913

(2) 研究分担者
小見山 博光 (KOMIYAMA HIROMITSU)
順天堂大学 医学部 講師
研究者番号: 30348982

(3) 研究分担者
河合 純 (KAWAI JUN)
(独)理化学研究所プロジェクトディレクター
研究者番号: 30391923