

令和元年6月27日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10035

研究課題名(和文) CAGE結果を用いた血中microRNAの大腸がん抗がん剤感受性判定マーカー開発

研究課題名(英文) Searching for miRNA as a biomarker in blood colorectal cancer in blood to evaluate sensitivities against chemotherapies for colorectal cancer

研究代表者

高橋 玄 (TAKAHSHI, Makoto)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40445549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌の血中腫瘍マーカー候補としてのmicroRNAの抽出・特定を目的として、同一患者の治療適応前後のマイクロアレイ解析を行い、比較解析を行った。報告者らのグループにて既に保存してあった大腸がん患者の検体を用いることでこの比較解析が可能となった。本研究ではstageごとに症例を選抜したうえでRNAを抽出し、microRNAの解析を行い、大腸癌診断マーカー候補となるmicroRNAを同定した。このマーカー候補の発現の変動に着目し治療効果との対照を進めている。本研究結果から、血中microRNAの新たな診断マーカー、治療効果判定因子としての臨床応用可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長らく抗がん剤治療の有効率が他の癌に比べると低かった大腸がんであったが、近年、抗腫瘍効果の高い分子標的薬の開発により飛躍的に治療選択肢が増えた。しかし既存のCEAや CA19-9, p53抗体などの大腸がんマーカーでも採血のみでがんを診断することは難しく早期診断は困難である。したがって、様々な抗がん剤を含む幅広い選択肢から最適な治療選択を行うための指標となる高い診断力を持ったマーカーの新規開発が望まれる。本研究では採血サンプルから早期を含む大腸がんの検出が可能な新規マーカーmiRNAを同定した。今後の研究進展によって採血による大腸がん早期診断、また治療効果判定への臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To identify microRNA in blood, as a tumor marker of colon cancer, we analyzed comparison before and after the treatment adaptation of the same patient with microarray analysis using blood samples. We used stored samples of cases in a particular stage and pathophysiological status selected from a considerable number of colorectal cancer cases in our hospital. A microRNA detected a significantly higher level of expression in blood before surgery than that after surgery. To verify its efficiency as a diagnostic marker and a therapeutic effects marker, the level of this miRNA in blood before and after surgery or chemotherapy and also those in various stages of cases are analyzing.

研究分野：消化器外科学, 腫瘍外科学

キーワード：腫瘍マーカー 抗がん剤感受性 大腸がん マイクロRNA 血中RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは、日本人のがん死亡要因 3 位 (女性 1 位, 男性 3 位) である。昨今の食文化の欧米化に伴い日本人の大腸がんは増えてきた。その一方で大腸がんの検診等での検出率は依然低く、このことが死亡率の下がらない要因でもある。大腸がんをより容易に高確率で発見するシステムの確立が求められるが、未だに腫瘍マーカーと呼ばれるものの検出率は低く、同時に 3 種類 (CEA, CA19-9, 抗 p53 抗体) のマーカーを検査した場合でも低い。

近年同定が進んでいる non-coding RNA の中でも、短鎖 RNA とりわけ miRNA は遺伝子の転写後調節を行う重要な調節因子である。ヒトゲノムには 2500 程度の miRNA がコードされ、現在このほぼ全てが把握されているといわれる。近年血中 miRNA の臨床応用が期待され、大腸癌をはじめとする癌に対し診断マーカー、転移検出マーカー - 候補として様々な miRNA が報告されているが、大腸癌転移「予測」判定マーカーとして臨床利用可能なものは見当たらない。

我々は、大腸癌の機序解明、腫瘍マーカーの開発を目的に網羅的遺伝子研究を行ってきた。ゲノム、遺伝子、遺伝子発現レベルでマーカー研究、開発を試みた結果、大腸がんのリンパ節、肺、肝転移と遺伝子・ゲノム異常の相関性を確認 (Yaginuma et al.: J Int Med Res. 34: 390-396, 2006; Unotoro et al.: J Int Med Res. 34: 397-405, 2006)。血中循環癌細胞 (CTC) による大腸癌の診断法の開発を行った。

かねてより着目しており CEAmRNA 発現を指標とした大腸癌診断の有用性を報告した (Nagayasu, Komiyama et al, 2013)。また大腸癌の stagell の患者のうちリンパ管浸潤などのない低リスクのグループを選出し、術後より術前に有意に発現レベルが高い 2 つの miRNA 分子を特定、大腸がん組織で特異的高発現していることを確認、早期大腸癌診断マーカー候補とした。

以上の経緯から報告者らは大腸癌のステージ、病態を厳選し検体を用いる方法によって、大腸がんの早期検出・治療効果判定を可能にする新規腫瘍マーカーを同定することが可能と考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸癌の診断及び治療における新たなマーカーとしての microRNA を特定することであり、臨床応用と第一義としている。これにおいては、stage 分類などを用いた臨床分類による各段階での各 miRNA の抽出によって、新たな診断、治療効果判定マーカーとしての可能性、及び、治療の効果判定因子として可能性を明らかにしていく。大腸癌患者の血中 miRNA の分析により早期診断を行い、また各種治療の効果を適切に評価し、治療方法などを適切に選択することが可能になれば、これまで以上の治療効果を期待できる。

3. 研究の方法

順天堂大学において取得・保管している症例の癌組織検体また採血検体には大腸癌、転移性肺・肝癌患者が含まれている。本研究ではマーカーのターゲットとなる病態をもつ症例・組織と比較すべき組織、また症例を厳選して比較することによる候補遺伝子の絞り込みを徹底し、結果を比較することによって進めた。

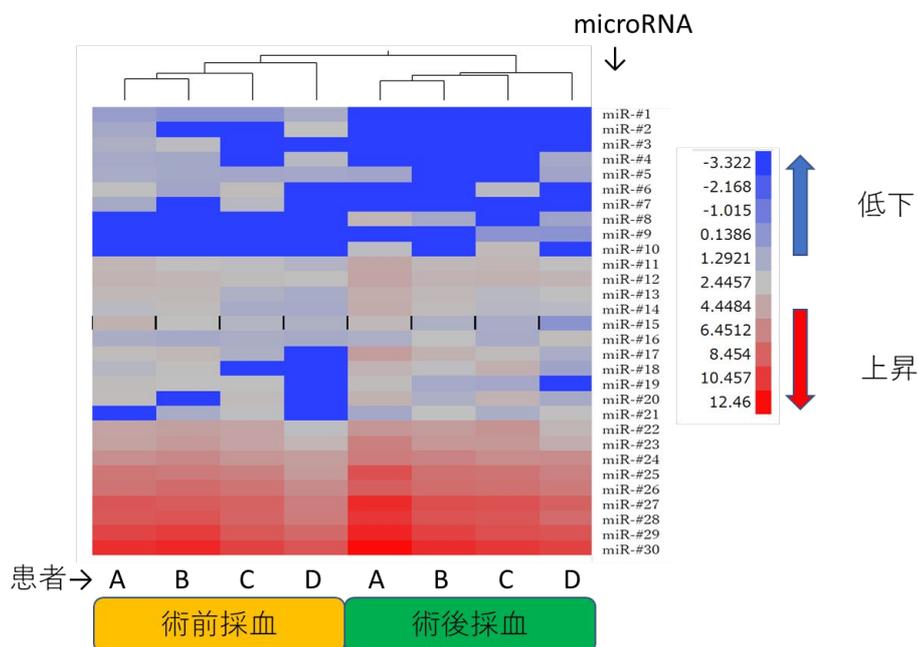


図 1 手術前後で血中での量が変動する miRNA の探索。
複数の miRNA で術後の有意な発現レベル低下がみられる。
図の上から 1 番目 (#1: $p=0.00122$, Paired t test)
2-8 番目 (#2-#8: $p<0.05$, 同)

網羅的発現解析に取り組み、肝転移をもつ症例、持たない症例での大腸がんについて解析、発現プロファイリング、遺伝子解析を行い、転移のない患者特異的、また肝転移患者に特異的に転写亢進している遺伝子などを選抜した。

本研究では特に、大腸癌患者において特定の Stage の症例を選抜し、症例ごとの検体を解析に用いた。大腸癌の血中腫瘍マーカー候補としての microRNA の抽出・特定を目的として、同一患者の治療適応前後のマイクロアレイ解析を行い、比較解析を行った。報告者らのグループにて既に保存してあった大腸がん患者の検体を用いることでこの比較解析が可能となった。

こうして絞り込んだ特定 Stage、臨床の分類ごとに比較解析することで大腸癌のリンパ節転移、肝転移についてどの miRNA がリスクマーカーとして変動するのか、評価を行った。

4. 研究成果

本研究では stage ごとに症例を選抜したうえで RNA を抽出し、microRNA の解析を行い、大腸癌診断マーカー候補となる microRNA を同定した。

マーカーを特定するためには、大腸癌を発生させる要因と、二次的な病態や転移などを引き起こす要因を分離する必要がある。これまで腫瘍マーカーとして報告されている miRNA の多くは、初期のがんをもつ患者血中では比較的濃度が低く Stage が進むにつれ増大する傾向が報告されているものの、転移特異的とされるマーカーは知られていない。まして早期の癌に特徴的なマーカー-miRNA は皆無である。

本研究では、Stage II 症例から遺伝的要因などのリスク要因をもたない症例徹底的に絞り込み、ターゲットとなる病態特異的なマーカーの探索を試みた。

まず大腸癌の Stage II 患者検体を選抜した。この患者グループの手術前後の血中 miRNA の発現レベルを比較し、手術後に有意にレベルが低下する miRNA をマーカー候補 A,B として選び出した。これらの miRNA は患者癌組織において非癌組織よりも高発現していることを免疫染色によって確認された。すなわち血中のマーカー候補 miRNA は Stage 特異的とはされておらず、大腸癌由来であると推測された。

大腸癌 stage I ~ IV の患者血清と健康なヒト血清中の miRNA を測定したパブリックデータを用い miRNA A,B (図 1 の #1, #15) のレベルをそれぞれ比較した。その結果 miRNA A は、健康者の血清に対し大腸癌患者(全 Stage のプール)で有意に高かった。また Stage I の患者で特に発現レベルが高い傾向がみられた。すなわちこの miRNA A を早期腫瘍診断マーカーとして同定した (Tsukamoto, Takahashi, Komiyama et al 投稿中)。

報告者らは引き続き、肝転移をもつ大腸癌患者を選抜し、特異的に高発現である miRNA の探索を進めている。

また大腸癌全般にて高発現している miRNA のリストから、今回初期診断マーカーとした miRNA、さらに有意ではないものの手術前検体で高発現傾向がうかがわれた miRNA を除外した残りの中にも有用なマーカー-miRNA が存在する可能性も考えられる。

このほか様々な Stage、病態特異的な検体の解析を企図している。

このマーカー候補の発現の変動に着目し治療効果との対照を進めている。本研究結果から、血中 microRNA の新たな診断マーカー、治療効果判定因子としての臨床応用可能性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

1. Okazawa Y, Mizukoshi K, Koyama Y, Okubo S, Komiyama H, Kojima Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A: High-sensitivity detection of micrometastases generated by GFP lentivirus-transduced organoids cultured from a patient-derived colon tumor. *Journal of Visualized Experiments* 136: e57374, 2018 (査読有)
2. Sakamoto K, Takahashi M, Takahashi R, Kawano S, Kawai M, Sugimoto K, Kamiyama H, Kojima Y, Okuzawa A, Tomiki Y: Repeated laparoscopic resection of extra-regional lymph node metastasis after laparoscopic radical resection for rectal cancer. *J Minim Access Surg*, 14(2):146-148, 2018 (査読有)
3. Kamiyama H, Niwa K, Ishiyama S, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Higashihara Y, Sakamoto K: Ascending Colon Cancer Associated with Dermatomyositis Which Was Cured after Colon Resection. *Case Rep Gastroenterol* 10(2):338-43, 2016 (査読有)
4. Suehara Y, Akaike K, Mukaihara K, Kurisaki-Arakawa A, Kubota D, Okubo T, Mitomi H, Mitani K, Takahashi M, Toda-Ishii M, Kim Y, Tanabe Y, Takagi T, Hayashi T, Mogushi K, Kaneko K, Yao T, Saito T: KCTD12 is negatively regulated by Kit in gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget* 9(43): 27016-27026, 2018 (査読有)
5. Yamaguchi S, Takahashi S, Mogushi K, Izumi Y, Nozaki Y, Nomizu T, Kakugawa Y, Ishida T, Ohuchi N, Ishioka C, Kato S: Molecular and clinical features of the TP53 signature

gene expression profile in early-stage breast cancer. *Oncotarget*. 9(18): 14193-14206, 2018 (査読有)

6. 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: Chromosome 17q deletion in the primary lesion of colorectal cancer has an impact on liver metastasis. *Oncology Letters* 12: 4773-4778, 2016 (査読有)
7. Honjo K, Kure K, Ichikawa R, Ro H, Takahashi R, Niwa K, Ishiyama S, Sugimoto K, Kamiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Sakamoto K, Fukumura Y, Takashi Yao T: Two cases of rectal NETs resection combined with dissection of the circular muscle layer using the ESD technique *Case Rep Gastroenterol*, 10:693-700, 2016 (査読有)
8. Sugimoto K, Sakamoto K, Niwa K, Ishiyama S, Kamiyama H, Komiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y: Postoperative adjuvant chemotherapy improves survival in stage II colon cancer? A propensity score matching analysis. *Juntendo Medical Journal* 62(6): 463-471, 2016 (査読有)
9. Kamiyama H, Niwa K, Ishiyama S, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Higashihara Y, Sakamoto K: Ascending colon cancer associated with dermatomyositis which was cured after colon resection. *Case Rep Gastroenterol*.10(2):338-43, 2016 (査読有)

[学会発表](計14件)

1. Shun Ishiyama, Kota Amemiya, Yuki Tsuchiya, Hirokazu Matsuzawa, Shingo Kawano, Masaya Kawai, Koichiro Niwa, Kiichi Sugimoto, Hirohiko Kamiyama, Makoto Takahashi, Hiromitsu Komiyama, Yutaka Kojima, Atsushi Okuzawa, Yuichi Tomiki, Tetsu Fukunaga, Yoshiaki Kajiyama, Seiji Kawasaki, Kazuhiro Sakamoto: Complete mesocolic excision for transverse colon in our hospital. *Sages & Cages 16th World Congress of Endoscopic Surgery*, Seattle, WA, USA, 2018
2. Hirokazu Matsuzawa, Kichi Sugimoto, Shun Ishiyama, Hirohiko Kamiyama, Makoto Momiya, Yutaka Kojima, Yuichi Tomiki and Kazuhiro Sakamoto: The significance of plasma p14 gene dna methylation in colorectal cancer. *The 29th ISUCRS Biennial Congress*, 2018
3. Kamiyama H, Yoshida Y, Yoshida H, Kosugi C, Ishibashi K, Ihara K, Takahashi M, Kuramochi H, Fukazawa A, Sonoda H, Yoshimatsu K, Matsuda A, Yamaguchi S, Ishida H, Hasegawa S, Yamada T, Sakamoto K, Koda K: The Combination of TAS-102 and Bevacizumab as the third line chemotherapy for metastatic colorectal cancer (TAS-CC3 Study). *ESMO 2018 Congress*, 2018
4. 杉本 起一, 牧野 有里香, 青木 順, 岡澤 裕, 水越 幸輔, 河合 雅也, 宗像 慎也, 石山 隼, 神山 博彦, 高橋 玄, 小島 豊, 富木 裕一, 福永 哲, 梶山 美明, 坂本 一博: 大腸癌における血漿中遊離DNAのCHFR遺伝子メチル化測定の意義(英語) 第56回日本癌治療学会学術集会 2018年
5. 深谷 緑, 小見山 博光, 杉本 起一, 神山 博彦, 益子 高, 坂本 一博 SLC7A1に対するモノクローナル抗体 大腸癌組織における遺伝子発現評価と、抗体の癌細胞株に対する傷害活性(Monoclonal antibodies against SLC7A1: assessment of gene expression and cytotoxicity in colorectal cancer) 第77回日本癌学会学術総会 2018
6. Sugimoto K, Tsuchiya H, Hagiwara T, Matsuzawa H, Makino Y, Motegi S, Tsukamoto R, Kawai M, Kawano S, Niwa K, Ishiyama S, Kamiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Tomiki Y, Sakamoto K: The prognostic capability of oxidative stress after surgery in colorectal cancer. *The 21th Asian Congress of Surgery*, Tokyo, Japan, Nov 22, 2017
7. Fukaya M, Komiyama H, Sugimoto K, Kamiyama H, Sakamoto K: Production of monoclonal antibodies against amino acid transporter SLC7A1 to develop novel therapy for colorectal cancer. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017
8. Tsukamoto R, Matsuzawa M, Hagiwara T, Tsuchiya Y, Amemiya K, Motegi S, Makino Y, Kawano S, Honjo K, Kure K, Ichikawa R, Ro H, Ito S, Takahashi R, Niwa K, Ishiyama S, Sugimoto K, Kamiyama H, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y, Fukunaga T, Kajiyama Y, Kawasaki S, Sakamoto K: Postoperative Adjuvant Chemotherapy Improves Survival in Stage II Colon Cancer ? a Propensity Score Matching Analysis. *110th AACR*, Washington DC, 2017
9. Kawano S, Amemiya K, Tsuchiya Y, Hagiwara T, Matsuzawa H, Makino Y, Motegi S, Tsukamoto R, Ichikawa R, Kure K, Honjo K, Ro H, Ito S, Okazawa Y, Takahashi R, Mizukoshi K, Kawai M, Munakata S, Niwa K, Ishiyama S, Sugimoto K, Kamiyama H, Komiyama H, Takahashi

M, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y, Kojima M, Ochiai A, Sakamoto K: Semaphorin 3C has a possibility of a new prognostic marker in colorectal cancer. 110th AACR, Washington DC, April 3, 2017

10. 吳 一眞・細谷理樹・大久保はるな・植山孝恵・深谷 緑・杉本起一・富木裕一・大永 崇・小見山 博光・坂本一博 ポリマー製マイクロ流体チップを用いた大腸癌における CTC の検出 第1回 Liquid Biopsy 研究会(東京) 2017
11. 深谷 緑・小見山博光・塚本亮一・水越幸輔・岡澤 裕・坂本一博 SLC7A1: A cationic amino acid transporter as a potential target for colorectal cancer therapy. 第75回日本癌学会学術総会(横浜) 2016年.
12. Okubo S, Mizukoshi K, Okazawa Y, Haeno H, Komiyama H, Saeki H, Ito Y, Gotou M, Watanabe S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A: Multicellular tumor clusters seed metastases in colon patient-derived tumor xenografts. 第75回日本癌学会学術総会, 2016
13. Kojima Y, Sakamoto K, Tomiki Y, Okuzawa A, Goto M, Takahashi M, Kamiyama H, Ishiyama S, Sugimoto K, Niwa K, Takahashi R, Ichikawa R, Honjo K, Ro H, Tsukamoto R, Motegi S: Extraperitoneal sigmoid colostomy after abdominoperineal resection for rectal cancer in our hospital. 15th World Congress of Endoscopic Surgery, Suzhou & Shanghai, China, 2016
14. Ro H, Hagiwara T, Amemiya K, Makino Y, Kure K, Takahashi R, Mizukoshi K, Kawano S, Niwa K, Ishiyama S, Takahashi M, Kojima Y, Goto M, Tomiki Y, Sakamoto K: Investigation of colorectal cancer surgery in elderly patients aged 80 and over 15th World Congress of Endoscopic Surgery, Suzhou&Shanghai, China, 2016

〔その他〕

ホームページ

順天堂大学下部消化管外科学(消化器外科学講座)

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab0/kabusyoukakan/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小見山 博光

ローマ字氏名：KOMIYAMA, Hiromitsu

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部 消化器外科学講座(下部消化管外科学)

職名：非常勤講師

研究者番号：30348982

研究分担者氏名：加藤 俊介

ローマ字氏名：KATO, Shunsuke

所属研究機関名：順天堂大学大学院

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号：40312657

研究分担者氏名：茂柳 薫

ローマ字氏名：MOGUSHI, Kaoru

所属研究機関名：順天堂大学大学院

部局名：医学系研究科

職名：非常勤講師

研究者番号：60569292

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。