

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：31201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K10646
研究課題名(和文) 大腸癌の予後に関連するnon-coding RNA FTXに関する検討

研究課題名(英文) Noncoding RNA FTX expression in colorectal cancer

研究代表者

秋山 有史 (Yuji, Akiyama)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：10405798

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)：FTXはX染色体の不活化を誘導するXISTの近傍Xq13.2に存在するlong intervening (intergenic) noncoding RNAである。大腸癌組織では正常組織に比較し有意にFTX mRNA発現が高く、FTX高発現患者は低発現患者に比べ有意に予後不良であり、大腸癌悪性度に関連することが示唆された。大腸癌原発巣の3か所より組織採取し、網羅的遺伝子変異解析・タンパク発現解析を行い腫瘍内heterogeneityを明らかにし、これとFTX発現を比較するシステムを構築した。digital PCRでは微量発現検出さらに部位別の発現差も確認可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では大腸癌原発巣のmulti region samplingを行い、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析、逆相タンパクライゼートアレイによるタンパク発現解析を行い、これらの問題点を考察した。少数か所のsampling、比較的少数の変異でも進化過程の初期に生じたtrunk mutationと後期に加わってきたと考えられるbranch mutationと時間的情報を確認でき、これに対応するRNA/タンパク発現を評価することができた。また予後不良大腸癌で異常を示すnoncoding RNAであるFTXを対象としてdigital PCRを用いたmRNA微量発現を定量するシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)：Ftx partially escapes X-inactivation and is upregulated specifically in female ES cells at the onset of X-inactivation, an expression profile which closely follows that of Xist. In adult tissues, FTX expression level was low and its function was not understood. This study aimed to clinical and biological significance of FTX expression in colorectal cancer. FTX expression in colorectal cancer was higher than normal mucosa. Patients with high FTX expression showed significant poorer prognosis compared to patients with low FTX expression. Multiregional regional mutation screening and proteomic analysis revealed heterogeneity in colorectal cancer. FTX mRNA expression could not be detected in most colorectal cancer tissues by real time PCR. Digital PCR analysis revealed the slight difference of FTX expression among multi regions of colorectal primary tumors, even in cases with negative for FTX expression by real time PCR.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 noncoding RNA FTX

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在本邦において、大腸癌は罹患率 1 位のがんであるが、その約 15%は発見時に Stage IV の状態である。癌に関連する多くの遺伝子異常の解明から多くのバイオマーカーや治療薬が開発されてきたが、大腸癌の発生・進展に関与する新たな分子、メカニズムの解明は大腸癌治療に貢献するものと思われる。タンパク質をコードする遺伝子領域以外の非コード DNA 領域の割合はヒトでは全ゲノムの 98%にも達するが、その大半が non-coding RNA に転写されている。20 塩基前後の小分子 RNA である microRNA はヒトでは 1000 種類以上存在するが、標的遺伝子の転写を制御し癌に関連する microRNA も多数見出されてきた。一方、200 塩基以上の非コード長鎖 RNA (Long non-coding RNA)のうちエクソン構造を持ち、スプライシング/poly A 付加を受けるものは long intervening (intergenic) noncoding RNA (lincRNA)と呼ばれている。ほとんどの lincRNA は機能未知であるが、近年いくつかの lincRNA が、分化、がん化、アポトーシスや細胞老化といった細胞運命決定において、重要な役割を担っていることがわかってきた。乳癌では lincRNA の一つである Hox Transcript Antisense Intergenic RNA (*HOTAIR*)がポリコム抑制複合体と結合し転移抑制に関連する遺伝子群の発現を抑制し、不良な予後に関与することが報告されている (Gupta RA, et al. Nature 2010)。その後も *ANRIL*, *PANDA* など続々と癌に関連する lincRNA が同定されている。lincRNA の機能としては、転写因子や microRNA、mRNA との結合による制御やリボ核タンパク質(RNP)の構成、クロマチン修飾に関与するものなどが示されている。われわれは大腸癌においても *HOTAIR* 発現が不良な予後に関連することを示したが (Kogo R, et al. *Cancer Res* 2011)、さらに大腸癌予後に関連する新たな lincRNA の同定を試みている。

先行研究では、予後情報のある public データベース上の 320 例の Stage II/III 大腸癌のマイクロアレイのデータセット (GSE24551)を用い、タンパク非コード領域の各アレイプローベの発現状況と大腸癌予後の関連を、現在予測される 8650 個の non-coding RNA について網羅的に解析した。約 200 個の大腸癌の予後に相関する候補 lincRNA が見出されたが、さらに領域内での共発現プローベ数、Exon/intron 構造を有する、poly A tail を有することなどの条件から絞り込みを行い、大腸癌予後に強い関連を示す lincRNA 182 (*FTX*)を同定した (図 1)。

FTX は X 染色体の不活化を誘導する *XIST* の近傍 Xq13.2 に存在する。*XIST* は女性において 2 本ある X 染色体の一本を不活化し、分化や生命維持に重要なものを含む約 1500 個の X 染色体上の遺伝子の発現量を男性と同レベルに保つ働きをもつ lincRNA である。*FTX* は発生・分化の過程で *XIST* 発現を調節していることが報告されているが、詳細な機能は不明である。Xq13.2 には *FTX* を含め *XIST*, *TSIX*, *JPX* という 4 つの lincRNA が存在している。保有する 128 症例の大腸癌検体から *FTX* RNA 発現を検討したところ正常大腸粘膜ではほとんど発現が見られなかったが、大腸癌組織では有意な発現上昇が見られた (図 2)。また、*FTX* 高発現群では低発現群に比べ有意に予後不良であり、public データベースからの解析結果と矛盾しない結果であった。以上から lincRNA *FTX* は大腸癌の予後にかかわる重要な分子であることが示唆された。

2. 研究の目的

ゲノムの 98%をしめるタンパク非コード領域から大量の転写産物が生成されるが、そのほとんどはかつてはジャンクと考えられていた。近年の研究で機能を有するいくつかの lincRNA 存在が示されたが、ヒトで存在が予想されている 10,000 種以上 lincRNA のほとんどが未だ機能不明である。大腸癌における lincRNA 研究は特色ある研究である。*FTX* は X 染色体上に存在する。性染色体上の遺伝子は性差もあり癌での異常について詳細に研究されているものは少ない。女性の片方の X 染色体を不活性化する lincRNA である *XIST* の周囲には複数の lincRNA が存在し作用しあっていると考えられる。しかし大腸癌症例の検討では、*XIST* が男性では全く発現が見られないものの *FTX* には性差が見られず、*FTX* が *XIST* とは独立して大腸癌進展に寄与していることが予想される点も興味ぶかい先行研究では lincRNA *FTX* が大腸癌の予後にかかわる重要な分子であることが示唆された。本研究では、先行研究の結果を踏まえ *FTX* の機能解析を中心に行う。発現状況から *FTX* は大腸癌では癌化に促進的に作用する Oncogene と考えられる。大腸癌のバイオマーカー、治療標的としての可能性について検証する。

3. 研究の方法

高精度発現解析：*FTX* は正常組織ではほとんど発現しておらず、大腸癌で発現上昇を認める。僅かな *FTX* 発現の上昇が大腸癌の発生・進展に関与している可能性も考えられ、digital PCR を用いて大腸癌症例間の微量な発現差について検討、*FTX* の大腸癌マーカーとしての妥当性を検討する。機能解析：*FTX* の機能解析には大腸癌培養細胞株を用いて *FTX* の knockdown/過剰発現による細胞機能解析、*FTX* の結合分子を同定し、*FTX* 異常が大腸癌に影響する分子メカニズムを解明する。またマウスモデルでの検証も行う。薬剤感受性解析：予備実験から *FTX* の高発現が大腸癌予後と関連することが示唆されるが、*FTX* の knockdown/過剰発現による抗癌剤、分子標的薬の薬剤感受性の変化を検討し、*FTX* の抗癌剤に対する感受性予測マーカーとしての可能性を検討する。

4. 研究成果

1) 大腸癌症例における *FTX* 遺伝子発現

140 例の大腸癌症例の原発巣および正常粘膜組織より RNA を抽出し、*FTX* mRNA 発現を比較す

ると腫瘍組織では有意に FTX 発現の上昇を認めた(図 1)。FTX 発現の中央値で 2 群に分割し予後と比較すると、FTX 高発現群は FTX 低発現群に比較し有意に予後不良であった(図 2)。

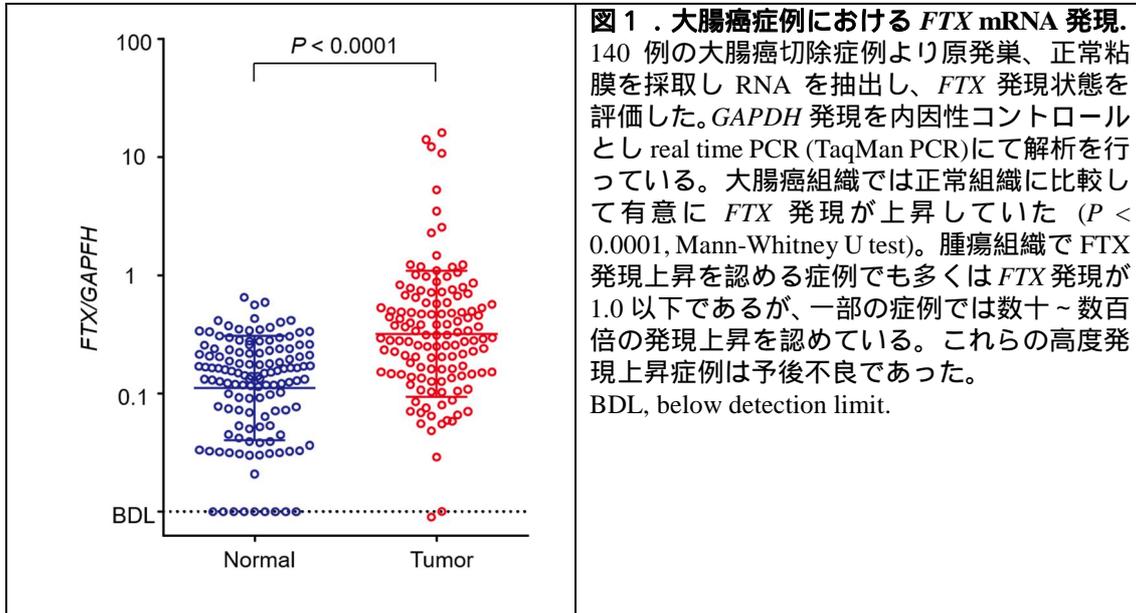


図 1 . 大腸癌症例における FTX mRNA 発現.
140 例の大腸癌切除症例より原発巣、正常粘膜を採取し RNA を抽出し、FTX 発現状態を評価した。GAPDH 発現を内因性コントロールとし real time PCR (TaqMan PCR)にて解析を行っている。大腸癌組織では正常組織に比較して有意に FTX 発現が上昇していた ($P < 0.0001$, Mann-Whitney U test)。腫瘍組織で FTX 発現上昇を認める症例でも多くは FTX 発現が 1.0 以下であるが、一部の症例では数十～数百倍の発現上昇を認めている。これらの高度発現上昇症例は予後不良であった。
BDL, below detection limit.

われわれはこのことから FTX 発現上昇が大腸癌の悪性度に関与していることを示したが、近年大腸癌に加え(Guo XB, *Int J Clin Exp Med* 2015, Yang Y, *Gene Ther* 2018),肝細胞癌 (Liu Z, *Oncotarget* 2016, Li X, *Int J Oncol* 2018, Liu F, *Oncogene* 2016)、胃癌 (Zhu L, *Proteomics Clin Appl* 2020)、肺癌 (Jin S, *J Cell Mol Med* 2020)、腎癌 (He X, *Oncol Res* 2017)、神経膠芽腫 (Zhang W, *Lab Invest* 2017.)、骨髄性悪性腫瘍 (Liu B, *Cell Death Dis* 2018, Zimta AA, *Front Oncol* 2019)、悪性黒色腫 (Xing Y, *Mol Ther* 2017)などさまざまな悪性腫瘍で FTX 発現上昇が悪性度に関連していることが報告されるようになった。

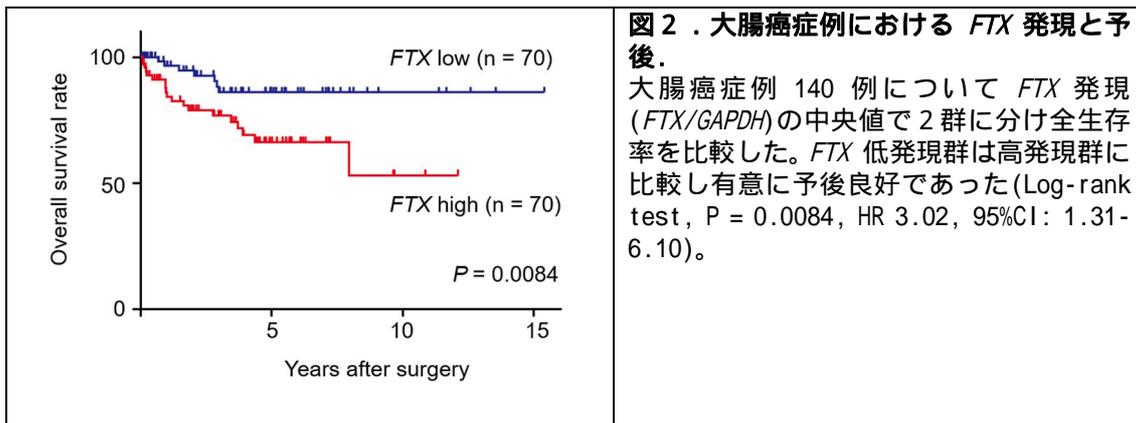


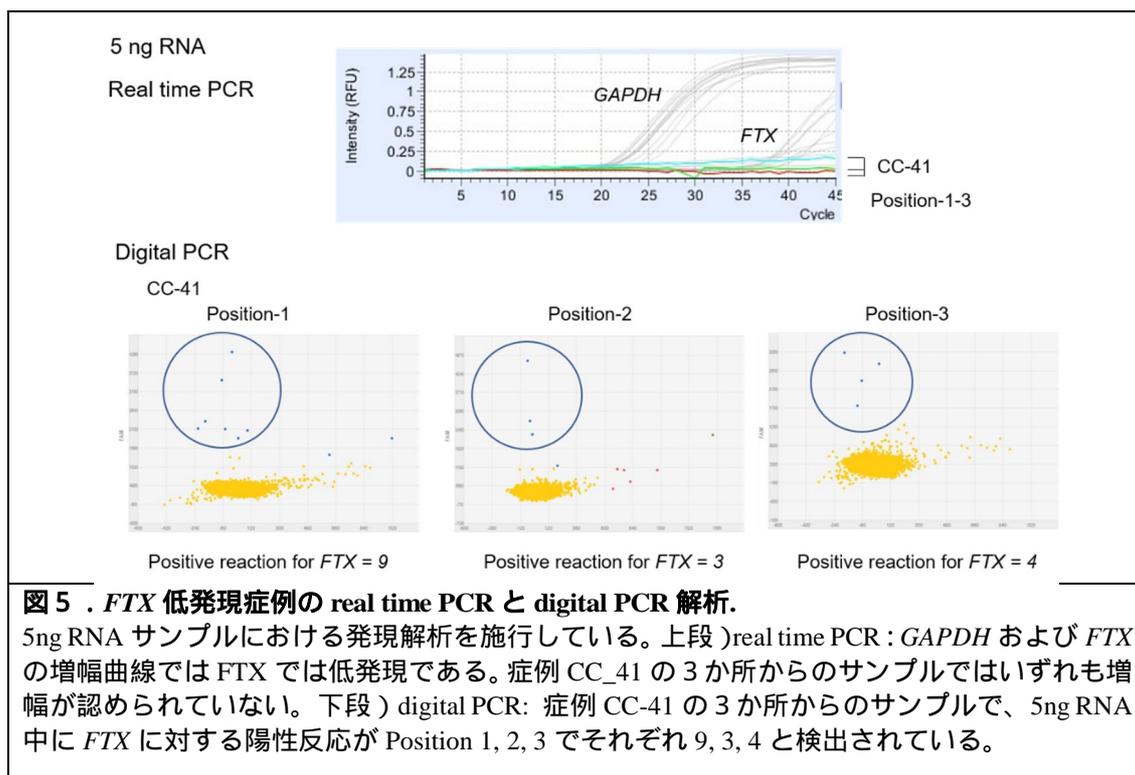
図 2 . 大腸癌症例における FTX 発現と予後.
大腸癌症例 140 例について FTX 発現 (FTX/GAPDH)の中央値で 2 群に分け全生存率を比較した。FTX 低発現群は高発現群に比較し有意に予後良好であった (Log-rank test, $P = 0.0084$, HR 3.02, 95%CI: 1.31-6.10)。

FTX 発現状態は悪性度や予後の重要な指標となることが予想されるが、個々の症例の遺伝子異常に応じた治療法の決定を目的とする近年のがんゲノム医療(Precision medicine)でもサンプル採取部位の不均一性 (heterogeneity)がしばしば問題となっている。前述のように大腸癌組織では正常組織に比べ FTX 発現は有意に上昇しているものの、多くの症例ではその発現差はそれほど大きくない。一部の予後不良症例では FTX 発現が数十～数千倍に上昇しているが、これは原発巣切除組織の一部より採取した数 mm 角のサンプルでの解析である。したがって、1) この FTX 発現は腫瘍組織内で heterogeneity の影響を受けることはないのか、2) 切除時点から再発・癌死まで長期間の時間経過を有する症例も含まれるが、予後は切除時点の FTX 発現で規定されるものなのか、などの疑問が生じた。そこで本研究ではこれらを明らかにすることが FTX の機能を解明するうえで重要と考え、大腸癌原発巣の複数個所から組織採取を行い網羅的遺伝子変異解析・タンパク発現解析を行い、腫瘍の採取部位別の情報と FTX 発現状況を比較する方針とした。

2) 大腸癌原発巣における genetic heterogeneity

大腸癌原発巣の 3 部位より癌組織を採取し DNA を抽出、151 遺伝子を標的とした Pan-cancer panel (ClearSeqSS Comprehensive Cancer Panel)を用いて次世代シーケンサー (NGS)による multiregional sequence を行った(図 3)。14 腫瘍、42 領域で計 84 個の変異が検出された 1 腫瘍当たり平均 12.1 (3-55)個、1 採取部位あたり平均 7.2 (2-43)個の変異が検出された。3 か所で共通す

し、それぞれの区画で PCR 反応による増幅の有無をカウントし定量を行う技術で、微量な target の定量を可能とする第 3 世代の PCR システムである。当研究室では血漿中の微量変異 DNA の解析に同システムを用いているが、real time PCR による発現解析で用いた Primer/Probe を用いて微量な発現差を比較できるか検討した。原発巣より RNA 採取した 3 部位でいずれも Real time PCR で *FTX* 増幅が全く確認できない症例 (CC-41) で、digital PCR ではすべての部位で *FTX* 発現が検出され、3 か所の採取部位のうち Position 2, 3 に比し position 1 で 2 倍程度の発現上昇を認めている。現在、同様の解析を全症例の全採取部位で確認中であるが、微量な *FTX* 発現の差と原発巣変異状況、タンパク発現状況を比較することで、大腸癌における *FTX* 発現の意義が明らかになるものと思われる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Akiyama Y, Sasaki A, Endo F, Nikai H, Amano S, Umemura A, Shigeaki B, Chiba T, Kimura T, Takahara T, Nitta H, Otsuka K, Mizuno M, Kimura Y, Koeda K, Iwaya T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Outcome of esophagectomy after chemotherapy with biweekly docetaxel plus cisplatin and fluorouracil for advanced esophageal cancer: a retrospective cohort analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12957-018-1420-8.	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 -
1. 著者名 Akiyama Y, Iwaya T, Endo F, Nikai H, Sato K, Baba S, Chiba T, Kimura T, Takahara T, Otsuka K, Nitta H, Mizuno M, Kimura Y, Koeda K, Sasaki A	4. 巻 403
2. 論文標題 Thoracoscopic esophagectomy with total meso-esophageal excision reduces regional lymph node recurrence	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langenbecks Arch Surg.	6. 最初と最後の頁 967-975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00423-018-1727-5.	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 -
1. 著者名 Akiyama Y, Iwaya T, Endo F, Nikai H, Sato K, Baba S, Chiba T, Kimura T, Takahara T, Otsuka K, Nitta H, Mizuno M, Kimura Y, Koeda K, Sasaki A	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of the need for routine feeding jejunostomy for enteral nutrition after esophagectomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J thorac Dis.	6. 最初と最後の頁 6854-6862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/jtd.2018.11.97.	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 -
1. 著者名 Akiyama Yuji, Iwaya Takeshi, Endo Fumitaka, Chiba Takehiro, Takahara Takeshi, Otsuka Koki, Nitta Hiroyuki, Koeda Keisuke, Mizuno Masaru, Kimura Yusuke, Sasaki Akira	4. 巻 3
2. 論文標題 Laparoscopic repair of parahiatal hernia after esophagectomy: a case report	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40792-017-0367-2	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 -

1. 著者名 Akiyama Yuji, Iwaya Takeshi, Endo Fumitaka, Chiba Takehiro, Takahara Takeshi, Otsuka Koki, Nitta Hiroyuki, Koeda Keisuke, Mizuno Masaru, Kimura Yusuke, Sasaki Akira	4. 巻 32
2. 論文標題 Investigation of operative outcomes of thoracoscopic esophagectomy after triplet chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil for advanced esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surgical Endoscopy	6. 最初と最後の頁 391 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00464-017-5688-5	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 -

1. 著者名 Akiyama Yuji, Iwaya Takeshi, Endo Fumitaka, Shioi Yoshihiro, Kumagai Motoi, Takahara Takeshi, Otsuka Koki, Nitta Hiroyuki, Koeda Keisuke, Mizuno Masaru, Kimura Yusuke, Suzuki Kenji, Sasaki Akira	4. 巻 25
2. 論文標題 Effectiveness of intervention with a perioperative multidisciplinary support team for radical esophagectomy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Supportive Care in Cancer	6. 最初と最後の頁 3733 ~ 3739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00520-017-3801-x	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 -

1. 著者名 Akiyama Y., Iwaya T., Endo F., Shioi Y., Chiba T., Takahara T., Otsuka K., Nitta H., Koeda K., Mizuno M., Kimura Y., Sasaki A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Stability of cervical esophagogastrostomy via hand-sewn anastomosis after esophagectomy for esophageal cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Diseases of the Esophagus	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dote/dow007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大塚 幸喜, 木村 聡元, 松尾 鉄平, 近藤 優, 藤井 仁志, 八重樫 瑞典, 佐藤 慧, 高清水 清治, 高原 武志, 秋山 有史, 岩谷 岳, 新田 浩幸, 佐々木 章
2. 発表標題 内視鏡外科の安全な普及と教育の課題 大腸癌に対する腹腔鏡手術教育の実際と展望
3. 学会等名 第31回日本内視鏡外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾 鉄平, 大塚 幸喜, 木村 聡元, 佐藤 慧, 高原 武史, 秋山 有史, 岩谷 岳, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 佐々木 章
2. 発表標題 直腸癌に対する術式選択の際の永久人工肛門造設の適応についての検討
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 聡元, 大塚 幸喜, 松尾 鉄平, 佐藤 慧, 畑中 智貴, 近藤 優, 高原 武志, 秋山 有史, 岩谷 岳, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章
2. 発表標題 局所進行直腸癌に対する術前化学療法の検討
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 聡元, 大塚 幸喜, 松尾 鉄平, 藤井 仁志, 近藤 優, 八重樫 瑞典, 高原 武志, 秋山 有史, 岩谷 岳, 新田 浩幸, 水野 大, 佐々木 章
2. 発表標題 周術期管理から退院後のTOTAL SUPPORT ~ GUT STARVATIONとKAMPO ~ 腹腔鏡下大腸癌手術に対する桃核承気湯を用いた術前処置
3. 学会等名 第80回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八重樫 瑞典, 大塚 幸喜, 木村 聡元, 箱崎 将規, 上嶋 徳, 三宅 孝典, 秋山 有史, 岩谷 岳, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章
2. 発表標題 当教室における高齢者に対する腹腔鏡下大腸癌手術の検討
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大塚 幸喜, 木村 聡元, 箱崎 将規, 八重樫 瑞典, 高清水 清治, 高原 武志, 秋山 有史, 岩谷 岳, 肥田 圭介, 佐々木 章
2. 発表標題 腹腔鏡下肥満直腸癌症例に対する偶発症と予防対策
3. 学会等名 第72回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村 聡元, 大塚 幸喜, 松尾 鉄平, 佐藤 慧, 畑中 智貴, 近藤 優, 八重樫 瑞典, 藤井 仁志, 箱崎 将規, 高原 武志, 秋山 有史, 岩谷 岳, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 佐々木 章
2. 発表標題 当教室における腹腔鏡下大腸癌手術に用いるエネルギーデバイスの工夫
3. 学会等名 第79回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2017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
---------	---------------------------	-----------------------	----