

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09143

研究課題名(和文)大腸癌転移進展における新たなNon-coding RNAによる機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel metastatic process via regulation of non-coding RNA in CRC

研究代表者

今岡 裕基 (Imaoka, Hiroki)

三重大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：70762938

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)：消化器癌においてWnt signalingに関与すると報告されているflamingo non-coding RNA (FLANC)の発現が大腸癌組織で高発現であり、大腸癌細胞においてFLANCが細胞増殖、腫瘍進展、血管新生、アポトーシス、転移に関与していることを証明した。大腸癌組織におけるFLANC高発現群では有意に生存予後および無再発予後が不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌進展・転移に関与するCircRNAのバイオマーカーとしての有用性には大きな期待が寄せられると考えられる。本研究ではFLANCが大腸癌の腫瘍進展・転移に関与しており、予後予測マーカーとして有用となり得る可能性について証明した。今後はCirc RNAの網羅的プロファイリングを行い、大腸癌転移に関するバイオマーカーとしての意義を検証していく予定であり、本研究成果はその試金石となりうる役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified the expression level of FLANC was significantly high in CRC tissues compared with adjacent normal mucosa. Furthermore, the high expression group of FLANC showed significantly poor overall survival and disease free survival compared with low expression group.

研究分野：下部消化管悪性腫瘍

キーワード：大腸癌 転移 Circular RNA バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年わが国においては食生活の欧米化に伴って、日本においても大腸癌による死亡者数が増加しており、女性においては悪性新生物による死亡者数で第 1 位となっている。大腸癌死亡予防には、早期発見/早期治療による二次予防が必要となり、現在の便潜血検査と比較し、感度・特異度ともに期待できるあらたな非侵襲的で簡易一次スクリーニング法の開発が急がれる。その一方進行大腸癌に関しても、この 10 年で著しい治療法の進歩を遂げたが、しかしながら **Stage III**(リンパ節転移陽性)結腸癌の 25%、直腸癌では 35%には遠隔転移再発を認めるため、より強力な補助化学療法のレジメの開発が急務である一方、遠隔転移再発を早期に発見するのみならず、転移再発高リスク患者を選別する新たなバイオマーカーの確立や、転移機序を解明することによる転移抑制の新たな治療法が開発が急がれる。

一般の大腸癌は他の多くの癌と同様に遺伝子の異常が蓄積して発生する多段階発癌の経過をとる(腺腫を前駆病変として発癌する経路; **adenoma-carcinoma sequence** 理論)。遺伝子の異常には突然変異や染色体欠損などの **Genetic** な遺伝子構造異常だけでなく、後天的 **DNA** 修飾による遺伝発現制御である **epigenetic** な異常があげられる。**Epigenetic** な変化として、**DNA** 塩基のメチル化による遺伝子発現の変化・ヒストンの化学修飾による遺伝子発現の変化、そして **microRNA** や **long non-coding RNA(ncRNA)** などといった蛋白質をコードしない **ncRNA** による遺伝発現制御がある。中でも、**ncRNA** の分野はこの数年、著しい飛躍を遂げており、とりわけ長さ **20-25** 塩基ほどの **microRNA(miRNA)** が生体内の維持から発癌の機序に至るまで幅広い範囲で大きな役割を担っていることが証明されてきた。また **miRNA** は血清からでも検出可能であり、大腸新生物(高異型度腺腫と癌)に対する新たなバイオマーカーとしてすでに脚光を浴びている。

**Circular RNA(CircRNA)**は、従来理解されてきた線状 **RNA** と異なり、ループ型の形状を呈する **long ncRNA** であり、スプライシング機構が明らかとなった **1990** 年代から **CircRNA** が存在することは認識されていたがその生理的意義は不明であった。近年、**Memczak** らが、高速シーケンサーによる転写産物の網羅的解析から、ヒト細胞内に多数の **CircRNA** の存在を確認し、その配列を詳しく解析すると、一部の **CircRNA** では特定の **miRNA** に対する標的配列が多数含まれていることが判明した。さらに **CircRNA** は自身の配列に特定の **miRNA** を結合させることでその機能を抑制させる **miR sponge** としての機能を持つことが報告され、**CircRNA** の癌進展における役割が近年着目されてきており、今後さらなる飛躍が望まれる新研究領域である。

## 2. 研究の目的

本研究は、同時性肝転移、リンパ節転移を認めた患者群の正常大腸粘膜、原発巣、転移リンパ節、肝転移の 4 群間の **profiling** から大腸癌進展・転移に関する **CircRNA** を同定し、新たな **Non-invasive biomarker** の確立と、癌進展機序解明からの新規治療法開発を目的とする **Two way approach** を行い、現在極めて予後不良な経過をたどる大腸癌患者の予後・**QOL** の向上をめざすことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)大腸癌進展関連 CircRNA の検索

RNA later sample を使用し、腫瘍近傍正常粘膜、腫瘍組織、リンパ節転移組織、転移巣組織から Total RNA の抽出を行い、大腸癌進展関与候補 CircRNA(発現亢進 CircRNA 群、発現抑制 CircRNA 群)を確認する。

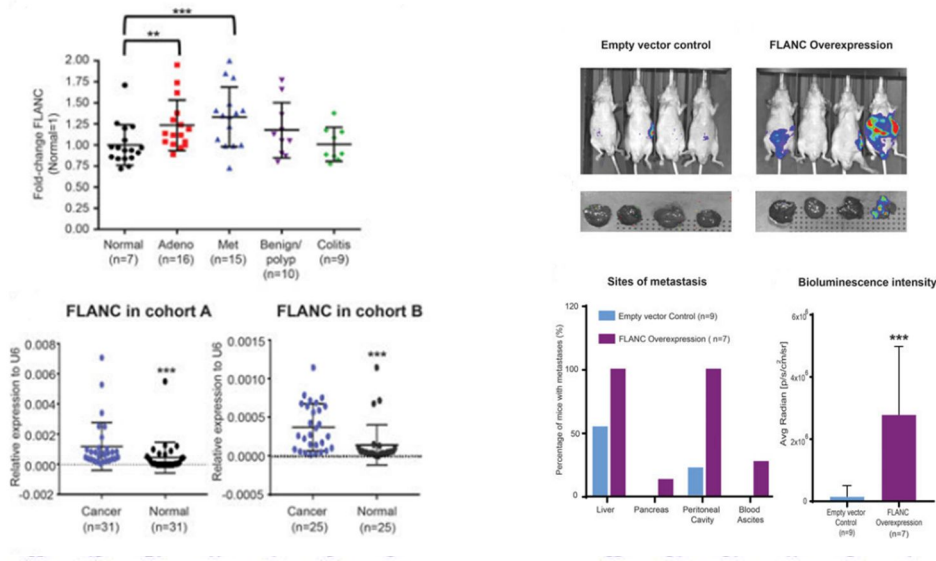
### (2-1) 大腸癌進展・転移関連 CircRNA の機能解析

候補 CircRNA の siRNA を用いて、大腸癌細胞株二種類以上に Nuclear transfection を施行し Knockdown, Negative control の細胞株を作成し、機能解析を行う。機能解析には、Cell proliferation assay, Colony formation assay, Migration assay, Invasive assay, 血管新生アッセイ, Adhesion assay Anoikis assay を行う。

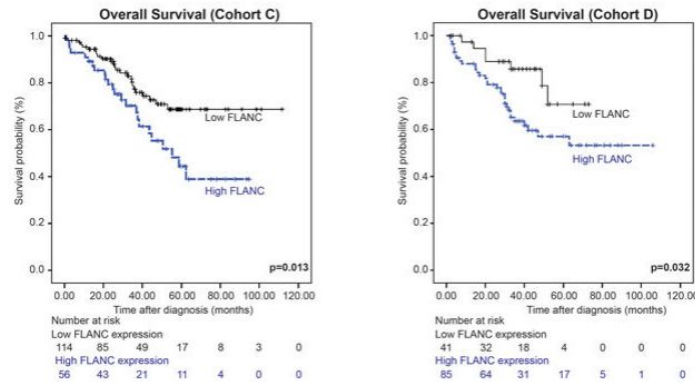
(2-2) 候補 CircRNA の全長オリゴをベクターに Transformation させ、プラスミドを作成し、HEK293T とレンチウイルスでトランスフェクションし、CircRNA 過剰発現大腸癌細胞株を作成し、各種細胞株と対象群をそれぞれヌードマウスに Xenograft model, Liver metastasis model の二種類のモデルを作成し、腫瘍形成への影響を確認し、実際に腫瘍形成能、転移形成能を検証する。

## 4. 研究成果

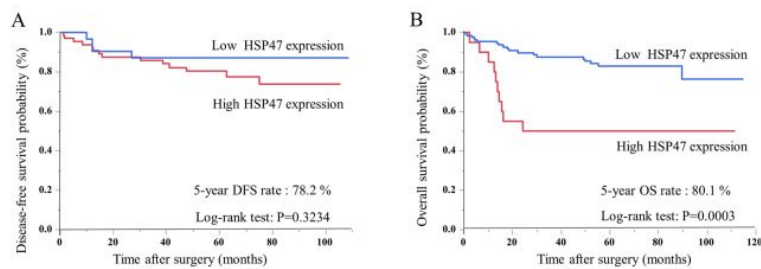
(1) 消化器癌や白血病において Wnt signaling に関与すると報告されている flamingo non-coding RNA (FLANC)に着目し、FLANC の発現が正常粘膜に比べて、大腸癌および転移巣で著明に高発現であった。In vitro の結果から大腸癌細胞において FLANC が細胞増殖、腫瘍進展、血管新生、アポトーシス、転移に関与していることが示唆され、Mouse モデルを用いた実験では、FLANC を高発現させた大腸癌細胞株を投与した結果、有意に肝転移・腹膜播種を認めた。



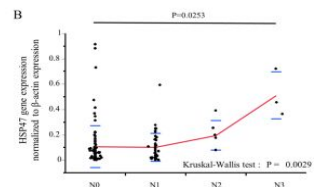
さらに、大腸癌患者における FLANC 高発現群が有意に予後不良であり、治療候補となり得る可能性が示唆された。



(2)また随伴する研究として、我々は、大腸癌組織における Heat Shock protein 47 (HSP47)が腫瘍進展に関与していることを同定した。大腸癌患者 137 例において HSP47 高発現群は有意に予後不良であった(Log-rank test;  $P=0.0003$ )。



HSP47 高発現は腫瘍進展やリンパ節転移に相関しており、HSP47 高発現が大腸癌患者におけるリンパ転移の有用な予測マーカーとなり得る可能性が示唆された。(上図・右図、Mori K, Toiyama Y, Okugawa Y, et al. oncology letters.20: 333, 2020)



研究成果として示した通り、大腸癌進展に関与する Circ RNA や蛋白に関して、そのバイオマーカーとしての有用性には大きな期待が寄せられると考える。特に、Circ RNA の網羅的プロファイリングを行う上で、Circular microarray を行う場合が多いが、近年では Circular RNA specific next generation sequencing (NGS)を行う報告も増加しつつある。NGS においては十分な意見に基づいた pipeline の構築がデータ解析の上で重要であるため、当講座において本研究領域は発展途上な点は否めないが、他施設との共同研究による生物統計学的アプローチを進展させ、今後も研究を継続していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ide Shozo, Okugawa Yoshinaga, Omura Yusuke, Yamamoto Akira, Ichikawa Takashi, Kitajima Takahito, Shimura Tadanobu, Imaoka Hiroki, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Yokoe Takeshi, Okita Yoshiki, Ohi Masaki, Toiyama Yuji	4. 巻 19
2. 論文標題 Geriatric nutritional risk index predicts cancer prognosis in patients with local advanced rectal cancer undergoing chemoradiotherapy followed by curative surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-021-02139-z	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 -
1. 著者名 Mori Koichiro, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Ichikawa Takashi, Nagano Yuka, Oki Satoshi, Shimura Tadanobu, Fujikawa Hiroyuki, Hiro Junichiro, Kobayash Minako, Araki Toshimitsu, Inoue Yasuhiro, Mohri Yasuhiko, Kusunoki Masato	4. 巻 20
2. 論文標題 Preoperative heat shock protein 47 levels identify colorectal cancer patients with lymph node metastasis and poor prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 333-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12196	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 -
1. 著者名 Okita Yoshiki, Koi Minoru, Takeda Koki, Ross Ryan, Mukherjee Bhramar, Koeppel Erika, Stoffel Elena M., Galanko Joseph A., McCoy Amber N., Keku Temitope O., Okugawa Yoshinaga, Kitajima Takahito, Toiyama Yuji, Martens Eric, Carethers John M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum infection correlates with two types of microsatellite alterations in colorectal cancer and triggers DNA damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut Pathogens	6. 最初と最後の頁 46-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13099-020-00384-3	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 該当する

1. 著者名 Pichler Martin, Rodriguez-Aguayo Cristian, Nam Su Youn, Dragomir Mihnea Paul, Bayraktar Recep, Anfossi Simone, Knutsen Erik, Ivan Cristina, Fuentes-Mattei Enrique, Lee Sang Kil, Ling Hui, Catela Ivkovic Tina, Huang Guoliang, Huang Li, Okugawa Yoshinaga	4. 巻 -
2. 論文標題 Therapeutic potential of FLNC, a novel primate-specific long non-coding RNA in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 2019-318903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2019-318903	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 該当する

1. 著者名 Takeda Sho, Shigeyasu Kunitoshi, Okugawa Yoshinaga, Yoshida Kazuhiro, Mori Yoshiko, Yano Shuya, Noma Kazuhiro, Umeda Yuzo, Kondo Yoshitaka, Kishimoto Hiroyuki, Teraishi Fuminori, Nagasaka Takeshi, Tazawa Hiroshi, Kagawa Shunsuke, Fujiwara Toshiyoshi, Goel Ajay	4. 巻 444
2. 論文標題 Activation of AZIN1 RNA editing is a novel mechanism that promotes invasive potential of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 127 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.12.009	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 該当する

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥川喜永、問山裕二、山本 晃、大村悠介、浦谷 亮、井出正造、近藤 哲、志村匡信、安田裕美、藤川裕之、大北喜基、白井由美子、横江 毅、三枝 晋、廣 純一郎、大井正貴、荒木俊光、田中光司、三木誓雄、楠 正人
2. 発表標題 臨床実装を視野に入れた大腸癌外科診療におけるあらたなmultiple-outcome prediction biomarkerの確立
3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会、東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 問山裕二、山本 晃、奥川喜永、楠 蔵人、大村悠介、藤川裕之、大北喜基、廣 純一郎、大井正貴、内田恵一、楠 正人
2. 発表標題 網羅的DNAメチル化解析から抽出した潰瘍性大腸炎合併大腸癌診断マーカー
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会、東京
4. 発表年 2019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・医学系研究科・教授   (14101)	
研究分担者	奥川 喜永  (Okugawa Yoshinaga)  (30555545)	三重大学・医学部附属病院・教授   (14101)	
研究分担者	楠 正人  (Kusunoki Masato)  (50192026)	三重大学・医学系研究科・寄附講座大学教員   (14101)	
研究分担者	井出 正造  (Ide Shozo)  (90616088)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト   (14101)	

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
---------	---------