

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16980

研究課題名(和文) TROY関連遺伝子は大腸癌の再発予測マーカーとして有用か？

研究課題名(英文) Are TROY related genes effective as markers for predicting recurrence of colorectal cancer?

研究代表者

西岡 光昭 (Nishioka, Mitsuaki)

山口大学・医学部附属病院・臨床・衛生検査技師長

研究者番号：70738963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌患者の腫瘍部組織において、TROY遺伝子及びLGR5遺伝子の共過剰発現群は、その他の群と比較して大腸癌の手術後の再発期間が有意に短いことが確認できた。in vitroの実験結果より、TROY単独の過剰発現では細胞増殖能を亢進させ、TROYとLGR5の共過剰発現では細胞浸潤能の亢進が認められ、両遺伝子の共過剰発現が大腸癌の浸潤や転移に寄与している可能性が確認できた。更にRNAマイクロアレイ解析結果と大腸癌の臨床検体を用いた検討より、「long non coding RNA X」の発現量が非癌部と比較して癌部で有意に発現量が増加していることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TROYとLGR5の共過剰発現が大腸癌の再発に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。また、我々が発見したTROYとLGR5に関連した機能未知のlong non coding RNAを用いて、大腸癌再発の予後予測可能な検査や臨床応用可能な新規治療薬開発や創薬に利用することで、大腸癌患者の手術後の再発率の改善や生存率の向上だけでなく、生活の質が向上するほどのインパクトを社会に与えうると考える。

研究成果の概要(英文)：In the tumor tissue of colorectal cancer patients, it was confirmed that the co-overexpression group of the TROY gene LGR5 gene had a significantly shorter recurrence period after surgery for colorectal cancer than the other groups. From in vitro assay, it was confirmed that overexpression of TROY alone enhances cell proliferation ability, and co-overexpression of TROY and LGR5 enhances cell invasion ability. It was confirmed that co-overexpression of both genes may contribute to invasion and metastasis of colorectal cancer. Furthermore, from the results of RNA microarray analysis and examination using clinical specimens of colorectal cancer, it was confirmed that the expression level of “long non-coding RNA X” was significantly increased in the cancerous part compared to the non-cancerous part.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：大腸癌 long non coding RNA TROY LGR5

### 1. 研究開始当初の背景

近年の日本における大腸癌死亡率および罹患率は著しく増加している。2016年の国立がん研究センターのがん統計によれば、女性の大腸癌死亡は全悪性新生物による死亡のなかで最多であり、男性では肺癌、胃癌に次いで多い。大腸癌の進行度を示すステージ分類(I~IV)において、ステージI~IIIのほぼ全てで外科的切除が第一選択となる。手術後の再発率はステージIで4.1%、ステージIIで13.1%、ステージIIIで30.8%と、ステージが上がると再発率も上昇している(大腸癌研究会プロジェクト研究報告)。そのためステージII、III大腸癌の手術後は必要に応じて化学療法を行うが、その明確な適応基準がなく曖昧である。また、切除不能な転移再発を起こした場合、予後に大きく寄与すると考えられるため、再発を予測するための評価方法の開発が喫緊の課題となっている。しかしながら現在までに初回手術時に将来の再発リスクを予測する臨床的に有用な再発予測マーカーは存在していない。

大腸癌の発生・進展・転移においては多段階発癌モデルが提唱されており、正常細胞が癌細胞へと変化していく過程において様々な遺伝子の関与が現在までに明らかとなっている。Wnt経路はこの多段階発癌モデルの中の初期段階から活性化しており、この経路に関連した遺伝子群の発現状況は大腸癌の発生・進展・転移に深く関与している。以前より我々は、大腸癌手術後の予後予測マーカーとしてWnt経路に関連した分子Fz7、Wnt11、LGR5、TROYに注目し、これら遺伝子の腫瘍部における発現レベルが非腫瘍部に比べ有意に高値であり、更には再発を予測する因子として有用であることを報告した(引用文献 )。特にステージII、III大腸癌患者の中のTROY高発現群は、手術後から再発までの期間が有意に短いことが確認され、この報告は世界初の知見である(引用文献 )。この2つの分子に関してはこれまでの報告で複合体を形成することが確認されており、この複合体からのシグナル活性は大腸癌の再発に寄与するものと考えられるが、その詳細は未だに解明されていない。本研究では、このTROY関連遺伝子から臨床的に有用な大腸癌の再発予測マーカーの確立を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は大腸癌手術後の再発予測を可能とするマーカーの確立により、ステージII、III大腸癌の再発リスクの高い群における適切な補助化学療法を行い、再発率や生存率の向上を目指す。

### 3. 研究の方法

(1)過去の発表データ(引用文献 )を用いて、100例の大腸癌患者の手術中の凍結腫瘍部組織検体を用いて測定したTROYとLGR5の発現量と予後の再解析を行う。

(2)すでに作製済みのTROY及びLGR5を過剰発現させたヒト大腸癌細胞株HCT116において細胞増殖能・細胞遊走能・細胞浸潤能の評価を行う。TROY遺伝子はいくつかのバリエーションがあり、その中の2つが生理的に機能しているため、TROY\_v1とTROY\_v2の過剰発現をそれぞれ作製している。

(3)(2)の細胞を用いてRNAマイクロアレイ解析を行い、TROYとLGR5のシグナルに関連した遺伝子を検索する。

(4)臨床検体(大腸癌腫瘍部組織及び非腫瘍部組織)を用いて(3)で検索した遺伝子の発現量を定量測定し、腫瘍マーカーとしての有用性を確認する。

### 4. 研究成果

(1)TROYとLGR5の発現量を中央値で分け、TROY・LGR5ともに発現量が高い群(TROY-High/LGR5-High)はその他の群と比較して有意に手術後の大腸癌再発期間が短いことが確認できた。TROYとLGR5の共過剰発現は大腸癌の進展において何らかの関与がある可能性が考えられ、TROY及びLGR5を過剰発現させたヒト大腸癌細胞株の作製及び機能解析へと進めた。

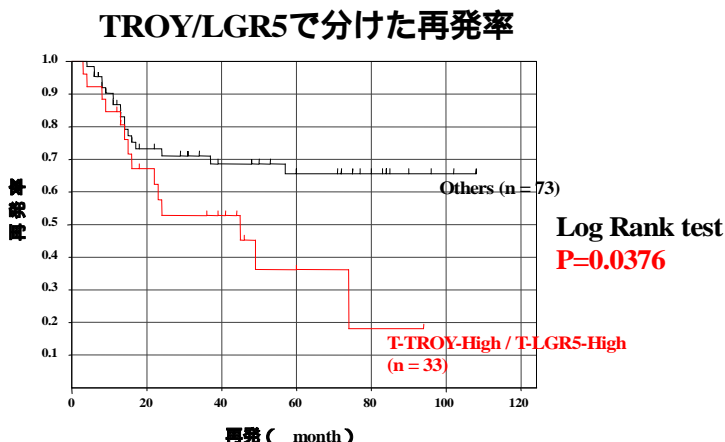


図1 TROY/LGR5の発現量で群分けした大腸癌の手術後再発期間の比較

(2) 細胞増殖能の評価では、TROY\_v1・LGR5 共過剰発現細胞と TROY\_v2・LGR5 共過剰発現細胞は Mock と比較して有意に細胞増殖能が低下していた(図2)。一方で TROY\_v1 又は TROY\_v2 単独での過剰発現細胞は Mock と比較して有意に細胞増殖能が増加していた(図2)。細胞遊走能の評価では、作製した過剰発現細胞と Mock の間で有意な差は認められなかった(図3)。細胞浸潤能の評価では、Mock と比較して TROY\_v1・LGR5 共過剰発現細胞は有意に細胞浸潤能が増加していた(図4)。

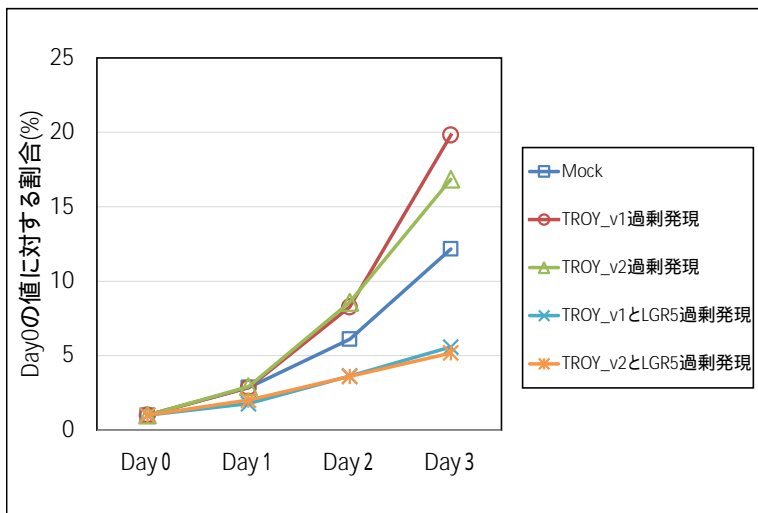


図2 細胞増殖能アッセイ結果

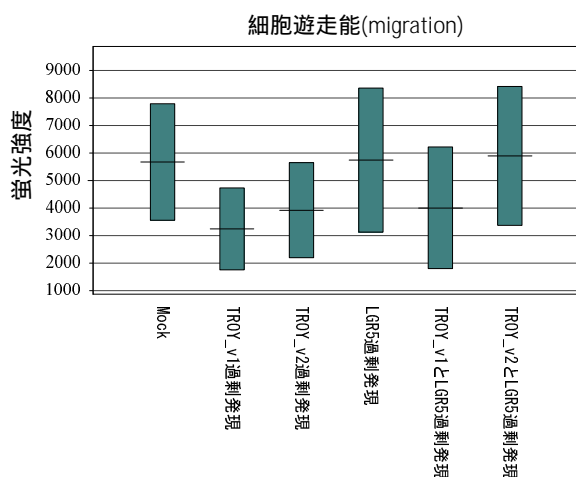


図3 細胞遊走能アッセイ結果

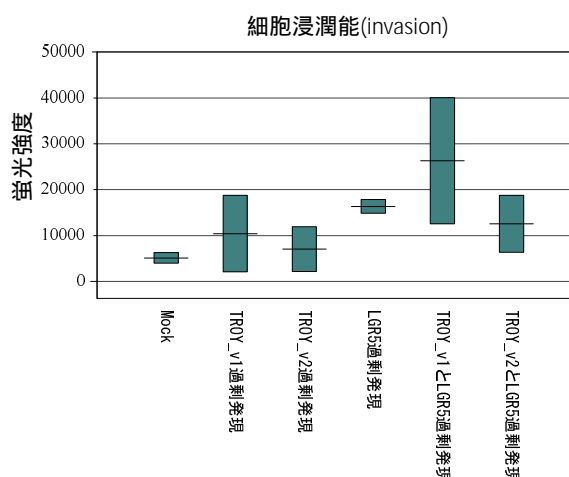


図4 細胞浸潤能アッセイ結果

(3) TROY\_v1・LGR5 共過剰発現細胞株と Mock を用いて RNA マイクロアレイ解析を行い、細胞株間の RNA の発現レベルを比較したところ、発現変化の著しい 23 種類の long non-coding RNA (lncRNA) を同定できた。lncRNA は蛋白質をコードしない RNA のうち約 200 塩基以上の長さのものであり、転写や翻訳、エピジェネティクスの制御などを介して、細胞の分化やがん化に関与することが知られている。同定できた 23 種類の lncRNA による細胞増殖・細胞浸潤の機序は不明なままであり今後検討する必要がある。

(4) 66 例の大腸癌患者の手術中の凍結腫瘍部組織検体及び非癌部組織検体から DNA と RNA を抽出した。この癌部と非癌部を用いて(3)で同定した 23 種類の lncRNA をターゲットとして RNA の発現量を比較したところ「lncRNA X」の発現量が非癌部と比較して癌部で有意に発現量が増加していることが確認できた(図5)。今後はこの「lncRNA X」の臨床的有用性を確認していき、臨床応用の可能性を検討していく予定である。

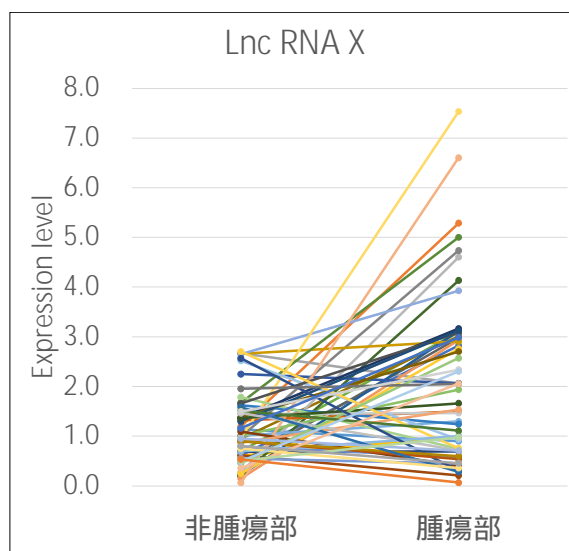


図5 TROY 関連の lnc RNA X は大腸癌腫瘍部において発現が増加する

<引用文献>

Ueno K, Hazama S, Mitomori S, **Nishioka M**, Suehiro Y, Hirata H, Oka M, Imai K, Dahiya R, Hinoda Y. Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells. *Br J Cancer*. 2009;101(8):1374-81.

**Nishioka M**, Ueno K, Hazama S, Okada T, Sakai K, Suehiro Y, Okayama N, Hirata H, Oka M, Imai K, Dahiya R, Hinoda Y. Possible involvement of Wnt11 in colorectal cancer progression. *Mol Carcinog*. 2013;52(3):207-17

**Nishioka M**, Suehiro Y, Sakai K, Matsumoto T, Okayama N, Mizuno H, Ueno K, Suzuki N, Hashimoto S, Takami T, Hazama S, Nagano H, Sakaida I, Yamasaki T. TROY is a promising prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2018;15(4):5989-94.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------