

令和 6 年 5 月 3 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15406

研究課題名（和文）大腸粘膜下層浸潤癌におけるmicro RNA網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of micro RNA in colorectal submucosal invasive carcinoma

研究代表者

永塚 真（Eizuka, Makoto）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：90815937

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）：大腸浸潤癌（リンパ節転移18例、非転移21例）についてパラフィンからRNAを抽出し、網羅的miRNAおよびmRNA解析を行った。リンパ節転移群と非転移群のmiRNA発現変動の比較はFDR $p < 0.05$ かつ $\Delta \text{Fold change} > \text{絶対値}2$ を越えるものを抽出した。リンパ節転移群で有意に発現したmiRNAおよびmRNAにおいて相互関係をパスウェイ解析で検討したところ回帰性を認めた組み合わせはMETAP1とmiR-4685-3p, TGOLN2とmiR-6806-3pであった。これらのmiRNAとmRNAの組み合わせがリンパ節転移に重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌のリンパ節転移群、非転移群においてmicro RNA (miRNA)およびmessenger RNA (mRNA)解析を行い、リンパ節転移群で多く発現するものを抽出しその回帰性を示す組み合わせを検討したところ2組のmRNA/miRNAの組み合わせを抽出した。これらの2組のmRNA/miRNAの組み合わせが大腸癌のリンパ節転移に重要な役割を担う可能性が示唆され、大腸癌の予後不良因子となる可能性がある。症例の蓄積、追加検討による妥当性の検討が肝要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：RNA was extracted from paraffin for colorectal invasive carcinoma (18 lymph node metastases, 21 non-metastases), and comprehensive miRNA and mRNA analyses were performed. For comparison of miRNA expression variation between the lymph node metastasis and non-metastasis groups, miRNAs with FDR $p < 0.05$ and delta fold change $>$ absolute value of 2 were selected. The miRNAs and mRNAs that were significantly expressed in the lymph node metastasis group were examined by pathway analysis and found to be regressive: METAP1 and miR-4685-3p, and TGOLN2 and miR-6806-3p. These miRNA-mRNA combinations may play an important role in lymph node metastasis.

研究分野：消化管腫瘍

キーワード：大腸癌 リンパ節転移 micro RNA messenger RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の発癌経路として、1) 大腸腺腫を介して癌が発生する adenoma-carcinoma sequence, 2) 非腫瘍性粘膜から直接癌が発生する denovo pathway, 3) 大腸鋸歯状病変の発癌経路である serrated pathway が知られている。大腸癌発癌にはゲノム・エピゲノム異常が大きく関与している。ゲノムの異常として 1)では *APC*, *KRAS*, *TP53* 変異が発生し¹⁾, 染色体コピー数変化 (copy number alteration, CNA)が蓄積することにより進行癌へとプログレッションする。2)では *TP53*変異が腫瘍発生に中心的な役割を担う。3)では非腫瘍性粘膜から *BRAF*変異により前癌病変となる過形成性ポリープが発生する。一方でエピゲノムの異常としては 3)でゲノムワイドな DNA メチル化の蓄積により sessile serrated lesion (SSL)が発生し, *MLH1* 遺伝子のメチル化が発癌に重要な役割を担う。大腸癌発生におけるエピゲノム異常として上述の通り DNA メチル化報告されているが²⁾,近年は micro RNA (miRNA)発現異常が発癌における重要なエピゲノム異常として注目されている。miRNA は 19-23 塩基からなる低分子の non-coding RNA であり標的 messenger RNA (mRNA)の 3' 非翻訳領域に結合しタンパク質の翻訳抑制により細胞の分化,発生,細胞周期,細胞死など多くの場面において細胞機能を制御していると考えられている。大腸癌においても miRNA 発現異常の報告はいくつかあるが³⁾⁴⁾,その前癌病変である腺腫や早期癌,粘膜下層浸潤癌についての報告は少ない。我々は進行大腸癌において miRNA 発現異常が報告されている既報から 13 種類の miRNA (*hsa-miRNA-19a-3p*, *hsa-miRNA-21-5p*, *hsa-miRNA-27a-3p*,*hsa-miRNA-27b-3p*,*hsa-miRNA-31-5p*,*hsa-miRNA-34b-3p*,*hsa-miRNA-125b-5p*,*hsa-miRNA-143-3p*,*hsa-miRNA-191-5p*,*hsa-miRNA-193b-3p*,*hsa-miRNA-195-5p*, *hsa-miRNA-206*, *hsa-let-7a-5p*)について腺腫, 粘膜内癌, 進行癌においてその発現レベルを解析し, *hsa-miRNA-125b-5p*, *hsa-miRNA-143-3p*, *hsa-miRNA-206* が粘膜内癌から進行癌へとプログレッションする際に重要な役割を担う可能性があることを明らかにした⁵⁾。しかし上記の miRNA が大腸粘膜下層浸潤癌リンパ節転移においての重要な予測因子となり得るかは追加の検証を要すると考えられた。

一方で近年, マイクロアレイ解析の進歩により miRNA 発現について array を用いた網羅的解析が可能となった。今回我々が解析した miRNA は既報で大腸進行癌において発現異常が認められている 13 種類の miRNA 解析であり, 粘膜内癌から進行癌へとプログレッションする際に重要と考えた 3 種類の miRNA (*hsa-miRNA-125b-5p*, *hsa-miRNA-143-3p*, *hsa-miRNA-206*) が粘膜下層浸潤癌リンパ節転移予測に有用なマーカーとなりうるかの検証, そして粘膜下層浸潤癌においてマイクロアレイを用いた miRNA 発現の網羅的解析を行いリンパ節転移に重要な役割を担う miRNA を同定することは大腸癌診断・治療において急務と考えられる。本研究では, 粘膜下層浸潤癌において先行研究で同定した miRNA (*hsa-miRNA-125b-5p*, *hsa-miRNA-143-3p*, *hsa-miRNA-206*)のリンパ節転移予測に關しての有用性, 妥当性の検討, そして miRNA の発現異常を網羅的に解析し, 粘膜下層浸潤癌リンパ節転移に重要な miRNA の同定を目的とした。

2. 研究の目的

本研究は粘膜下層浸潤癌標本の包埋パラフィン標本から RNA を抽出し,リンパ節転移の有無で大別した 2 群における miRNA 発現を網羅的に解析し,リンパ節転移に重要な役割を担う miRNA の同定を目的とする。

3. 研究の方法

内視鏡的粘膜切除術,内視鏡的粘膜下層剥離術,外科手術検体を用い粘膜下層浸潤癌 40 例 (リンパ節転移あり 20 例, リンパ節転移なし 20 例)の集積を目標とする。

- 1.大腸癌取扱規約第 9 版に則り組織学的診断を行う。
- 2.組織学的診断をもとに代表切片を決定し,そのパラフィン包埋標本を収集する。
- 3.包埋パラフィンから RNA を抽出し miRNA 発現異常を網羅的に解析する。
- 4.各疾患群で発現異常を認めた miRNA を抽出し比較検討する。
- 5.miRNA と mRNA の相互関係をパスウェイ解析で検討する。

4. 研究成果

大腸粘膜下層浸潤癌 (リンパ節転移例, 非転移例) についてパラフィンから RNA を抽出した。いくつかの症例で RNA の抽出に難渋し一部固有筋層浸潤, 漿膜下層浸潤症例も症例として追加した。術前化学療法が行われた症例, 遺伝性腫瘍症例, 免疫染色や MSI 解析で MSI が示唆された症例は除外とした。結果としてリンパ節転移例 18 例, 非転移例 21 例において解析を行なった。網羅的 miRNA 解析は affymetrix GeneChip miRNA Array 4.0 を用いた。網羅的 mRNA 解析は affymetrix Clario S human assay を用いた。

リンパ節転移群と非転移群の miRNA および mRNA の発現変動の比較は FDR $p < 0.05$ かつ $\Delta \text{Fold change} > \text{絶対値} 2$ を越えるものを抽出することとした。その結果 8 個の miRNA (miR-4685-3p, 6754-3p, 6806-3p, 8085 など) で up regulation を認めた。miRNA-125b-5p, miRNA-143-3p, miRNA-206 では up regulation は認めなかった。down regulation を示したものは認めなかった。mRNA では 93 個の mRNA で up regulation, 15 個の mRNA で down regulation を認めた (図 1)。

図 1. 非転移例に対して転移例で有意に発現変動する miRNA, mRNA

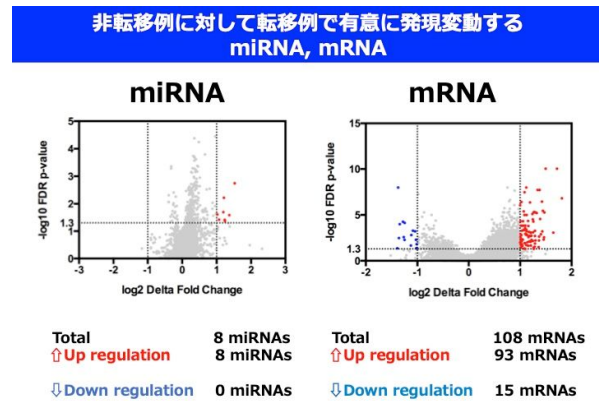


図 2. pathway 解析による miRNA, mRNA の相互関係

網羅解析によって得られた miRNA と mRNA において逆の発現パターンを示す組み合わせをパスウェイ解析で検討した。miRNA で up regulation を示し, down regulation を示した mRNA は 7 パターン (TMEM243 と miR-206, 4685-3p, 6754-3p, METAP1 と miR-4685-3p, CAMK4 と miR-8085, TGOLN2 と miR-6806-3p, 8085) であった (図 2)。

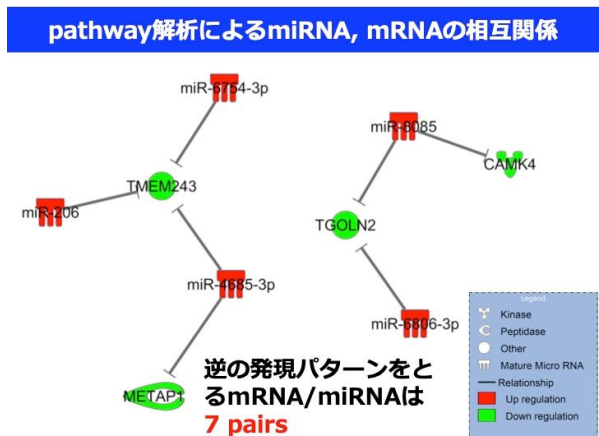
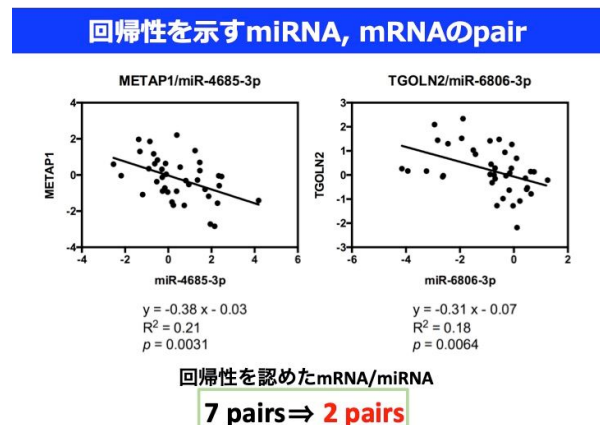


図 3. 回帰性を示す miRNA, mRNA の pair

そのうち回帰性を認めた miRNA と mRNA の組み合わせは METAP1 と miR-4685-3p (自由度調整済み決定係数 0.21, 回帰係数 -0.38, $p = 0.0031$), TGOLN2 と miR-6806-3 (自由度調整済み決定係数 0.18, 回帰係数 -0.31, $p = 0.0064$) であった (図 3)。

これらの miRNA と mRNA の組み合わせがリンパ節転移に重要な役割を担う可能性が示唆された。



参考文献

- 1) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
- 2) Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2008; 10: 13–27.
- 3) Xuan Y, Yang H, Zhao L et al. MicroRNAs in colorectal cancer: Small molecules with big functions. *Cancer Lett* 2015; 360: 89–105.
- 4) Okugawa Y, Toiyama Y, Goel A. An update on microRNAs as colorectal cancer biomarkers: Where are we and what's next? *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14: 999–1021.
- 5) Eizuka M, Sugai T, et al. *Pathol Int.* 2020; 70: 633-643.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kazuhiro Ito | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Differential Expression in the Tumor Microenvironment of mRNAs Closely Associated with Colorectal Cancer Metastasis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology | 6. 最初と最後の頁 1255-1266 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-022-12574-1 | 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 - |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|