

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460974

研究課題名(和文) 近位側大腸の鋸歯状腺腫(SSAP)に対する分子生物学的解析

研究課題名(英文) molecular biological analysis of Sessile serrated adenoma/polyp in the proximal colon

研究代表者

庄野 孝 (Shono, Takashi)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40632667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近位側大腸のsessile serrated adenoma/polyp(SSAP)から発生した大腸癌を内視鏡に切除し、顕微鏡下に、正常粘膜、SSAP、癌部とレーザーマイクロダイセクション(LMD)にて分離した。それぞれの切片より、DNA、RNAを抽出し、特にmiRNAについて網羅的に定量化を行い、正常粘膜、SSAP、大腸癌と変化した分子について解析を行った。SSAPの発がん過程で見られるmiRNAの4つの変化パターンに關与するmiRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：We resected 3 SSAPs with cancer in the proximal colon with use of endoscopic submucosal dissection (ESD). These specimens were divided into normal mucosa, SSAP and cancer, using with Laser Micro-Dissection method (LMD). DNA and RNA were extracted from each section, respectively. Especially, microRNA (miRNA) quantification was performed. We molecularly analyzed extracted miRNAs and detected variable miRNAs in a characteristic manner during the process of carcinogenesis.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 発癌 大腸ポリープ 内視鏡 消化器

1. 研究開始当初の背景

近年米国においては鋸歯状病変 (Serrated lesion: 以下 SL) が大腸癌の原因の 30% を占めると報告され、特に、近位側大腸 (盲腸、上行結腸、横行結腸) の SL から発生した大腸癌は増殖が早く、悪性度も高いため内視鏡検査時には進行した状態で発見される。このように SL は大腸癌の新たな発生母地として注目され、serrated pathway と呼ばれる SL からの発癌は、adenoma carcinoma sequence, de novo 発癌, dysplasia/colitis associated carcinoma に次ぐ第 4 の発癌経路として知られるようになってきた。通常、SL は内視鏡的には鑑別が困難なため、WHO は SL を病理学的に hyperplastic polyp, traditional serrated adenoma, sessile serrated adenoma/polyp: SSAP の 3 つに分類するように推奨した。この pathway は結腸の中でも特に近位側に起こるとされている。そのうち近位側に発生した SSAP が serrated pathway を経由して癌化することが、進行の早い大腸癌の原因の 1 つとして考えられている (Gastroenterology, 138:2088-2100, 2012)。

一方、近年、non-coding RNA 中の miRNA が発癌過程に深く関わっていることが明らかになった。miRNA はサイズが小さく RNase 分解に耐性を持つため、血中で比較的安定であることから優れたバイオマーカーとなりうる可能性も示唆されている。とりわけ大腸癌は miRNA の発現の解明が進んでいる癌腫であり、発現の高い miRNA と低い miRNA、さらには miRNA と予後との関連についての報告も散見される。しかしながら比較的新しい概念である SSAP からの発癌に関する miRNA 発現の詳細な検討は未だなされていない。

一方、当教室では肝癌の治療抵抗性を担う責任分子を同定するために、ヒト肝癌組織と非癌部組織を用い 2 次元電気泳動および LC-MS ショットガン法によるプロテオーム解析 (proteomic differential display)、ならびに cDNA アレイによるトランスクリプトーム解析 (mRNA differential

display) を行っている。現在、網羅的なディファレンシャル解析によって得られた候補責任分子に関する機能解析が進行中である (基盤研究 B、課題番号 21390230, 25293173, 研究代表者 佐々木裕)。本手法は肝癌のみならず、他の癌腫においても応用が可能である。加えて、基盤研究 B の分担研究者である荒木令江は全自動化 Auto 2D 装置を開発し、微量サンプル (蛋白量 5 µg) を用いて 2 次元電気泳動と Western blot を、従来の 10 分の 1 以下の時間と 10 倍の分離能で可能にした。本手法を用いることで微量なサンプルである SSAP のプロテオーム解析が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では内視鏡的に切除された近位側大腸 (盲腸、上行結腸、横行結腸) における鋸歯状腺腫 (SSAP) を対象に、網羅的なプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析を統合し SSAP およびそれより発生した大腸癌の分子生物学的特徴を明らかにすることを目的とする。具体的には、

近位大腸における SSAP とその背景の正常粘膜より抽出したタンパク質のプロテオーム解析を行ない、SSAP に特異的に発現する分子を同定する。鋸歯状病変内の癌を抽出し、癌部に特異的な microRNA (miRNA) を同定する。これらを統合して近位側大腸の SSAP が癌へと進展する serrated pathway の分子基盤となる責任分子を同定する。最終的には、大腸癌死亡率を抑制するために、SSAP の早期診断法や治療戦略を構築する。

3. 研究の方法

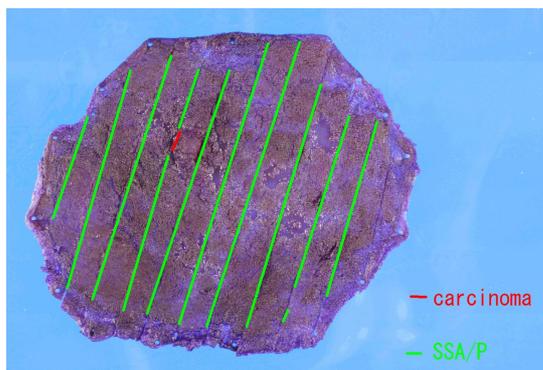
- 1) SSAP とその周囲の正常粘膜のプロテオーム解析を行い、SSAP に多く発現している、あるいは低下している特徴的な分子群を明らかにする。
- 2) SSAP と SSAP から発生した大腸癌のマイクロ RNA (miRNA) 解析を行い、癌に多く発現している、あるいは低下している特徴的な miRNA 群を明らかにする。
- 3) 1)、2) で明らかになった分子ならびに

miRNA の機能解析を行い、SSAP の分子生物学的特徴を担うかを解析すると共に、両者の連関から特徴的な分子の発現制御機構を明らかにする。

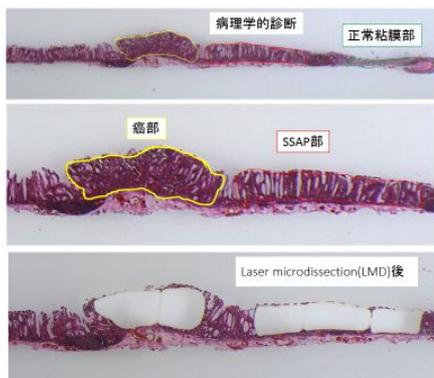
1)、2)は並行して行い、3)は 1)、2)の結果をもとに進行予定である。

4 . 研究成果

ESD にて採取した 3 検体は、病理学的にがんを合併する SSAP との確定診断に至った。



それらを用いて研究計画に基づき、切除標本を 正常組織:N、SSAP 組織:S、癌組織:C をレーザーマイクロダイセクション(LMD)により分別した。



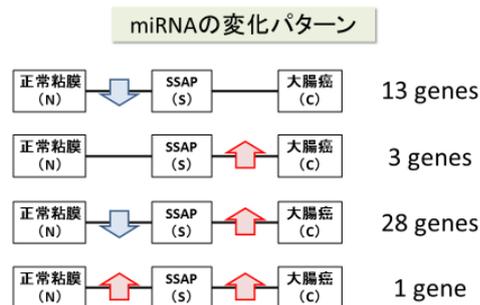
その後組織の DNA、RNA の抽出に成功した。

	RNA (10μm x 20枚) 絶対量 (ng)	DNA (10μm x 10枚) 濃度 (ng/μl)
Cancer	619.4 ng	64.0 ng/μl
SSA/P	547.3 ng	36.5 ng/μl
Normal	627.0 ng	18.4 ng/μl

miRNA の網羅的な定量化を行い、その中で N→S、S C もしくは両過程で変化した miRNA を同定した。

N→S で変化を認めたものは 13 遺伝子、S C で変化したものは 3 遺伝子、N S C で変化

したものは 2 遺伝子であった。



現在その予測 target 遺伝子が関与すると考えられる pathway の同定を行っている。今後は遺伝子発現との組み合わせを行い、各組織から RNA 抽出し cDNA マイクロアレイ解析を行う予定である。その結果と今回得られた miRNA の結果と対比し、発がん経路のさらなる絞り込みを測る予定である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

著者名 : Yoshida N, Tamaoki Y, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Shono T, Miyamoto H, Imuta M, Kurashige J, Sawayama H, Tokunaga R, Watanabe M, Sasaki Y, Yamashita Y, Baba H. 論文標題 : Incidence and risk factors of synchronous colorectal cancer in patients with esophageal cancer: an analysis of 480 consecutive colonoscopies before surgery, 雑誌名 : Int J Clin Oncol, 査読あり、第 6 巻 発行年 2016 ページ 1079-1084

DOI : [10.1007/s10147-016-1015-8](https://doi.org/10.1007/s10147-016-1015-8)

Tokunaga, R. Imamura, Y. Nakamura, K. Uchihara, T. Ishimoto, T. Nakagawa, S. Iwatsuki, M. Baba, Y. Sakamoto, Y. Miyamoto, Y. Yoshida, N. Oyama, S. Shono, T. Naoe, H. Saeki, H. Oki, E. Watanabe, M. Sasaki, Y. Maehara, Y. Baba, H.

Carbohydrate antigen 19-9 is a useful prognostic marker in esophagogastric junction adenocarcinoma
Cancer Med vol4. (11) p1659-66 2015 DOI 10.1002/cam4.514 査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

庄野孝、留置スネア EMR が困難な 0-I 型大腸腫瘍に対するはさみ型ナイフ (Clutch cutter) の有用性の検討、第 89 回日本消化器内視鏡学会総会、2015 年 5 月 31 日、名古屋国際会議場 (愛知)
庄野孝、初回内視鏡所見に基づく大腸癌リスクの層別化、2014 年 12 月 4 日、第 100 回日本消化内視鏡学会九州支部例会福岡国際会議場 (福岡)
T.Shono, Risk of advanced colorectal neoplasia development after baseline colonoscopy, Digestive Disease Week 2016, May 21 2016, San Diego, USA
庄野孝、大腸腫瘍に対する ESD 当院の現状と将来展望、第 101 回日本消化内視鏡学会九州支部例会、2016 年 6 月 24 日、ホテルはがくれ (佐賀)
T. Shono, 効率的な大腸腫瘍の発見を目指した全大腸内視鏡検査間隔の検討、Japan Digestive Disease Week 2016、2016 年 11 月 3 日、神戸国際展示場 (兵庫)
T Shono, Characteristics of interval cancers after initial colonoscopy in five years:Results from Kumamoto Colorectal Cancer Study, Asia-Pacific Digestive Disease Week 2016, Nov. 5 2016, 神戸国際展示場 (兵庫)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄野 孝 (SHONO, Takashi)
熊本大学医学部附属病院消化器内科 助教
研究者番号：40632667

(2) 研究分担者

佐々木 裕 (SASAKI, Yutaka)
熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科
教授
研究者番号：70235282

直江秀昭 (NAOE, Hideaki)

熊本大学医学部附属病院消化器内科 助教

研究者番号：30599246

渡邊丈久 (WATANABE, Takehisa)

熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科
助教

研究者番号：20634843

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()