

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462136

研究課題名(和文) CAGE法による新規大腸がん肺転移マーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of biomarker for colorectal cancer metastasis to lung with CAGE analyses

研究代表者

柳沼 行宏 (Yaginuma, Yukihiro)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60338415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CAGE法により、転移を伴う大腸がん症例のがん組織における網羅的発現解析を行った。その結果転移の有無により大腸がん原発巣のmRNA発現に差異が有ることが明らかとなった。肺転移症例とその他の転移症例で発現亢進している遺伝子群は一部は共通性を持つものの、それぞれに特異的と見られるものが検出された。また肺転移巣、大腸原発巣での遺伝子発現の比較から大腸がんの肺転移特異的な遺伝子を検出した。今回特定した肺転移特異的遺伝子群のマーカーとしての実用により、大腸がん肺転移の早期検出が可能になり、精度の高い医療、臨床応用の確立につながる。

研究成果の概要(英文)：We conducted an exhaustive gene expression analysis in carcinoma tissue of colorectal cancer patients accompanied by metastases, using the cap analysis of gene expression (CAGE). There were differences in genes of which expression were promoted or suppressed between the cases with and without lung metastasis. Some gene expressions were enhanced only in cases with lung metastasis, specifically. The clinical application of genes identified in this work as a novel biomarker will enable us to detect earlier and to predict lung metastasis in colorectal cancer. It should help to promote clinical diagnosis and medical care of the cancer.

研究分野：臨床系外科学

キーワード：CAGE法 大腸癌 腫瘍マーカー 肺転移 網羅的発現解析 次世代シーケンサー 転移予測マーカー

1. 研究開始当初の背景

代表者らの研究グループでは、これまで大腸がんをはじめとするがんに対する鋭敏な新規マーカー開発、また分子標的治療の可能性を探る研究を進めてきた。

がん治療における最大の課題は「死亡例のほとんどをしめる転移・再発への対応」であり、がん患者における転移の有無やその性状の把握は、予後評価や治療方法を検討する上で重要な情報となっている。

大腸がんにおいて、転移はリンパ節のほか、肝、肺に見られるが、現在は原発巣のみならず、転移巣に対しても積極的治療が選択されることが多い。すなわち大腸がんの転移では

早期発見、早期治療を行うことが患者の平均余命を向上させると考えられている。しかし転移を検出するための「転移マーカー」は存在しない。そのため一様に抗がん剤投与を施す、あるいは転移が可視的となってから治療が行われるのが現状である。

このような事情から、転移を予測可能な、あるいは早期発見するために有効な「転移マーカー」の開発が、今後の大腸がん治療の進歩をもたらすものと考えられる。

大腸がんの転移の検出・診断、さらに転移予測が可能となる新規マーカーの創出を目的に、大腸がんにおける転移特異的な遺伝子を探索する際には、転移の有無によるゲノム DNA 上での反復数変化・欠失など遺伝子異常の出現頻度の差異の検出、あるいは mRNA の転写レベルの差異を網羅的に調べるなどが有効と考えられる。

代表者らは、大腸がんの転移のある患者、転移の見つからない患者の原発巣（大腸）組織におけるゲノム DNA の異常の CGH マイクロアレイによる解析による検出、さらに CAGE 法（Cap Analysis Of Gene Expression 法）を用いることにより肺転移特異的に発現亢進する遺伝子を特定することによって、今までに開発されることのなかった新たな診断マーカーの開発を目的とする研究を構想した。

とくに CAGE 法は、遺伝子の転写開始点を網羅的に解析する新しい手法である。

次世代シーケンサー（NGS）登場以前に完全長 cDNA を作成する技術が開発され、Sanger 法による大規模な cDNA 解析プロジェクトが行われたが、この技術のコアとなる手法を用い CAGE 法が生みだされている。

deep CAGE 法を用いた FANTOM4 プロジェクトでは、ヒト単球系細胞株 THP-1 における増殖停止と分化についての転写開始点の使用頻度の動態がゲノム全域にわたり経時的に測定され、重要な転写制御因子、およびその時間依存的な活性と下流の遺伝子が同定された。また siRNA によるノックダウンを体系的に行うことにより、制御ネットワークにおける各因子の役割が確認された。

さらに、ヒトゲノムのうち、タンパク質をコードしている部分以外でゲノムの 80%に

わたる領域に着目し、転写領域、転写因子結合領域、クロマチン構造、ヒストン修飾などについて網羅的な解析を行うことにより、遺伝子の発現調節に関する新たな事実が多数発見されている。CAGE 法はこのプロジェクトのなかで、転写開始点の定量的解析技術として重要な役割を担った（The ENCODE Project Consortium, *Nature* 489, 57-74, 2012）。

CAGE 法の適用によって未注釈の新規遺伝子を含め、全ての遺伝子の転写開始点を検出することが可能である。また患者サンプルにおいても、さまざまな組織ごとに m-RNA 発現レベルの違いを比較することができる。代表者らはこの CAGE 法を適用し、大腸がんにおいて転移特異的に発現レベルの高い遺伝子を標的とした、新たな転移マーカーの開発を計画するに至った。

2. 研究の目的

代表者らはこれまでに、大腸がん遺伝子・ゲノム異常の相関性を研究し、鋭敏な新規マーカー開発、分子標的治療の可能性を探り研究成果を上げてきた（Yaginuma, Unotoro et al. *J Int Med Res.* 34: 390-396, 2006; Unotoro J, Yaginuma Y et al., *J Int Med Res.* 34: 397-405, 2006.）

近年、大腸がんの抗がん剤治療は著しく進歩し、生存期間中央値は3年と約2倍に延長した。また大腸がんにおいては肺や肝臓への転移巣を手術で切除することでよい予後が期待できることが判明している（柳沼・小見山ら、癌治療学会 2013 年）。しかし一般に画像診断による転移巣の早期発見は難しく、経時的に観察してある程度大きくなった段階で診断、治療となることが多く、治療が遅れる原因になっている。

一方大腸がんの原発巣の手術後、遠隔部位にがんと思われる病変が認められた場合、そのがんが大腸がんの転移によるものであるか、原発性あるいは他のがん由来の転移であるかによって、最適な治療法は全く異なる。

現在困難である CT でとらえることのできない大腸がんの転移の早期診断が容易になれば、抗がん剤や外科手術療法を含む治療に大きな改善効果をもたらすと予想される。とくに侵襲性の少ない方法で、早期の発見・診断が可能になれば、寛解率、余命の向上に加え患者の QOL を重視した個別化医療の進展がもたらされると考える。

代表者らは、これまでに大腸がんの転移の検出・予測マーカーを開発することを目指すこととした。大腸がんの転移症例で特異的に発現亢進する遺伝子が存在すれば、転移マーカー候補として有望である。

転移の中でもとくに代表者らは肺転移に着目した。代表者らの大腸がん肺転移症例の研究において、肺転移の有無や肺転移部切除手術の有無によって予後が大きく左右されることが明らかとなってきている（2013 年

10月11日,癌治療学会,柳沼,小見山ら). 肺転移はCTなどの画像診断において他の病変との鑑別も困難であることが早期診断の妨げとなっている.

本研究ではまず大腸がんの臨床検体を用い,まず大腸がんにおける染色体,ゲノムレベルの遺伝子異常と転移の関係を解析した.

次に大腸癌特異的に高発現する遺伝子の検出を試みた. つぎに次世代シーケンサーを用いたCAGE法によって転写開始点解析を行い,大腸がんの転移症例で特異的に高発現する遺伝子の抽出を試み,大腸がんの転移予測マーカー候補遺伝子を抽出した. CAGE法の適用により,網羅的に検出した個々の遺伝子のm-RNA発現量の計測が各検体ごとに可能となった.

この結果を踏まえ,我々はさらに大腸がんの遠隔転移の中でもそれぞれの転移に特異的な遺伝子群の検出を試みた. すなわち大腸がんの転移症例特異的に発現亢進がみられる遺伝子のなかでとくに肺転移のみ特異的に高発現する遺伝子,また発現が低下する遺伝子の特定に挑んだ. 前者は大腸がんの転移予測マーカー遺伝子の候補となる.

肺転移特異的に発現亢進する遺伝子は大腸がんの肺への転移メカニズムに介在する可能性が高いと思われる.

以上要するに,代表者らは大腸がんの転移に特異的に発現亢進する遺伝子を特定することにより,大腸がんの転移の検出・予測マーカーを創出することをめざした. 転移器官に特異的な発現亢進遺伝子のうち,とくに肝転移に特異的に発現亢進する遺伝子を検出,大腸がんの肺転移の診断・予測マーカーの開発を目標とした.

以上で得た転移診断・予測マーカーを用いることにより既存の診断法よりも精度の高い早期診断法の開発が可能となる.

3. 研究の方法

1) 大腸がんは他のがんと違い,肺や肝臓に転移したがんを手術で切除すると比較的予後がよいことが判明している(癌治療学会,2013年)ため,肝・肺切除を行なう機会が多い. たとえば特に転移性肺がんの手術適応の半数以上は大腸がんであり,検体の確保は他のがんに比べて容易である. 本研究では大腸がん患者から得た転移症例と非転移症例の冷凍保存検体を用いて実験・解析を行った.

1) まず大腸がんにおける転移特異的な染色体・遺伝子異常の存在を確認した.

大腸がんの転移のある患者,転移の見つかっていない患者の原発巣(大腸)組織におけるゲノムDNAの異常をCGHマイクロアレイにより解析した.

大腸がん原発巣の凍結組織から切片を作成,正常細胞を除去しがん細胞のみを残した. このがん細胞からゲノムDNAを抽出,制限酵素で処理後,蛍光標識した. こ

のDNAは精製,hybridization mixに溶解,変性処理後,ヒトゲノムを網羅したWhole Genome DNA Microarrayを用いてマイクロアレイ解析を行った(see Kawai, Komiyama et al, *Oncol Lett*, 2016).

大腸がん特異的に欠失・増幅がみられた染色体のうち幾つかを選び,異常のタイプと転移の有無との関係をクラスター解析により明らかにした.

2) 次に,次世代シーケンサーを用いた転写開始点の発現解析を行った.

即ちCAGE法の適用により,大腸がん特異的にm-RNAの発現亢進がみられる遺伝子群を特定,次に転移の有無による発現亢進の差異を解析し,転移症例特異的な遺伝子群を抽出した.

また転移症例におけるmRNA発現の比較解析を行い,亢進のレベルが高く,肺転移症例で高発現する遺伝子の抽出を試みた.

さらに肺転移巣発現の解析を行い転移で高発現する遺伝子群を検索した.

また原発性肺がんでの遺伝子の発現解析を行い,大腸がんの肺転移での遺伝子発現の差異を解析した. 肺転移マーカー候補の絞込みを行った.

具体的な手法は以下のとおりである.

がん組織よりRNAの抽出:

順天堂大学に保存してある検体を使用した. 凍結保存してある検体を3mm角に切り分けた. その際,一部の検体は病理標本を作製し,最もがんの多い部位を切り分けてくるようにした.

病理標本になったスライドは病理でがん細胞が占有していることを確認した.

3mm角の検体よりRNAeasy kitを使用しRNAを抽出した. このときRNAの精度は全RNA 5 μ gを標準発出量とした.

ライブラリ調製:

以下の手順で行った. 逆転写反応(ライフテクノロジー社製SuperScript)

酸化反応 ビオチン化反応 RNase
反応 Cap-trap クオリティーチェ

ック(QC) 5'アダプターライゲーション 3'アダプターライゲーション 二

本鎖合成 USER と Exo I 消化

QC: シークエンスライブラリとしてのチェック イルミナ社製NGS用ワンショットローディング.

CAGEデータの処理:

ライブラリ調製に使用されるアダプターなどの配列,rRNAに該当する配列をCAGE専用ソフトウェアTagDust,rRNA dustで取り除いた. その後,配列をリファレンスゲノム上にマッピングした. マッピングされたCAGE配列を複数のクラス

ターにグループ化した。データはワークフローシステム MOIRAI を使用し解析した。

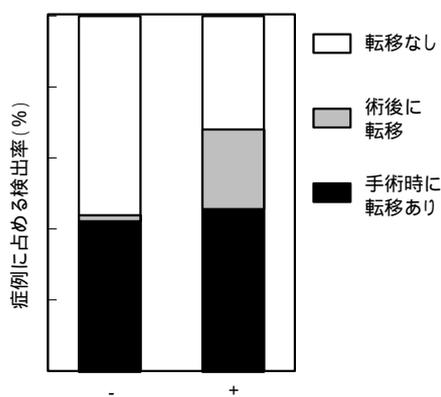
プロモーター解析：

CAGE ピークはゲノム上の転写開始点にあるためオルタナティブプロモーターの使用頻度を両群間で比較解析した。同時に、両群間でプロモーターの使い分けが行われている遺伝子の抽出を試みた。

4. 研究成果

遺伝子群のゲノム増幅と、大腸がんの転移に關与する頻度を明らかにすると共に、転移患者における遺伝子増幅とがん転移の相関を明らかにするため、転移の有無や浸潤のレベルが判定可能な遺伝子の選別を行った。

その結果、遺伝子の欠失と転移の有無には一定の關係があることが確認された。たとえば17q上の遺伝子の欠失は転移のない患者よりも転移のある患者において有為に高頻度に出現する。すなわちこの遺伝子座に含まれる遺伝子群が転移を抑制する可能性が高いと考えられた。(下図：Kawai, Komiyama et al, *Oncol Lett*, 2016)



図：遺伝子の欠失と転移の關係例
様々な変異グループを、17qの欠失なし(-)、欠失あり(+))に
てまとめた例、両群間で肝転移の率に有意な差異が
認められた(P=0.023)。なお原発巣切除時ではなく術後の
転移・再発率が17q欠失群で高い(Kawai et al 2016を改変)。

一方、遺伝子のコピー数の増加については、欠失に比べると転移との相関性は顕著とはいえなかった。大腸がんの転移マーカー開発のうえでゲノム遺伝子のコピー数の増大より実際の転写レベル、すなわち m-RNA の発現レベルに着目することが有効と考えられた。

次に代表者らは CAGE 法を適用し肺転移症例、非肺転移症例の大腸がん検体を使用し転写開始点発現解析を行った。

その結果、大腸がんの転移のある症例・ない症例の原発巣の mRNA で、発現レベルの高い遺伝子、低い遺伝子に差異を認めた。

m-RNA 発現レベルが健康な大腸粘膜組織よりも上昇する遺伝子、低下する遺伝子は転

移のある症例、ない症例で共通のものが多かった。しかし一部の遺伝子は、転移症例特異的に高発現が認められた。転移特異的に高発現する遺伝子群のうち特に亢進レベルが高いものを転移マーカー候補として特定した。

次に肺転移症例において特異的に m-RNA の発現レベルが高い遺伝子を検索した。肺転移症例で亢進している遺伝子群の一部に共通する遺伝子が含まれていたが、肺転移症例に特異的と見られる遺伝子群の存在が明らかになった。

また転移巣の mRNA 発現の解析を行った。原発巣と比較したとき、原発巣のみ、あるいは転移巣のみで高レベルの発現亢進が認められる遺伝子も存在していた。(以上、未発表データ)。

以上の過程で着目した遺伝子について、高発現する頻度、発現レベルを検討、肺転移特異的に発現レベルの高い遺伝子の絞り込みを行った。大腸がんの肺転移マーカー候補遺伝子を特定した。この遺伝子は今後、肺転移マーカーとしての開発・応用が期待される。さらにこの遺伝子は肺転移の誘発に介在している可能性があり、肺転移メカニズムの解明、治療法開発の上でも重要であると考えられる。

一方、転移群で高発現する遺伝子群にくらべ少数であるものの、とくに転移群で発現量の低い遺伝子も本研究により検出、特定されている。これらの遺伝子については転移抑制に係る可能性が高く今後の研究課題として重要である。

肺がんにおいても CAGE 解析を進め肺扁平上皮がん、肺腺がんにおいて mRNA の転写レベルが高い遺伝子群をバイオマーカーとして特定したことなど(Takamochi, Omiya et al, *BMC cancer* 2016, Takamochi, Mogushi et al, *PloS one* 2017)からも、今後遺伝マーカーを用いた肝臓がんの肺転移と原発性肺がんの識別も可能になると考えられる。

今回新たに特定した大腸がん転移特異的に高発現がみられる遺伝子、また特に肺転移症特異的遺伝子について血液検体の分析(RNA 解析、蛋白解析)による同定作業を進めており、大腸がんの転移検出・予測血中マーカーとしての確立を目指し研究を進めている。

以上の成果は目下、論文としての公表準備を行っているほか、知財取得のため特許申請も進めている。研究成果をもとに大腸がんの転移マーカー判定キットの開発も検討している。

本研究で特定した大腸がんの転移マーカーは、病巣と転移による所見に依存した既存の stage 分類とは異なる、生検の遺伝子検査

をもとにした指標作成，転移予測指標作成に役立つと考えられる。さらに今後の研究進展により，大腸がんの診断・治療法の進歩・創薬などが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

Takamochi K, Ohmiya H, Itoh M, Mogushi K, Saito T, Hara K, Mitani K, Kogo Y, Yamanaka Y, Kawai J, Hayashizaki Y, Oh S, Suzuki K, Kawaji H. Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *BMC Cancer*. 16-760: 1-10, 2016 査読有.

Kawai M, Komiyama H, Hosoya M, Okubo H, Fujii T, Yokoyama N, Sato C, Ueyama T, Okuzawa A, Goto M, Kojima Y, Takahashi M, Sugimoto K, Ishiyama S, Munakata S, Ogura D, Niwa S, Tomiki Y, Ochiai T, Sakamoto K: An impact of Chromosome 17q deletion in the primary lesion of colorectal cancer on liver metastasis, *Oncology Letters* 12(6): 4773-4778, 2016 査読有.

Tomiki Y, Ono S, Aoki J, Takahashi R, Ishiyama S, Sugimoto K, Yaginuma Y, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Sakamoto K: Treatment of internal hemorrhoids by endoscopic sclerotherapy with aluminum potassium sulfate and tannic acid. *Diagn Ther Endosc*. 2015: 517690 (7 pages), 2015 査読有

Takahashi M, Niwa K, Ishiyama S, Sugimoto K, Komiyama H, Yaginuma Y, Kojima Y, Goto M, Okuzawa A, Tomiki Y, Sakamoto K: An effective 5-fluorouracil, lefolinate, and oxaliplatin therapy for recurrent breast cancer: a case report. *J Med Case Rep*, 8: 234 (6 pages), 2014 査読有.

伊藤慎吾, 市川亮介, 呉一眞, 本庄薫平, 青木順, 岡澤裕, 水越幸輔, 盧尚志, 河合雅也, 嵩原一裕, 大久保はるな, 石山隼, 杉本起一, 小見山博光, 高橋玄, 柳沼行宏, 小島豊, 五藤倫敏, 富木裕一, 坂本一博: 盲腸癌術後リンパ節転移に対して XELOX + Bevacizumab 療法後 CR を得られた 1 例. *癌と化学療法*. 41(11):1425-1428, 2014 査読有.

[学会発表](計 15 件)

Takamochi K, Oh S, Matsunaga T, Suzuki K: The prognostic impact of EGFR mutation status and mutation

subtypes in patients with surgically resected lung adenocarcinomas. 17th WCLC · Vienna · 2016/12/4-7

Okubo S, Mizukoshi K, Okazawa Y, Haeno H, Komiyama H, Saeki H, Ito Y, Gotou M, Watanabe S, Sakamoto K, Orimo A: Multicellular tumor clusters seed metastases in colon patient derived tumor xenografts. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 日~8 日(神奈川県横浜市)

呉一眞, 細谷理樹, 塚本亮一, 伊藤慎吾, 本庄薫平, 岡澤裕, 水越幸輔, 宗像慎也, 石山隼, 杉本起一, 神山博彦, 小見山博光, 高橋玄, 柳沼行宏, 小島豊, 五藤倫敏, 奥澤淳司, 富木裕一, 坂本一博, 大永崇: Polymeric CTC-chip を用いた大腸癌 CTC の検出. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016 年 4 月 15 日(大阪府大阪市)

水越幸輔, 岡澤裕, 門脇奈穂美, 小見山博光, 小島豊, 五藤倫敏, 垣生園子, 樋野興夫, 折茂彰, 坂本一博: Metastatic seeding of patient-derived colon cancer cells maintaining epithelial or mesenchymal trait. 第 70 回日本消化器外科学会総会. 2015 年 7 月 15 日~17 日(静岡県浜松市)

Okazawa Y, Mizukoshi K, Komiyama H, Fujii T, Goto M, Hino O, Sakamoto K, Orimo A: Patient-derived colon carcinoma cells disseminate into distant organs in various different fashions. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月 8 日~10 日(愛知県名古屋市).

[その他]

ホームページ

順天堂大学 下部消化管外科

<http://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/daicho/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

柳沼行宏 (YAGINUMA. Yukihiro)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号: 60338415

(2)研究分担者

小見山博光 (KOMIYAMA, Hiromitsu)

順天堂大学・医学部・講師

研究者番号: 30348982

(3)研究分担者

高持一矢 (TAKAMOCHI, Kazuya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 30397369

(4)研究分担者

河合純 (KAWAI, Jun)

理化学研究所・予防医療・診断技術開発
プログラム・副プログラムディレクター

研究者番号：30391923