169　大腸癌転移形成に関与するあらたなエピゲノム解析	奥川　喜永

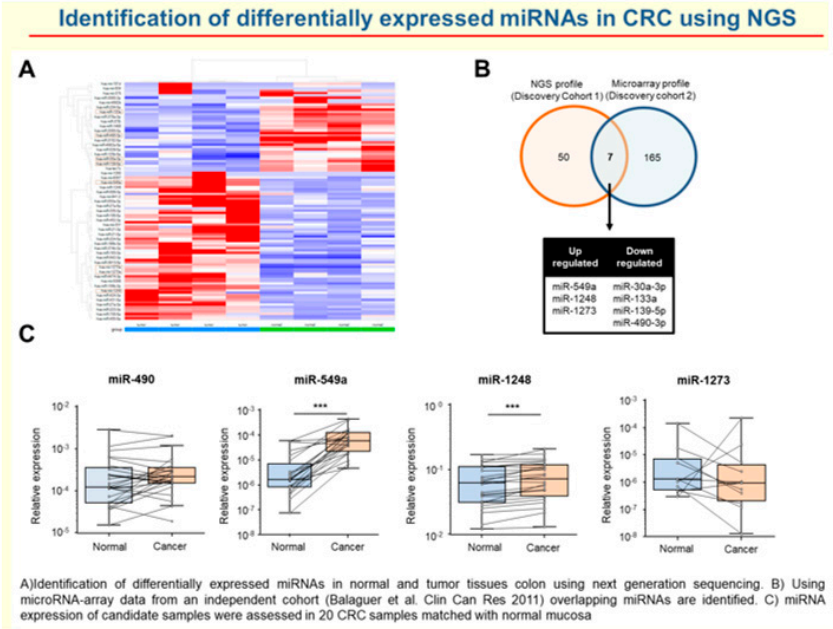
【目的】大腸癌の予後は依然不良であり、遠隔転移再発を早期に発見するのみならず、転移再発高リスク患者を選別する新たなバイオマーカーの確立や、転移そのもののメカニズムを解明することによる転移抑制の新たな治療法の開発が急がれる。本研究は、様々な発癌・転移過程において大腸癌発癌・転移に関与するあらたな Epigenetic change を同定し、新たな Biomarker の確立と、癌進展機序解明からの新規治療法開発を目的とする Two way approach を行い、現在、極めて予後不良な経過をたどる大腸癌患者の予後・QOL の向上を目指すことを目的とする。

【方法】大腸癌組織ならびに正常粘膜を用いて同定した新規 non-coding RNA の発現解析を行うことによる臨床的意義をあきらかにするとともに、その機能解析を *in vitro*／*in vivo* analysis を行い解明した。

【結果】癌組織において特異的に発現上昇する ncRNA としては miR-549a が同定され、この発現変化は 3 つのコホートで validation 可能であった。また miR-549a 高発現は、深達度、脈管侵襲、リンパ節転移陽性、遠隔転移陽性と有意に相関し、全生存期間、無再発生存期間の独立した予後不良因子であった。miR-549a 発現低低下は、大腸がん細胞株の増殖能、浸潤能、遊走能、アノイキス抑制性を抑制する一方、miR-549a 過剰発現は、それらの oncogenic role を促進しがん抑制遺伝子の一種を発現調節する可能性が示唆された。一方、miRNA 以外の ncRNA として circRNA-X が癌組織特異的には発現低下し、発現低下群は有意に全生存期間、無再発生存期間において予後不良であった。

以上のことから、大腸癌発癌・転移進展に、特異的に様々なエピゲノム変化が関わる可能性が示唆された。

miR-549a の発現解析と機能解析



A)Identification of differentially expressed miRNAs in normal and tumor tissues colon using next generation sequencing. B) Using microRNA-array data from an independent cohort (Balaguer et al. Clin Can Res 2011) overlapping miRNAs are identified. C) miRNA expression of candidate samples were assessed in 20 CRC samples matched with normal mucosa

169. 大腸癌転移形成に関与するあらたなエピゲノム解析

奥川　喜永

三重大学 大学院医学系研究科 消化管・小児外科学講座

Key words：大腸癌，エピゲノム，バイオマーカー

緒　言

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。アメリカでは 20 年間の一次予防の推進により、ある程度の大腸癌死亡率／罹患率の減少は認められてはいるが、その効果はまだ小さい。そこで、大腸癌死亡を予防するには、早期発見／早期治療による二次予防が必要になってくる。現在、有用な大腸癌検診方法（一次スクリーニング検査）としては、便潜血検査があげられる。Minnesota 試験において便潜血検査を施行することで大腸癌死亡が 33%減少しており、その他にも便潜血検査が大腸癌の発生率・死亡率を減少させる報告がされ、便潜血検査の大腸癌検診における有用性が認められてきた。しかしながら、その偽陽性率の高さもさることながら、大部分の臨床試験では便潜血検査はがんの 30～50%しか発見されておらず、その偽陰性率もまた高いことから、感度・特異度ともに期待できるあらたな非侵襲的で簡易な一次スクリーニング検査の開発が急がれる。またその一方、進行大腸癌に関しては、この 10 年で著しい治療法の進捗を遂げ、診断学や外科治療の進歩もあり、大腸癌では現在約 80%で治癒切除が行われることが可能となった。しかしながら、いまだその予後は不良であり、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、転移そのもののメカニズムを解明することによる転移抑制の新たな治療法の開発が急がれる [1]。本研究は、様々な発癌・転移過程において大腸癌発癌・転移に関与する新たな Epigenetic change を同定し、新たなバイオマーカーの確立と、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 の向上を目指すことを目的とする。

方　法（or 方法および結果）

1. RNA sequencing

8 症例 16 標本の大腸癌組織ならびに周囲正常粘膜組織を用いて、Next generation sequencing を施行し、大腸癌組織特異的に発現変化をきたす ncRNA、miRNA を抽出した。

2. Quantitative PCR analysis

大腸癌ならびに正常粘膜組織の FFPE 標本より miRNeasy FFPE kit（Qiagen）を用いて抽出した RNA を使用し、Taqmann small RNA assays（Applied Biosystems）もしくは SYBR green 法を用いて qPCR を施行した。また normalizer には miR-16 を使用した。

3. 同定した新規 ncRNA の機能解析（*in vitro*）

上記にて同定した新規 miRNA は大腸がん細胞株 4 種類を使用し、miR-inhibitor、ならびに miR-mimic にて発現調節を行い、そのうえで以下の機能解析を行った。（MTT assay, Invasion assay, Migration assay, Anoikis assay）

4. 同定した 新規 ncRNA の機能解析（*in vivo*）

上記にて同定した上記にて同定した新規 miRNA を stable overexpressed cell line を樹立し、Balb nu/nun mice を用いて xenograft model を作製し、その経時的な腫瘍径の変化を評価した。

5. 同定した新規 ncRNA により発現調節しうる遺伝子の同定

上記にて miRNA の発現調節を行った細胞株から抽出した RNA より合成した cDNA を用いて cDNA array を施行し、public database とオーバーラップする標的遺伝子を同定した。さらにその発現調節細胞株を用いて再現性実験を行った。

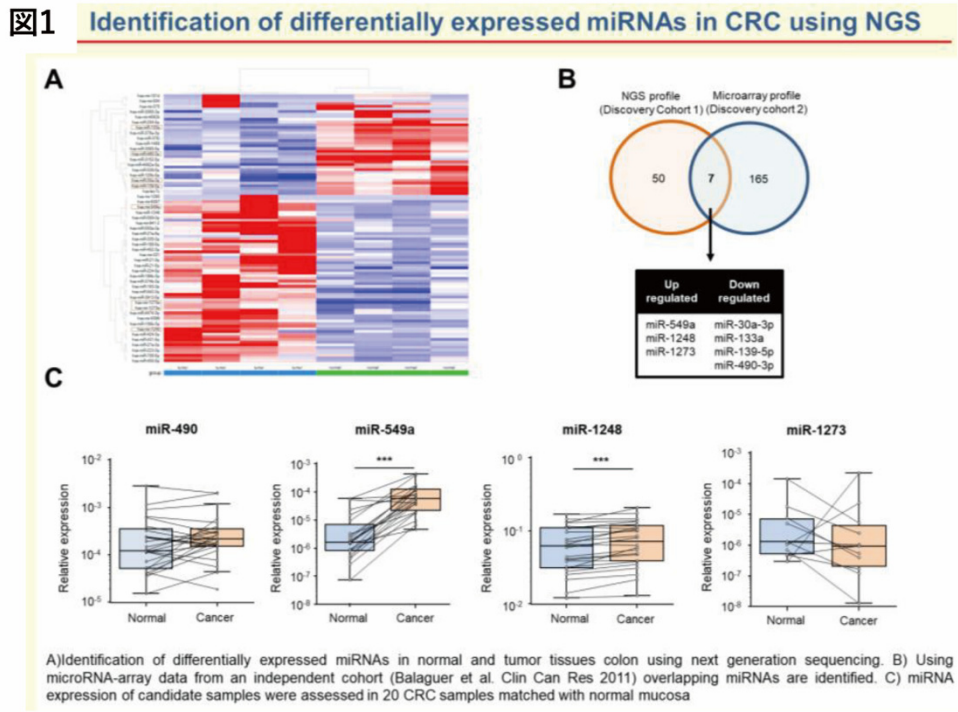
6. 術前血清を用いた定量

上記 2 にて用いた大腸癌組織コホートとマッチする術前血清を用いて、miRNeasy serum/plasma RNA extraction kit で RNA を抽出し、quantitative PCR にて新規 miRNA の定量を行った。Normalizer には U6 を用いて ddCt 法で定量した。

結果および考察

1. 新規 ncRNA の同定

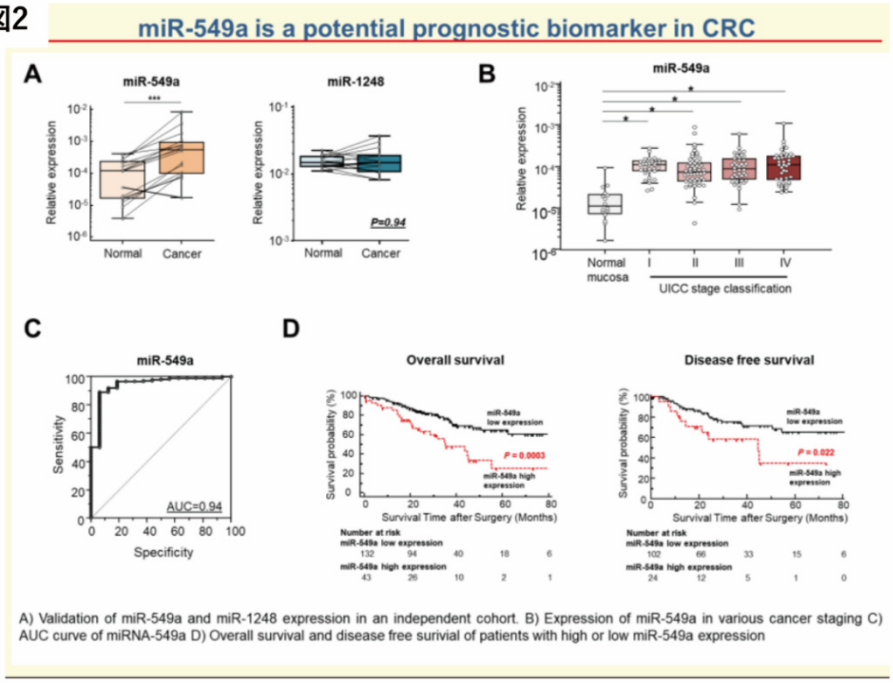
RNA sequencing の結果からは circular RNA を残念ながら同定できなかったが、新規 miRNA の同定は可能であり、そのうち以前我々が施行した miRNA array data と overalpp する 4 つの miRNA に着目し、実験を進めた。これら 4 つの miRNA、miR-490-3p、-549a、-1248、-1273a、を second cohort を用いて発現解析すると miR-549a と miR-1248 は癌組織特異的に発現増加を認めた（図 1）。



A)Identification of differentially expressed miRNAs in normal and tumor tissues colon using next generation sequencing. B) Using microRNA-array data from an independent cohort (Balaguer et al. Clin Can Res 2011) overlapping miRNAs are identified. C) miRNA expression of candidate samples were assessed in 20 CRC samples matched with normal mucosa

さらにこれを third cohort を用いて再度発現解析をすると miR-549a のみ癌組織特異的に発現増加をきたし、また miR-549a 高発現は、深達度、脈管侵襲、リンパ節転移陽性、遠隔転移陽性と相関し、全生存期間、ならびに無再発生存期間において独立した予後不良因子となることが明らかとなった（図 2）。

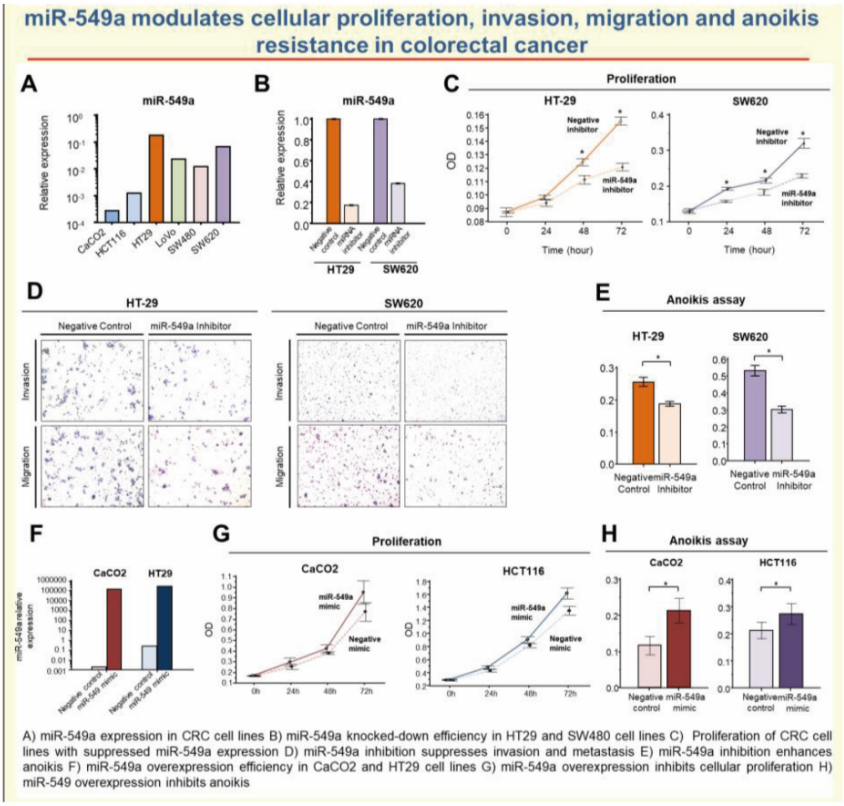
図2



A) Validation of miR-549a and miR-1248 expression in an independent cohort. B) Expression of miR-549a in various cancer staging C) AUC curve of miRNA-549a D) Overall survival and disease free surivial of patients with high or low miR-549a expression

また大腸がん細胞株 6 種の中から高発現細胞株（HT29、SW620）に、miR-549a inhibitor と negative control を lipofection 法で、siRNA transfection を行い、その機能解析を行ったところ、miR-549a 発現低下は、増殖能、浸潤能、遊走能、アノイキス抵抗性を抑制することがわかった。さらに miR-549a 低発現細胞株である CaCO2、DLD-1 に miR-549a mimic を用いて過剰発現細胞株を用いて機能解析を行うと、上記結果を validate することが可能であった。さらに miR-549a 過剰発現細胞株を用いてヌードマウスに皮下移植を行うと、コントロール細胞株と比較し、増殖能が優位に更新することが明らかとなった（図 3）。

図3



A) miR-549a expression in CRC cell lines B) miR-549a knocked-down efficiency in HT29 and SW480 cell lines C) Proliferation of CRC cell lines with suppressed miR-549a expression D) miR-549a inhibition suppresses invasion and metastasis E) miR-549a inhibition enhances anoikis F) miR-549a overexpression efficiency in CaCO2 and HT29 cell lines G) miR-549a overexpression inhibits cellular proliferation H) miR-549 overexpression inhibits anoikis

miR-549a 発現抑制細胞株より抽出した RNA より合成した cDNA を用いて cDNA microarray を行うと、コントロール細胞株と比較し、発現変化をきたす遺伝子群を同定した。これらに、public database を用いて mir-549a の predicted target genes とされるものと比較し、オーバーラップする遺伝子群を同定。これらの中から miR-549a 過剰発現させた細胞株で遺伝子発現が低下するがん抑制遺伝子 X の同定に施行しており、現在、さらなる機能解析を進めている。なお、miR-549a は大腸癌組織特異的に発現上昇をきたす miRNA であったことから、血液を用いた非侵襲的早期診断マーカーへの転用の可能性を考慮し、上記 2 で使用した大腸癌組織コホートの術前血清より RNA を抽出し、miR-549a の発現解析を行ったが、健常人と比較し、大腸癌症例群で有意な発現変化を認めず、非侵襲性マーカーとしての転用は困難であることがわかった。

また上記 miRNA 以外の ncRNA　とくに cirRNA の発現解析も網羅的解析ではなく、これまでに報告された他癌腫の報告などをもとに行っている。Cir-7 が、大腸癌組織において発現増加をきたし、予後マーカーとなるほか、miR-7 の sponge として働く可能性を報告した。またそれ以外の circRNA-X の発現低下群が有意に予後不良となる可能性を確認したが、circRNA はその遺伝子の形状から、host gene ではなく circRNA 特異的に発現抑制をするのが困難であるため、現在も機能解析を行ううえで基礎実験を継続している。

共同研究者・謝辞

本研究において、技術面ならびに研究遂行における指導をいただいた三重大学大学院消化管小児外科学・問山裕二講師ならびに楠正人教授に、この場を借りて謝辞とさせていただきたいと思います。

文　献

1)　Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Gastroenterology. 2015 Oct;149(5):1204-1225.e12. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.07.011.