

令和元年5月21日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26293301

研究課題名(和文) 大腸癌発癌pathwayから検証した大腸癌前癌病変の非侵襲的血清診断法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of non-invasive biomarker for early detection of colorectal cancer

研究代表者

楠 正人 (Kusunoki, Masato)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50192026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は複数の大腸癌発癌過程(前癌病変から癌病変)特異的microRNAsを網羅的解析し、分泌されたそれらのmicroRNAsが血清で検出できるか否かを検証することで、あらゆる癌発生過程を踏まえた散発性大腸癌の血清早期診断マーカーを同定することである。実際、我々は血液検体を用いた網羅的解析からmiR-1290を同定し、血清miR-1290発現を用いた大腸癌患者、大腸腺腫患者の診断能はそれぞれAUC=0.83, AUC=0.718であり、極めて有効な大腸癌早期診断血清マーカーであった。さらに大腸癌患者における組織miR-1290高発現なら発現に比べ良好な予後診断マーカーであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果を用いることで、大腸癌ならびにその前駆病変を早期に診断・同定しうる可能性が考慮された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify non-invasive diagnostic biomarker for colorectal cancer. Array-based comprehensive analysis demonstrated that miR-1290 was one of candidate for diagnostic marker in CRC patients, and we validated diagnostic potential of serum miR-1290 using serum specimens from patients with adenoma and CRC. Surprisingly, serum miR-1290 could identify patients with adenoma or CRC with high accuracy (AUC=0.83, 0.718, respectively).

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 早期診断 バイオマーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における大腸癌患者数は他の癌と同様に高齢化と相まって年々増加している。厚生労働省の人口動態調査によると、大腸癌による死亡数は男女合わせて2009年は42,434人で、2008年の43,011人から少し減少したが、悪性新生物の中では肺癌、胃癌に次いで3番目に多く、女性では2003年以降最も死亡数が多い。大腸癌罹患数は2004年の男性57,078人、女性40,977人、合計98,055人で臓器別で胃癌に次いで、女性は乳癌に次いで2番目に多い。したがって、大腸癌の死亡数を減らすため、更には大腸癌治療に関わる全ての医療費(手術、抗癌剤など)の削減のためには、大腸癌を前癌病変の段階(大腸ポリープ:腺腫)で診断し、内視鏡的切除(ポリープ、腺腫切除)を施行することで大腸癌患者を抜本的に減らすことが極めて重要である。2007年度の大腸癌検診者数は約717万人で12,284人の大腸癌が発見されているが、全国の大腸癌検診率は2007年度で18.8%と低い状態が続いている。大腸癌早期診断に関しては、化学法、免疫法を用いた便潜血反応検査が複数の無作為比較試験によって死亡率減少効果が証明されている。癌遺伝子診断(便中DNA変異、診断システムが考案されつつあるがコスト、安全性、効果など総合的な評価では便潜血反応を凌駕するものは確立されていない。しかしながら癌診断の特異度、感受性はともに満足できるものではなく、とりわけ前癌病変の大腸腺腫に対する診断能はきわめて低いのが現状である。また便潜血検診受診率が極めて低い(コンプライアンスが低い)ことに加え、偽陽性率が極めて高いことである。さらに、陽性と判断された方の精密検診率(侵襲的な大腸内視鏡、注腸検査)の低さが挙げられる。

2. 研究の目的

Non-coding RNAs の一種である細胞内の microRNAs は生命現象の微調整役として多くの遺伝子やタンパク質発現制御に関与し、細胞の分化・増殖及び細胞死の制御に重要な役割を果たしている。近年存在が明らかとなった細胞外に放出される分泌型 microRNAs はエクソソームという小胞顆粒に包埋されているため、消化酵素が存在する血液中でも安定した状態で存在し、新たな非侵襲的バイオマーカーとして期待されている。そこで本研究の目的は、複数の大腸癌発癌過程(前癌病変から癌病変)特異的 microRNAs を網羅的解析し、分泌されたそれらの microRNAs が血清で検出できるか否かを検証することで、あらゆる癌発生過程を踏まえた散発性大腸癌の血清早期診断マーカーを同定すること。多施設共同研究にて集積中の内視鏡施行前の患者血清を用いた前向き検証試験を行い、同定した microRNAs の診断マーカーとしての精度検定を行うことである。

3. 研究の方法

● 網羅的 microRNAs array 解析

Adenoma carcinoma sequence による大腸癌発癌過程により、正常大腸粘膜に比べ有意に大腸腺腫、大腸癌で発現の高い microRNAs を microRNAs array 法により網羅的に解析する。

正常大腸粘膜(n=3)、大腸腺腫(n=3)、大腸癌(n=3)

● 大腸癌細胞株を用いた microRNA 分泌能の解析

5つの大腸癌細胞株を用い、miR-1290の発現量ならびに分泌能を検証した。

● Initial training set による組織中、血清中 miR-1290 の発現量の解析 (定量的 PCR 法)

組織: 正常大腸粘膜(n=12)、大腸腺腫(n=12)、大腸癌(n=12)

血清: 健常人(n=12)、大腸腺腫患者(n=12)、大腸癌患者(n=12)

● Validation set による組織中、血清中 miR-1290 の発現量の解析 (定量的 PCR 法) とその臨床的意義の検証

組織: 正常大腸粘膜(n=21)、大腸腺腫(n=26)、大腸癌(n=179)

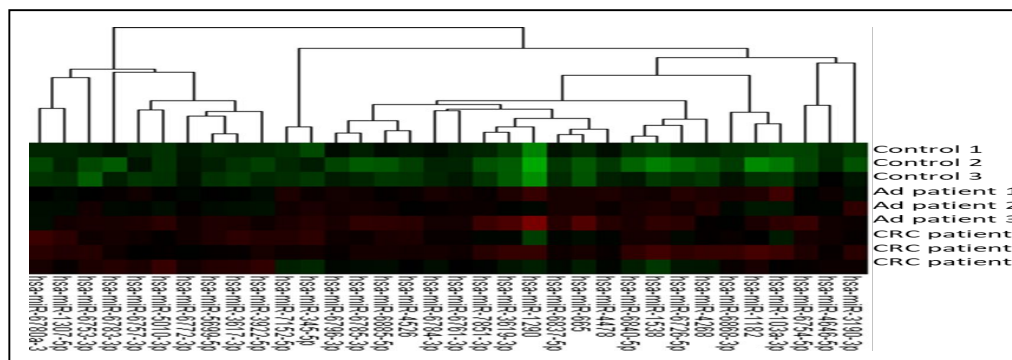
血清: 健常人(n=57)、大腸腺腫患者(n=56)、大腸癌患者(n=211)、大腸癌患者の術後血清(n=72)

上記の validation set を用いて、組織中、血清中の miR-1290 発現とその臨床的意義に関して検討した。

4. 研究成果

- 網羅的 microRNAs array 解析により、正常粘膜に比べ大腸腺腫、大腸癌で発現の高い34の microRNAs のうち、その差が最も高い miR-1290 をバイオマーカーとして着目した(図1)。

図1)



- 大腸癌細胞株のうち LoVo and SW480 は miR-1290 の発現が高いため、それらの細胞株の miR-1290 の分泌能を確認すると、細胞数、時間依存的に培養液中の miR-1290 発現が高

くなることが示され、分泌型の microRNA であることが示された。

- Initial training set では、正常大腸粘膜に比べ、大腸癌組織、大腸腺腫組織はそれぞれ有意に miR-1290 発現が高い結果であった ($P < 0.0001$, $P = 0.0002$)。同様に大腸がん患者ならびに大腸腺腫患者の血清 miR-1290 は健常者の血清に比べとも有意に発現量が高い結果であった ($P < 0.0001$ and $P = 0.0027$)。
- Validation set においては有意に大腸腺腫、大腸癌において正常大腸粘膜に比べ miR-1290 発現が高値であり、癌の進行とともに発現が高くなった。とりわけ Stage IV の組織中発現が他の Stage に比べ有意に高かった(図 3A)。一方で、血清 miR-1290 発現は健常者に比べ大腸腺腫患者、大腸癌患者で有意に高く、組織発現と同様に血清 miR-1290 は stage の進行とともに発現量が有意に高くなった(図 2A)。また、組織中 miR-1290 発現と血清 miR-1290 発現は正の相関を示し、組織由来の可能性が示唆された(図 3B)。血清 miR-1290 発現を用いた大腸癌患者、大腸腺腫患者の診断能はそれぞれ $AUC=0.83$, $AUC=0.718$ であり、極めて有効な大腸癌早期診断血清マーカーであった(図 2B,C)。さらに大腸癌患者における組織 miR-1290 高発現なら発現に比べ良好な予後診断マーカーであった(図 2D-G)。興味深い結果として、術後血清 miR-1290 発現は術前に比べ有意に低下したため、この結果も踏まえ、血清 miR-1290 の origin は組織由来であることが推測された(図 3C-F)。

図 2

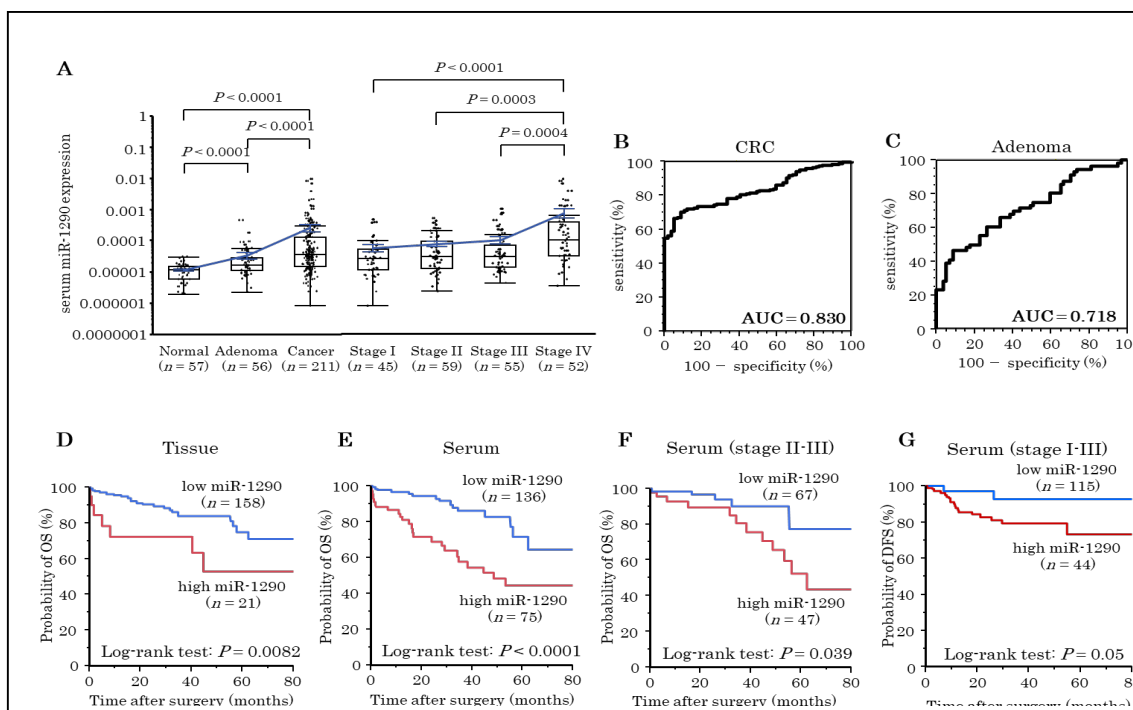
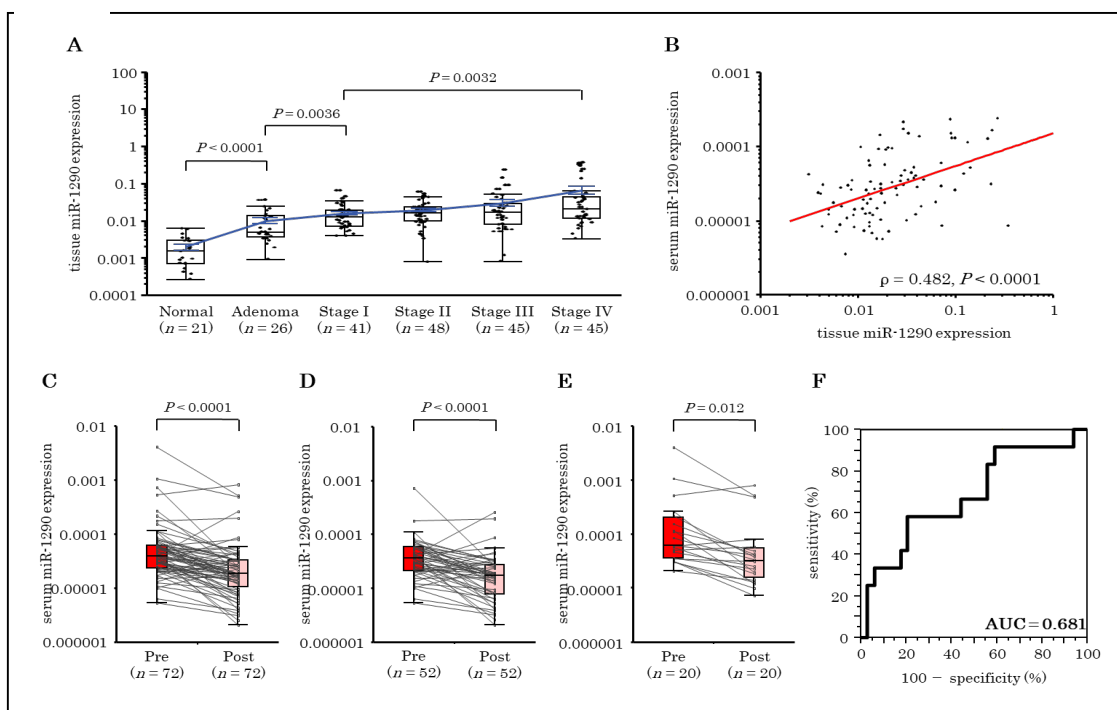


図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. MicroRNAs as potential liquid biopsy biomarkers in colorectal cancer: A systematic review. Toiyama Y, Okugawa Y, Fleshman J, Richard Boland C, Goel A. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018 Dec;1870(2):274-282 査読有
2. Prognostic impact of sarcopenia and its correlation with circulating miR-21 in colorectal cancer patients. Okugawa Y, Yao L, Toiyama Y, Yamamoto A, Shigemori T, Yin C, Omura Y, Ide S, Kitajima T, Shimura T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Kobayashi M, Tanaka K, Inoue Y, Araki T, Miki C, Kusunoki M. *Oncol Rep*. 2018 Apr;39(4):1555-1564. 査読有
3. Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in human colorectal cancer. Hur K, Toiyama Y, Okugawa Y, Ide S, Imaoka H, Boland CR, Goel A. *Gut*. 2017 Apr;66(4):654-665. 査読有
4. MiR-139-5p as a novel serum biomarker for recurrence and metastasis in colorectal cancer. Miyoshi J, Toden S, Yoshida K, Toiyama Y, Alberts SR, Kusunoki M, Sinicrope FA, Goel A. *Sci Rep*. 2017 Mar 6;7:43393. 査読有
5. Diagnostic Potential of Cell-Free and Exosomal MicroRNAs in the Identification of Patients with High-Risk Colorectal Adenomas. Uratani R, Toiyama Y, Kitajima T, Kawamura M, Hiro J, Kobayashi M, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Mori T, Kato T, Goel A, Kusunoki M. *PLoS One*. 2016 Oct 19;11(10):e0160722. 査読有
6. Circulating microRNA-1290 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in human colorectal cancer. Imaoka H, Toiyama Y, Fujikawa H, Hiro J, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Mori T, Kato T, Toden S, Goel A, Kusunoki M. *Ann Oncol*. 2016 Oct;27(10):1879-86. 査読有
7. Identification of a metastasis-specific MicroRNA signature in human colorectal cancer. Hur K, Toiyama Y, Schetter AJ, Okugawa Y, Harris CC, Boland CR, Goel A. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Feb 6;107(3). 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. サルコペニア、生活習慣病と消化器疾患 大腸癌における骨格筋量減少の臨床的意義と癌組織・血清サルコペニア関連 miRNA との相関 奥川 喜永, 問山 裕二, 楠 正人 第 104 回日本消化器病学会総会 2018
2. 大腸癌組織・血清中 microRNA 発現の直接比較による腫瘍誘導宿主サルコペニアの可能性の検討 奥川 喜永, 問山 裕二, 藤川 裕之, 廣 純一郎, 長谷川 真紀, 福永 稚子, 堀口 美穂, 松原 貴子, 丸山 一男, 荒木 俊光, 楠 正人 第 23 回日本緩和医療学会学術大会 2018
3. 臨床外科に役立つ診断と治療のイノベーション 大腸癌バイオマーカーとしての microRNAs 問山 裕二, 井上 靖浩, 田中 光司, 浦谷 亮, 森 浩一郎, 今岡 裕基, 志村 匡信, 藤川 裕之, 三枝 晋, 廣 純一郎, 小林 美奈子, 大井 正貴, 荒木 俊光, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 79 回日本臨床外科学会総会 2017
4. 大腸癌早期診断および予後マーカーとしての circulating microRNA-1290 今岡 裕基, 問山 裕二, 藤川 裕之, 三枝 晋, 廣 純一郎, 小林 美奈子, 井上 靖浩, 田中 光司, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016
5. 大腸腺腫患者の非侵襲的診断マーカー 血清およびエクソソーム micro RNA の比較検討から 浦谷 亮, 問山 裕二, 北嶋 貴仁, 森 浩一郎, 沖 哲, 今岡 裕基, 藤川 裕之, 廣 純一郎, 三枝 晋, 小林 美奈子, 大井 正貴, 荒木 俊光, 田中 光司, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 森 孝郎, 加藤 俊夫, 楠 正人 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016
6. 大腸癌における血清 miR-203 の臨床病理学的意義 問山 裕二, 浦谷 亮, 沖 哲, 川村 幹雄, 藤川 裕之, 奥川 喜永, 廣 純一郎, 三枝 晋, 小林 美奈子, 荒木 俊光, 大井 正貴, 田中 光司, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015
7. 大腸がんバイオマーカー 大腸癌における診断および予後予測マーカーとしての血清 miR-1290 発現の検討 今岡 裕基, 問山 裕二, 浦谷 亮, 森 浩一郎, 志村 匡信, 藤川 裕之, 三枝 晋, 廣 純一郎, 小林 美奈子, 大井 正貴, 荒木 俊光, 田中 光司, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 53 回日本癌治療学会学術集会 2015
8. 大腸がんバイオマーカー 大腸癌患者における転移ならびに予後診断マーカーとしての転移巣由来血清 microRNA-203 問山 裕二, 今岡 裕基, 井出 正造, 志村 匡信, 安田 裕美, 藤川 裕之, 廣 純一郎, 三枝 晋, 小林 美奈子, 荒木 俊光, 大井 正貴, 田中 光司, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 53 回日本癌治療学会学術集会 2015

〔図書〕(計 5 件)

1. 【大腸癌バイオマーカー入門】II. 各論 大腸癌の microRNA 問山 裕二 外科 (0016-593X)79 巻 13 号 Page1355-1363(2017.12)
2. 【主題 1:大腸癌診断の最前線】 分子生物学的手法による大腸癌診断 問山 裕二, 井上

- 靖浩, 楠 正人 日本大腸肛門病学会雑誌 (0047-1801)69 巻 10 号 Page480-488(2016.11)
3. 【大腸癌 update-基礎と臨床の研究動向-】 大腸癌検診の動向 分子生物学的アプローチによる新たな大腸癌検診 問山 裕二, 楠 正人 日本臨床 (0047-1852)74 巻 11 号 Page1895-1901(2016.11)
 4. 【ノンコーディング RNA の外科領域における意義】大腸癌領域における意義 問山 裕二, 楠 正人 日本外科学会雑誌 (0301-4894)116 巻 6 号 Page360-365(2015.11)
 5. 【大腸癌のバイオマーカー】 血中マイクロ RNA による大腸癌の早期診断と予後判定 井上 靖浩, 問山 裕二, 毛利 靖彦, 楠 正人 G.I.Research (0918-9408)23 巻 1 号 Page17-24(2015.02)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：問山 裕二

ローマ字氏名：TOIYAMA, YUJI

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00422824

研究分担者氏名：井上 靖浩

ローマ字氏名：INOUE, YASUHIRO

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：リサーチアシスタント

研究者番号(8桁)：20324535

研究分担者氏名：毛利 靖彦

ローマ字氏名：MOHRI, YASUHIKO

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：客員准教授
研究者番号（8桁）：70345974

研究分担者氏名：沖上 正人
ローマ字氏名：OKIGAMI, MASATO
所属研究機関名：三重大学
部局名：医学系研究科
職名：リサーチアシスト
研究者番号（8桁）：90722596

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。