

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08591

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎関連癌におけるRNAメチル化マーカーの臨床的意義

研究課題名（英文）Clinical burden of RNA methylation as a diagnostic and predictive marker for colitis-associated cancer.

研究代表者

井上 靖浩（Inoue, Yasuhiro）

三重大学・医学系研究科・客員准教授

研究者番号：20324535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：あらたなエピゲノムとしてDNA・RNAメチル化の癌化における機序が、近年相次いで報告されてきている。今回、RNAメチル化解析は、その品質不良により安定した解析結果が得られなかったものの、DNAメチル化に関しては、DNAメチル化網羅的解析を行い、その結果から、孤発性大腸癌ならびに潰瘍性大腸炎関連大腸癌特異的に高メチル化を呈するCpGサイトを同定した。また同部位のメチル化を、非癌部直腸粘膜組織検体を用いて定量を行うことで、癌合併潰瘍性大腸炎症例を診断できる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、潰瘍性大腸炎における様々な部位の大腸粘膜におけるメチル化の程度を明らかにし、さらに内視鏡検査にて簡便に評価可能かつ肛門鏡で生検可能な直腸粘膜を用い、そのメチル化のField effect/cancerizationを用いた大腸全体の癌化の状況を判別する概念を確立することはこれまでにない新しいアプローチとなる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted comprehensive methylation analysis using surgical specimens from sporadic colorectal cancer or ulcerative colitis-associated CRC, and successfully identified cancer-specific hypermethylated CpG site. Furthermore, we validated this CpG site using pyrosequencing, and showed that quantification of methylation levels using non-neoplastic rectal mucosa could identify high-risk UC patients for CRC.

研究分野：エピゲノム

キーワード：潰瘍性大腸炎 大腸癌 メチル化

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis: UC)患者は本邦約 10 万人で、年間約 4 千人が発病し、患者数は増加の一途を辿っているが、ステロイド、5-ASA に加え、近年の免疫抑制剤、生物学的製剤を中心とした内科的治療の進歩により、劇症例、内科的治療抵抗例は減少傾向を示してきた。その一方で、慢性長期経過例では、炎症を母地とした大腸癌を合併することがあり、7-8 年以上経過した全大腸炎型の累積癌化率は 30 年で 30-40%とされ、全大腸炎型の長期経過例に対しては癌合併のサーベイランスが重要となる。本邦における潰瘍性大腸炎診療ガイドラインにおいても、潰瘍性大腸炎発症から 8-10 年経過後に、年 1 回以上の全大腸内視鏡検査下の random-step biopsy あるいは拡大内視鏡を併用した有所見部位の target biopsy によるサーベイランスが推奨されている。しかしながら潰瘍性大腸炎関連大腸癌の特徴として、組織型が多発癌・低分化型であり、びまん性病変を呈するため、背景粘膜に炎症を伴うため色調での判別も困難となるため、サーベイランスの内視鏡で肉眼的発見が困難なケースも多く、癌発見時にはすでに進行癌であることも少なくないことから、低侵襲で精度の高い早期診断マーカーを確立することが重要となる。実際、我々は潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜を使用し、大腸のどの部位に比べても直腸部位で高く、病期期間に有意に相関し、癌部で有意に高い、いわゆる部位、年齢そして腫瘍依存的 DNA メチル化マーカーを複数個同定し、直腸生検組織におけるそれらのマーカーを用いた新たな癌ハイリスク群を選定するサーベイランス法を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究は潰瘍性大腸炎の癌化に関与する RNA の methylation とそれにより制御される mRNA, miRNA, ncRNA に着目し、これを網羅的に解析することで潰瘍性大腸炎癌化のメカニズムを解明し、潰瘍性大腸炎関連癌早期発見に貢献する新たなバイオマーカーの検索と RNA を用いたあらたな治療戦略を確立し、その予後・QOL の向上を目指すことを目標とする。

直腸粘膜の RNA メチル化による潰瘍性大腸炎癌化リスク診断：潰瘍性大腸炎切除例の大腸標本を用い、NGS を用いた網羅的 RNA メチル化解析を行うことで大腸部位依存的、粘膜年齢依存的かつ悪性新生物依存的メチル化遺伝子を選択する。上記スクリーニングで候補遺伝子を絞り込み、多検体で validation 後、最終的に同定遺伝子メチル化の直腸粘膜における Field effect が潰瘍性大腸炎癌化ハイリスク症例の選別に有効か評価する。

糞便中、循環 cell free RNA・exosomal RNA メチル化解析を用いた癌合併潰瘍性大腸炎患者診断：潰瘍性大腸炎切除例の大腸標本を用い、網羅的メチル化解析を行うことで非癌粘膜に比べ癌部で有意にメチル化している遺伝子群を候補として選択する。癌合併ならびに非合併潰瘍性大腸炎患者の糞便、術前血清から RNA を抽出し、候補 RNA メチル化マーカーの定量を行い、癌合併潰瘍性大腸炎患者診断に有効かを検証する。

3. 研究の方法

RNA・DNA 抽出：UC 関連癌組織(15 例)、UC 患者直腸粘膜(15 例)、UC 患者上行結腸粘膜(15 例)の FFPE より RNA(Qiagen)と DNA (Qiagen) を抽出した。また本研究に付随し、潰瘍性大腸炎のみならず孤発性大腸癌における手術検体(150 例)の癌組織と正常大腸粘膜組織より RNA と DNA を抽出した。

バイサルファイト処理：RNA と DNA をバイサルファイト処理を施行し、Bisulfite RNA と DNA を作成した。

網羅的メチル化解析

上記にて抽出した BisulfiteDNA を用いて、マイクロアレイでの網羅的メチル解析を施行した。

パイロシーケンシング

網羅的解析にて同定された CpG サイトを候補メチル化サイトとして、パイロシーケンサーを用い、潰瘍性大腸炎約 60 例、潰瘍性大腸炎関連癌 20 例、孤発性大腸癌 200 例のメチル化定量解析を行い、その臨床的意義を解析した。

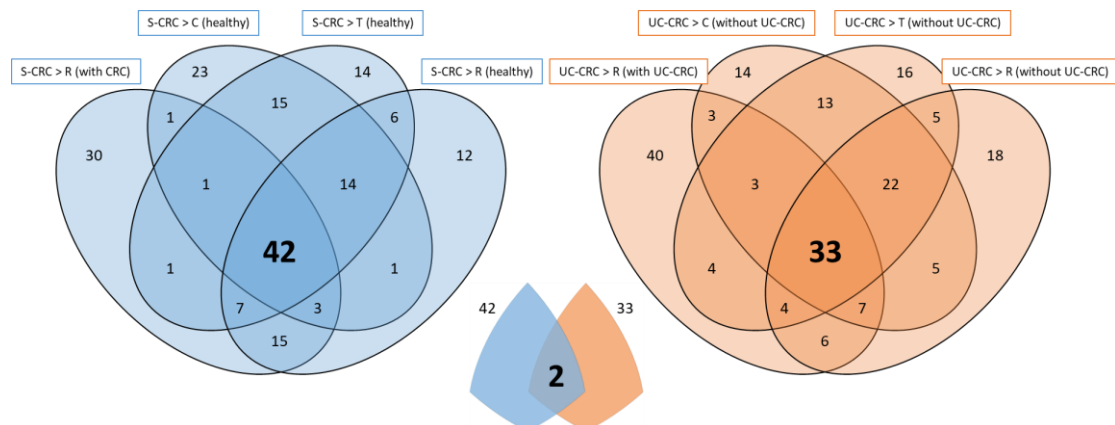
デジタル PCR 解析

術前血清を用いたメチル化定量解析を目的に、CpG サイトを標的としたプライマーセットを作成し、デジタル PCR でのバイオマーカー開発を行った。

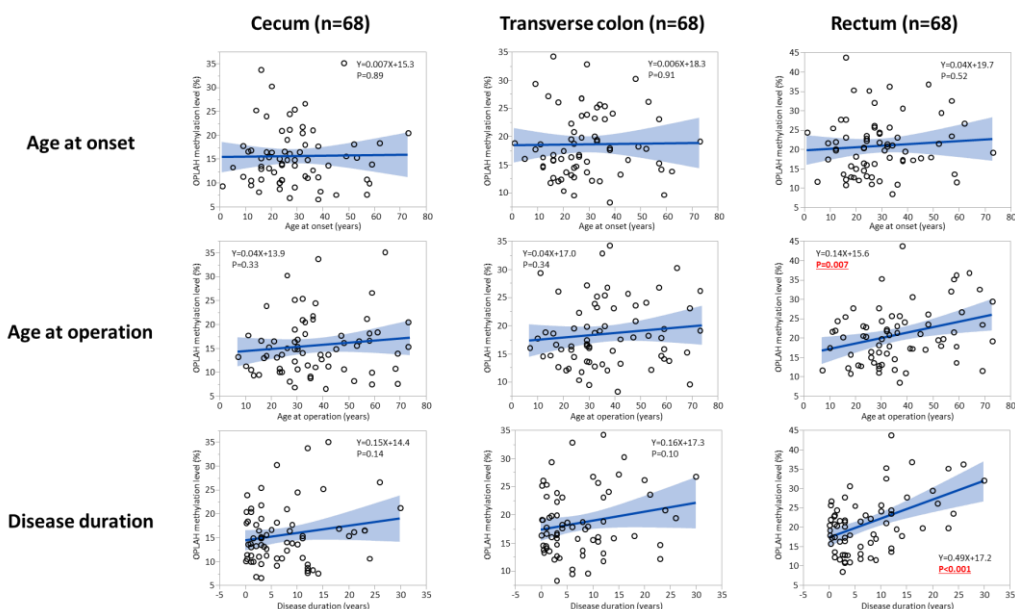
4. 研究成果

UC 関連癌組織(15 例)、UC 患者直腸粘膜(15 例)、UC 患者上行結腸粘膜(15 例)の FFPE より RNA(Qiagen)と DNA (Qiagen) を抽出し EZ RNA methylation kit (Zymo research)を用いて RNA をバイサルファイト処理した。そこから、RNA メチル化の定量化を試みたが、RNA の品質不良の影響により、断片化が進み、シーケンシング可能な状態ではなく、残念ながら有意な結果は得られなかった。

一方、本研究に付随して並行して行った DNA メチル化解析は、網羅的解析まで施行し、その結果から、孤発性大腸癌と潰瘍性大腸癌で共通して高メチル化を呈するメチル化サイトを二カ所同定した。これらを多数検体を用いてパイロシークエンサーで解析を進めると、そのうちの一か所



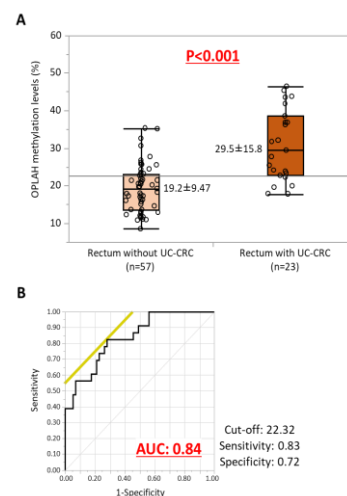
のメチル化サイトは、孤発性大腸炎における近傍大腸粘膜においては、年齢と有意な相関を示した。また、同部位 CpG サイトは、孤発性大腸癌ならびに潰瘍性大腸癌とともに、癌組織特異的に高メチル化を呈し、非癌部直腸粘膜組織検体を用いて、解析することにより、潰瘍性大腸炎関連癌合併症例を呈し、ともに AUC : 0.95 でがん組織を診断可能となることを明らかにした。また潰瘍性大腸炎の非癌部組織では、口側から直腸粘膜にかけてメチル化は上昇し、とくに非癌部直腸粘膜組織で特に、年齢や病能期間と有意な正の相関を示すことを明らかにした。



また非癌部直腸粘膜組織検体を用いて解析を行うことで、AUC:0.84 で癌合併症例を診断できることを明らかにしている。

またこのメチル化サイトに対するプライマーを作成し、digital PCR を用いた血清測定にも挑戦しているが、いまだ安定した結果を得られておらず、研究を継続中である。

また RNA メチル化を調節する酵素にも着目し、研究を続け、そのなかで RNA メチル化を誘導する METTL3 発現解析を行った。大腸癌組織では有意な結果を得られなかったものの、胃癌組織においては、癌組織特異的に METTL3 が発現上昇し、また全生存期間並びに無再発生存期間に対する予後不良因子となることが分かった。また機能解析においても、METTL3 は増殖能・浸潤能・遊走能に関与することから、Oncogene として機能しており、RNA メチル化そのものが発癌機序に深くかかわる可能性も考慮された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujikawa Hiroyuki, Toiyama Yuji, Inoue Yasuhiro, Omura Yusuke, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Yasuda Hiromi, Okugawa Yoshinaga, Okita Yoshiki, Yoshiyama Shigeyuki, Hiro Junichiro, Kobayashi Minako, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	4. 巻 17(4)
2. 論文標題 Phase I study of preoperative chemoradiotherapy with sequential oxaliplatin and irinotecan with S-1 for locally advanced rectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3930-3936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.10028	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hishida Asahi, Okugawa Yoshinaga, Morimoto Yuhki, Shirai Yumiko, Okamoto Kyoko, Momokita Sachiko, Ogawa Aki, Tanaka Koji, Nishikawa Ryutarō, Toiyama Yuji, Inoue Yasuhiro, Sakurai Hiroyuki, Urata Hisashi, Tanaka Motoyoshi, McMillan Donald, Miki Chikao	4. 巻 17(1)
2. 論文標題 Genetic influence of cytokine polymorphisms on the clinical outcome of Japanese gastrointestinal cancer patients in palliative care	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 623-629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9614	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ichikawa Takashi, Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Tanaka Koji, Yin Chengzeng, Kitajima Takahito, Kondo Satoru, Shimura Tadanobu, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	4. 巻 121
2. 論文標題 Clinical significance and biological role of L1 cell adhesion molecule in gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0646-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeda S, Shigeyasu K, Okugawa Y, Yoshida K, Mori Y, Yano S, Noma K, Umeda Y, Kondo Y, Kishimoto H, Teraishi F, Nagasaka T, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Goel A	4. 巻 444
2. 論文標題 Activation of AZIN1 RNA editing is a novel mechanism that promotes invasive potential of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 127-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.12.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 問山裕二、山本 晃、奥川喜永、楠 蔵人、楠 由希奈、大村悠介、市川 崇、井出正造、志村匡信、北嶋貴仁、藤川裕之、安田裕美、大北喜基、横江 毅、廣 純一郎、大井正貴、荒木俊光、内田恵一、楠 正人
2. 発表標題 網羅のメチル化解析から抽出したOPLAHメチル化異常の潰瘍性大腸炎における臨床的意義
3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会、東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 問山裕二、山本 晃、奥川喜永、楠 蔵人、大村悠介、藤川裕之、大北喜基、廣 純一郎、大井正貴、内田恵一、楠 正人
2. 発表標題 網羅のDNAメチル化解析から抽出した潰瘍性大腸炎合併大腸癌診断マーカー
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会、東京
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	問山 裕二 (Toiyama Yuji) (00422824)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
研究分担者	奥川 喜永 (Okugawa Yoshinaga) (30555545)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	
研究分担者	藤川 裕之 (Fujikawa Hiroyuki) (40616091)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	荒木 俊光 (Araki Toshimitsu) (70343217)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	
研究分担者	楠 正人 (Kusunoki Masato) (50192026)	三重大学・医学系研究科・寄附講座大学教員 (14101)	

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