

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09215

研究課題名(和文) 癌合併クローン病に対するmicroRNAによる非侵襲的診断マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of non-invasive detection marker for Crohn-disease associated cancer patients

研究代表者

荒木 俊光 (Araki, Toshimitsu)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：70343217

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)：別添の資料に詳細を記載させて頂いたが、クローン病癌化4症例で原発巣組織(PC)、ならびに腫瘍近傍炎症粘膜(CM)より採取したRNA later sampleから抽出したtotal RNAを用いて次世代シーケンスによる網羅的解析を外注にて施行し、得られた生データを解析し癌合併クローン病症例の癌組織で異常発現するmiRNAを同定した。候補miRNAとしては、癌合併クローン病症例の癌組織で異常発現亢進するものとして合計10のmiRNAが同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回候補miRNAとして同定されたもののうち、特にhsa-miR-144-3p、hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-223-3pは消化管癌の癌進展に關与するmiRNAとして複数の論文報告があり、今後も研究を継続する価値あるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Please see the attached files. We extracted RNA from tumor tissues and from adjacent normal mucosa from crohn disease (CD) associated cancer patients. Then we ordered miRNA microarray, and performed bioinformatic statistical analysis by using the raw data. Interestingly, we identified 10 dysregulated miRNAs (hsa-miR-144-3p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-24-1-5p, hsa-miR-4291, hsa-miR-4532, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-1229-5p, hsa-miR-1268b, hsa-miR-3960) in tumor tissue of CD associated cancer patients.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：クローン病 消化管癌 microRNA バイオマーカー

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クローン病は若年者中心に難治性腸管障害を来すいまだ原因不明の疾患で、慢性的に腸管に炎症を引き起こすことから不可逆的な障害を生じ、栄養吸収障害や永久的人工肛門などに至り、患者の生涯を通して QOL に大きな影響を与え社会的な問題ともなっている。しかしながら、従来の栄養療法や 5ASA 製剤内服、ステロイド療法に加え、免疫調節薬や生物学的製剤が治療に導入されて以降、治療成績は次第に向上し長期寛解が得られる症例も増えてきている。一方長期罹患例では、罹患部位である小腸や大腸に炎症性発癌のリスクが上昇する事が古くから知られる (Gut 1994 Nov;35(11):1507-8)。とりわけクローン病癌化例の予後は一般の大腸癌などに比べ不良であるが、病変範囲が広く、狭窄をきたしやすいクローン病に対して、早期発見を行うためのサーベイランス法は確立されていないのが現状であり、癌化のリスク診断が可能となれば、内視鏡や予防手術によって、早期発見、早期切除による予後改善が望めると考えられている。これまで癌化機序において、DNA 変異に伴う genetic なものと、遺伝子配列変異を伴わない遺伝子発現調節を来す epigenetic 変化が大きく考慮されてきたが、特に epigenetic 変化の中でも代表的な DNA メチル化に関しては、癌抑制遺伝子の DNA メチル化による発現抑制が発癌・癌進展において重要な役割を果たすとされた。炎症性腸疾患の癌化では、dysplasia carcinoma sequence の機序を経ることが知られ、年齢依存的メチル化(タイプ A)と癌依存的メチル化(タイプ C)が存在し炎症性発癌において両者は深く関連すると考えられる(Proc Natl Acad Sci USA 1996 Apr 30;93(9):3914-9, Crit Rev Oncol Hematol. 1999 Sep;32(1):31-43)。また非コード RNA(ncRNA)のうち 22 塩基程度の microRNA(miRNA)は、タンパク質の翻訳抑制により細胞の分化・発生・細胞周期・細胞死など多くの生命現象に深く関与している ncRNA であるが、miRNA は RNA 結合タンパク質複合体や膜小胞(エクソソーム)に保護される形で極めて安定した状態で体液中に存在するため、非侵襲的診断マーカーとしての有用性が高まり、バイオマーカー探索が盛んに行われており(Nat Cell Biol. 2008 Dec;10(12):1470-6.)、クローン病における炎症性発癌において、組織中の microRNAs のメチル化率を測定し、クローン病癌化予測・早期発見マーカーへ応用できる可能性が期待される。

2. 研究の目的

我々はこれまでに潰瘍性大腸炎の炎症性発癌を同定するマーカーとして miR-1、miR-9、miR-124、miR-137、miR-34b/c の有用性を報告したが(Toyama Y, and Okugawa Y, et al. Gastroenterology 2017 Dec;153(6):1634-1646.e8)、本研究ではこれらの miRNA 群が、クローン病の癌領域、癌周辺領域、炎症病変、正常腸管組織中にどのような状況で発現しているかを検討する。また、その他の候補 miRNA 群を抽出し、こちらについても同様の評価を行う。さらに、癌領域で有意に高値を示した miRNA 群については、血清中 miRNA についてもその発現を確認し、より非侵襲的な診断マーカーとしての可能性を探索する事を目的とする。本研究で得られた知見をもとにクローン病発癌の診断のみならず、癌化メカニズム解明にもつながると考えられる two way approach によって、質の高い quality of life を提供することを最終的な目的としている。これは学術的にも意義深く、あらたな治療戦略につながる可能性があり、クローン病患者への臨床的償却に直結した研究となると考える。

3. 研究の方法

(1)クローン病腸管粘膜における miRNA の発現検討

・(1-1)クローン病癌化関連 組織中 miRNA の発現検証:

クローン病癌化5症例で原発巣組織(primary cancer: PC)、ならびに腫瘍近傍炎症粘膜(Colitis-associated mucosa: CM)、さらには同一患者の非癌炎症粘膜(Inflammation mucosa: IM)と非癌正常粘膜(Normal mucosa: NM)よりサンプリングし冷凍保管している RNA later sample を用いて miR-1、miR-9、miR-124、miR-137、miR-34b/c の組織中発現を q-PCR 法で解析し、組織の種類によって顕著な発現差を有するか否かを解析する。

・(1-2)クローン病癌化関連 組織中 miRNA の網羅的解析による検索:

(1-1)の RNA later sample から抽出した total RNA を用いて次世代シーケンスによる網羅的解析を外注にて施行する。得られた生データを解析しクローン病癌化時に非癌部で特異的に有意に発現亢進/抑制する miRNAs を(部位は正常が望ましいが、炎症部も可)同定する。

・(1-3)(1-1)と(1-2)で同定した候補 miRNA 発現の再検証:

(1-1)と(1-2)で同定された候補 miRNAs を統計学的に比較解析し、有用なクローン病癌存在診断のマーカーとなりうるものを選定する。

(2)クローン病癌化関連 血清 miRNA の検索

クローン病大腸癌患者 5 例と、年齢、性別でマッチした非癌クローン病患者 5 例および健常人 5 例の、3 群より採取した血清 2ml を使用してエクソソームを抽出。エクソソーム内包 Total RNA の抽出を行い、3 群間の Total RNA を用いて次世代シーケンスを施行。生データをもとに 2 群間での複数の解析をおこない、クローン病癌化関与候補 miRNA(異常発現更新群/異常発現抑制群)を同定する。

(3) Validation cohort による確認

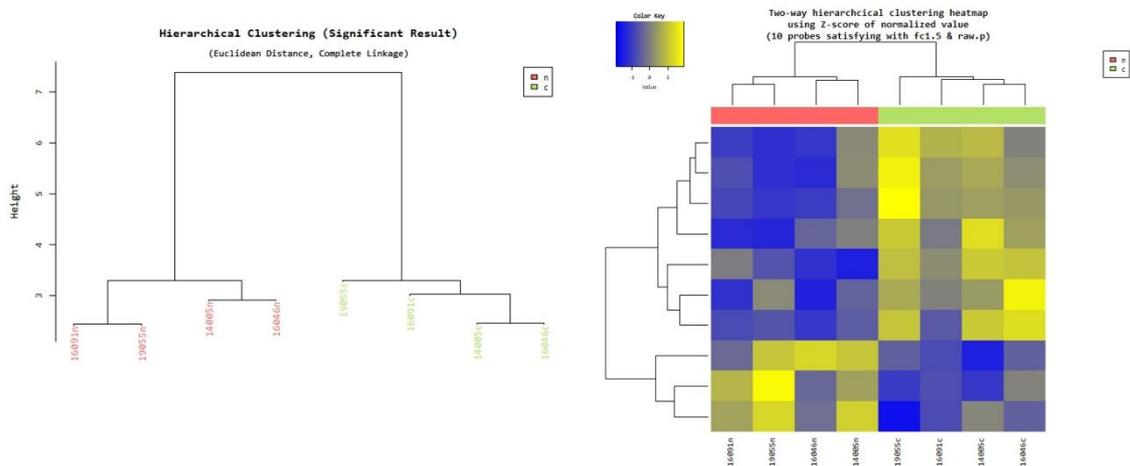
・ (3-1) 前述の(1-1) ~ (1-3) で候補として同定された癌合併クローン病症例の腫瘍組織中で異常発現亢進/発現抑制している miRNA が、他の多数症例でも同様の発現パターンを示すか検証をする。新たに症例集積しサンプルを収集したクローン病癌化症例と非癌合併クローン病症例の切除標本から組織を採取し、候補 miRNAs の相対発現値を定量し、クローン病癌化存在診断マーカーとしての正診率を検証する。

・ (3-2) 前述の(2) で候補として同定された、癌合併クローン病症例の血清エクソソーム内包 miRNA のうち異常発現亢進/発現抑制している miRNA が、他の多数症例でも同様の発現パターンを示すか検証をする。新たに症例集積し血液サンプルを採取したクローン病癌化症例と非癌合併クローン病症例の血清からエクソソームを抽出し、エクソソーム内包候補 miRNA の相対発現値を定量し、クローン病癌化存在非侵襲診断マーカーとしての正診率を検証する。

4 . 研究成果

前述の研究計画に基づき実際に研究計画を進めた。結果を以下に示す。

網羅的解析に基づく癌合併クローン病の腫瘍組織/非癌組織中の miRNA 発現の相違 – Dendrogram / Heatmap



当該年度中の研究内容としては、主に前述の(1-2)に基づき、クローン病癌化 4 症例で原発巣組織(PC)、ならびに腫瘍近傍炎症粘膜(CM)より採取した RNA later sample から抽出した total RNA を用いて次世代シーケンスによる網羅的解析を外注にて施行し、得られた生データを解析し癌合併クローン病症例の癌組織で異常発現する miRNA を同定した。候補 miRNA としては、癌合併クローン病症例の癌組織で異常発現亢進するものとして、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-223-3p、hsa-miR-24-1-5p、hsa-miR-4291、hsa-miR-4532、hsa-miR-486-5p の 7miRNA が、異常発現抑制するものとして hsa-miR-1229-5p、hsa-miR-1268b、hsa-miR-3960 の 3miRNA が同定された。特に hsa-miR-144-3p、hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-223-3p などは消化管癌の癌進展に関与する miRNA として複数の論文報告があり、今後も研究を継続する価値あるものであると考えている。

なお当該年度で当施設で手術加療をおこなったクローン病癌化症例としては平均で 2-3 例/年程度と非常に稀少性が高く、今後も症例の集積を続けており、validation phase として十分な症例数(当施設で 20-30 例)を集積したいと考えている。また同様の症例が紹介され手術加療をおこなっているハイボリュームセンターの消化管外科領域の責任者とも定期的に連絡を取り合っており、本研究が多施設共同研究として発展し、新規性を有し興味深いエビデンスを生み出せるよう、今後も研究活動を継続予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kusunoki Kurando, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Yamamoto Akira, Omura Yusuke, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	4. 巻 63
2. 論文標題 Advanced Lung Cancer Inflammation Index Predicts Outcomes of Patients With Colorectal Cancer After Surgical Resection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diseases of the Colon & Rectum	6. 最初と最後の頁 1242 ~ 1250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/DCR.0000000000001658	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 -
1. 著者名 Mori Koichiro, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Ichikawa Takashi, Nagano Yuka, Oki Satoshi, Shimura Tadanobu, Fujikawa Hiroyuki, Hiro Junichiro, Kobayash Minako, Araki Toshimitsu, Inoue Yasuhiro, Mohri Yasuhiko, Kusunoki Masato	4. 巻 20
2. 論文標題 Preoperative heat shock protein 47 levels identify colorectal cancer patients with lymph node metastasis and poor prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12196	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 -
1. 著者名 Okita Yoshiki, Araki Toshimitsu, Okugawa Yoshinaga, Kondo Satoru, Fujikawa Hiroyuki, Hiro Junichiro, Inoue Mikihiro, Toiyama Yuji, Ohi Masaki, Uchida Keiichi, Kusunoki Masato	4. 巻 3
2. 論文標題 The prognostic nutritional index for postoperative infectious complication in patients with ulcerative colitis undergoing proctectomy with ileal pouch-anal anastomosis following subtotal colectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Anus, Rectum and Colon	6. 最初と最後の頁 91 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23922/jarc.2018-032	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 -
1. 著者名 Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Hur Keun, Yamamoto Akira, Yin Chengzeng, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Koike Yuhki, Okita Yoshiki, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Araki Toshimitsu, Miki Chikao, McMillan Donald C., Goel Ajay, Kusunoki Masato	4. 巻 10
2. 論文標題 Circulating miR 203 derived from metastatic tissues promotes myopenia in colorectal cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 536 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.12403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Yamamoto Akira, Shigemori Tsunehiko, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Yokoe Takeshi, Saigusa Susumu, Tanaka Koji, Shirai Yumiko, Kobayashi Minako, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Lymphocyte-C-reactive Protein Ratio as Promising New Marker for Predicting Surgical and Oncological Outcomes in Colorectal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003239	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

1. 著者名 Koike Yuhki, Uchida Keiichi, Inoue Mikihiro, Matsushita Kohei, Okita Yoshiki, Toiyama Yuji, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	4. 巻 238
2. 論文標題 Predictors for Pouchitis After Ileal Pouch-Anal Anastomosis for Pediatric-Onset Ulcerative Colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 72~78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2019.01.022	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 荒木俊光、大北喜基、近藤 哲、北嶋貴仁、藤川裕之、安田裕美、奥川喜永、小池勇樹、廣 純一郎、吉山繁幸、問山裕二、井上幹大、大井正貴、内田恵一、楠 正人
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎術後の回腸嚢関連合併症に対する手術治療成績
3. 学会等名 第73回大腸肛門病学会学術集会、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 (Yoiyama Yuji) (00422824)	三重大学・医学系研究科・教授 (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	大北 喜基 (Okita Yoshiki) (20378342)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	
研究分担者	内田 恵一 (Uchida Keiichi) (30293781)	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	井上 幹大 (Inoue Mikihiro) (30422835)	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)	
研究分担者	近藤 哲 (Kondo Satoru) (60763737)	三重大学・医学部附属病院・医員 (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