

# 大規模コホートを用いた大腸癌のノンコーディングRNA発現異常と生活習慣の分子疫学的解析

能正 勝彦<sup>1)</sup>、五十嵐 央祥<sup>1)</sup>、伊藤 美樹<sup>1)</sup>、三橋 慧<sup>1)</sup>、栗原 弘義<sup>1)</sup>、菅野 伸一<sup>1)</sup>、内藤 崇史<sup>1)</sup>、須河 恭敬<sup>1), 2)</sup>、松永 康孝<sup>1)</sup>、足立 靖<sup>1)</sup>、野島 正寛<sup>3)</sup>、今井 浩三<sup>3)</sup>、丸山 玲緒<sup>4)</sup>、鈴木 拓<sup>4)</sup>、山本 博幸<sup>5)</sup>、篠村 恭久<sup>1)</sup>

1) 札幌医科大学医学部 消化器・免疫・リウマチ内科学講座、2) Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute、3) 東京大学医科学研究所、4) 札幌医科大学医学部 分子生物学講座、5) 聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科

## 〈はじめに〉

近年、抗EGFR抗体薬がKRAS野生型大腸癌で治療効果が認められ、日常臨床に用いられている。またBRAF、PIK3CA、NRAS遺伝子は、KRASと同様にEGFRを介したRAS-RAF-MEK-ERK、PI3K/Akt経路でそれぞれ重要な働きをし(図1)、それらの変異例ではKRAS遺伝子が野生型でも同薬剤の効果が期待できないと報告されている。よって抗EGFR抗体薬以外にもそれらの遺伝子異常を標的としたRAF、MEK、Akt阻害剤等が将来、大腸癌患者の治療に用いられる可能性がある。

一方、non-coding RNA (ncRNA) の発現異常は消化器癌のみならず多くの癌で報告され(図2)、新規バイオマーカーとして近年、注目されているが<sup>1, 2, 3)</sup>、大腸癌のRAS-RAF-MEK-ERK、PI3K/Akt経路の遺伝子異常を制御するncRNAはほとんど解明されていない。

よってそれらの経路の活性化に重要な役割を果たし、特異的に発現するmicroRNA (miRNA) や長鎖ncRNAを同定し、その働きを明らかにすることは大腸癌の分子診断や標的治療を大きく変える可能性があり、新規バイオマーカーとして臨床への応用が期待される。

またncRNA等の分子診断を用いた大腸腫瘍の新たな拾い上げの検査方法を開発することは病変の早期発見として有用と考えられ、それによる大腸癌患者数の減少は医療費削減という観点からも非常に重要と思われる。高齢化社会が進行するわが国においては、近年、高齢者の右側結腸癌の増加が報告されており、特徴として女性の割合が高いことや、BRAF遺伝子変異陽性例が多いことが明らかとなっている。その前癌

病変として注目されている sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) は盲腸や上行結腸に好発の鋸歯状病変であるが、分子異常に関してはBRAF遺伝子変異や癌関連遺伝子メチル化がその他の大腸前癌病変と比べて頻度が高いことが報告されている<sup>4-7)</sup>。またSSA/Pの肉眼形態はポリープ様の隆起ではなく、軽度の扁平隆起で、大きさも10mm未満のものが多いことから便潜血反応検査で陽性となることは非常に少ない。よってSSA/Pを見逃さないための新たな検査方法として糞便や腸管洗浄廃液から回収したDNA、RNAによる分子診断も将来的に期待される。

このように大腸前癌病変におけるncRNA等の分子異常を明らかにすることは、さらに高齢者が増加するわが国において大腸癌の早期発見・治療という面からも重要である。

## 〈対象と方法〉

対象は札幌医科大学附属病院と関連施設で内視鏡治療・外科的切除術あるいは生検により採取された約1,300例の大腸癌・腺腫・鋸歯状病変の臨床検体でFormalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) 標本からDNAとmiRNAを抽出<sup>4, 6)</sup>。それらの症例の生活様式(喫煙歴、アルコール飲酒歴、内服歴)、体質(糖尿病、肥満等)についての記録も利用する。

大腸腫瘍のKRAS、BRAF、NRAS、PIK3CA遺伝子変異は高感度パイロシークエンサーにより解析する<sup>4)</sup>。癌関連遺伝子(CACNA1G、CDKN2A、IGFBP7、IGF2、MGMT、RUNX3、MLH1)のメチル化解析を行う際には、抽出したDNAをBisulfite処理後、Real-time PCR (MethylLight) で各遺伝子のプロモーター

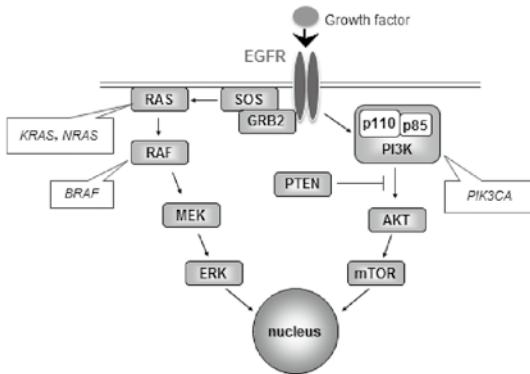


図1 EGFRとその下流シグナル

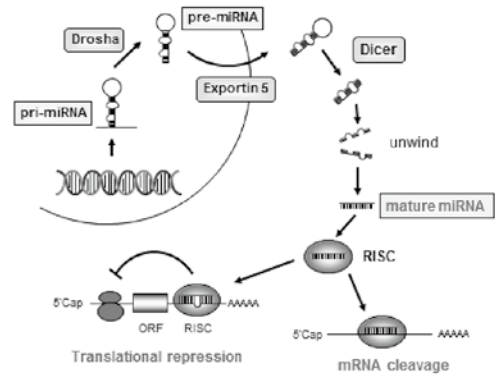


図2 microRNA の biogenesis

No.	microRNA (miR Base ID)	microRNA expression		
		BRAF mutated group	BRAF wild-type group	Fold change (Mutated group / Wild-type group)
1	hsa-miR-31-5p	29825	89.3	335.0
2	hsa-miR-215	7.65	0.10	74.6
3	hsa-miR-31-3p	77.3	1.07	72.4
4	hsa-miR-151-3p	1312	24.4	53.8
5	hsa-miR-539-5p	370	7.57	48.9
6	hsa-miR-661	3125	91.8	34.1
7	hsa-miR-197-3p	4.78	0.16	29.2
8	hsa-miR-483-3p	605	21.9	27.6
9	hsa-miR-185-5p	15.4	0.56	27.3
10	hsa-miR-223-3p	10.5	0.40	25.9

図3 miRNA アレイの結果 (文献4より一部改変)

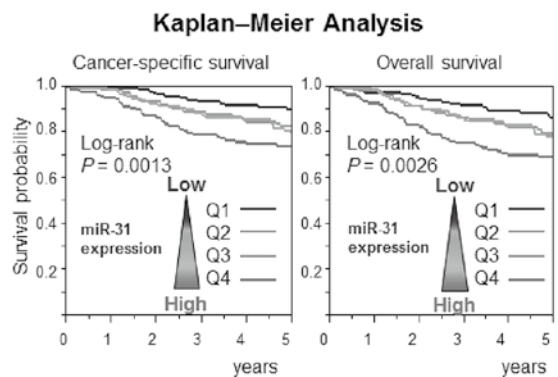


図4 大腸癌症例における miRNA-31発現と予後 (文献4より一部改変)

領域を増幅する<sup>5,6)</sup>。

miRNA 発現に関してはアレイシステムのキットを用いて網羅的に解析する。また有望な ncRNA が同定された場合、大腸癌細胞株を用いた分子細胞生物学的手法による機能解析も合わせて行う。また定量的 RT-PCR を用いて多症例の大腸癌症例でその発現レベルを解析し<sup>4)</sup>、生命予後や分子標的薬等の薬剤感受性との相関を、臨床データと照らし合わせて検証する。

### 〈研究成果〉

大腸癌の遺伝子変異について *KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA*、*NRAS* 変異はそれぞれ33%、4.9%、11%、5.2%で認められた。また miRNA アレイの結果から *BRAF* 遺伝子変異群で野生型群と比較して300倍以上の高発現を示した microRNA-31 (miR-31) が同定された (図3)。

よって700例を超える大腸癌症例を対象に定量的 RT-PCR で miR-31 の発現を検証。その結果、miR-31 の高発現群は *BRAF* 変異遺伝子変異と有意な相関を示しただけでなく、右側結腸とも有意な相関 ( $P < 0.0001$ ) を示した<sup>4)</sup>。生活習慣と miR-31 発現の関連については喫煙習慣と相関を認めたが、それ以外の因子とは関連を認めなかった。また生命予後に関する検討では miR-31 高発現群は不良な予後とも相関することが明らかとなった (図4)。

さらに大腸癌細胞株を用いた機能解析において miR-31 阻害剤を投与することでその浸潤能や増殖能が抑制されること (図5)、また Western blot による解析では miR-31 阻害剤は *BRAF* 蛋白の発現を低下させることが明らかとなった (図5)。

また転移性大腸癌 (*KRAS* codon12/13野生型) の抗 EGFR 抗体薬投与症例の検討では miR-31 の高発現群

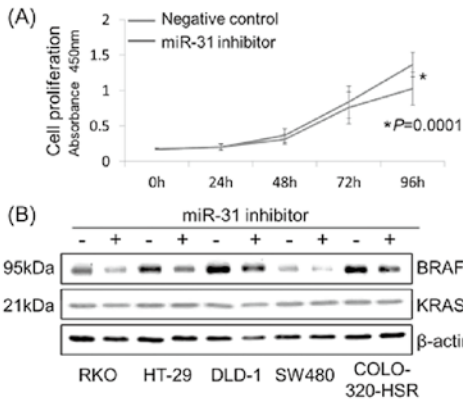


図5 (文献4より一部改変)  
 (A) 大腸癌細胞株でmiR-31阻害薬投与後に増殖能の抑制効果を認めた (MTT assay)  
 (B) 大腸癌細胞株でmiR-31阻害薬投与後のBRAF蛋白発現の低下が認められた (Western blot 解析)

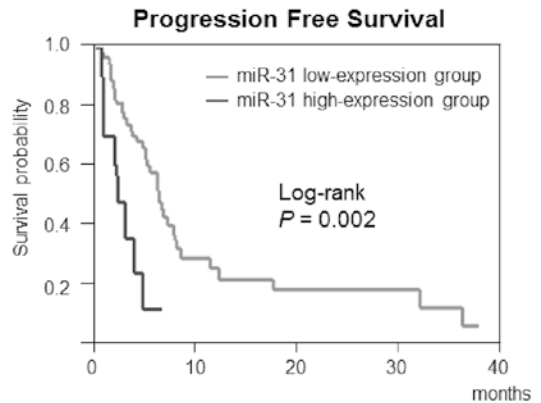


図6 抗EGFR抗体薬投与例におけるmiR-31発現と無増悪生存期間

は無増悪生存期間が有意に短い ( $P=0.002$ ) ことが示された (図6)。

さらにわれわれはアレイのクラスター解析でmiR-31と相関を認め、EGFR下流シグナルを制御する可能性を持つmiRNAをいくつか同定しており (図7)、miR-31と同様に抗EGFR抗体薬等の分子標的薬の効果予測マーカーとなりうるかどうか解析を進めている。

また大腸前癌病変における検討では通常腺腫と比較して鋸歯状病変 [SSA/P, traditional serrated adenoma (TSA)] でmiR-31の発現亢進がみられた<sup>4, 6)</sup>。またmiR-31は*BRAF* 遺伝子変異だけでなく癌関連遺伝子のDNAメチル化とも強い相関を認めた<sup>6)</sup>。さらにSSA/Pの癌化例では癌部でエピジェネティックな異常だけでなくmiR-31の発現亢進も高頻度に起きていることが明らかとなった<sup>6, 7)</sup>。

### 〈考察〉

本研究では約1,300症例の大腸腫瘍からDNAとncRNAを抽出。大腸癌の重要なシグナル経路であるRAS-RAF-MEK-ERK、PI3K/Akt等のシグナルに関与する*KRAS*、*BRAF*、*NRAS*、*PIK3CA* 遺伝子やncRNAを最新のアレイで網羅的に探索し、診断や治療の新規バイオマーカーとしての可能性を明らかにすることを目的とした。また前癌病変である大腸鋸歯状病変についても同様に、上記シグナル経路のジェネティック、エ

ピジェネティックな異常やncRNA発現を解析。その発生・発癌機構の解明と同定された遺伝子異常を用いた超早期分子診断への応用を検討。また生活様式、内服薬、体質等との関連についても合わせて解析した。

その結果、アレイシステムにより同定されたmiR-31は*BRAF* 変異陽性大腸癌の群で野生型の群と比較して最も発現が亢進しているmiRNAであることが判明した。さらにmiR-31が大腸癌の予後因子となることも初めて明らかにした。miR-31は9番染色体に位置し、これまでにさまざまなヒトの癌でその発現異常が報告されてきた<sup>6)</sup>。大腸癌においてはその発現亢進がこれまでに明らかにされており<sup>2)</sup>、oncogenicな働きをするmiRNAと考えられていたが、*BRAF* 遺伝子変異や予後との相関について明らかにしたのはわれわれの報告が初めてである<sup>4)</sup>。

また今回の大腸癌細胞株を用いた検討ではmiR-31は*BRAF* 蛋白の発現を制御している可能性が示唆されたことからRAS-RAF-MEK-ERK経路の活性化に関与する重要なmiRNAの一つであることが推察される。そのメカニズムはまだ解明されていないが、同シグナル活性を抑制的に制御している分子をmiR-31が標的にしていることが最近の研究で明らかになっている<sup>4, 9)</sup>。よってmiR-31の発現亢進によってその分子の働きが抑えられることでRAS-RAF-MEK-ERK経路が活性化される可能性も考えられるが、今後、そのさらなるメカニズムの解明が期待される。

今回の大腸癌の抗EGFR抗体薬投与例を対象にし

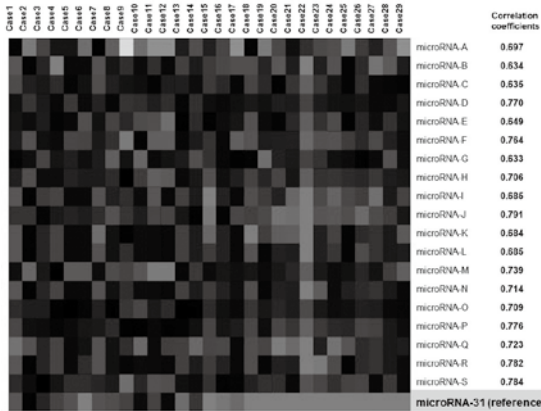


図7 アレイのクラスター解析による miR-31と有意な相関を認める miRNA の一群

た検討により、miR-31高発現群では低発現群と比較して無増悪生存期間の短縮が認められたことから、その効果予測としての新規バイオマーカーとしても有望である可能性も明らかとなった。さらにわれわれは大腸癌細胞株を用いた検討で miR-31阻害剤が増殖能や浸潤能を抑制することも報告している。よって RAS や BRAF の変異により RAS-RAF-MEK-ERK 経路が活性化している大腸癌症例でも miR-31阻害剤を併用することで、その治療効果が期待できる可能性がある。われわれは現在、大腸癌の分子標的薬における miR-31阻害剤の上乗せ効果について検討を行っており、その研究成果が待たれるところである。

また miR-31は大腸前癌病変、とくに SSA/P や TSA でその高発現が認められた。とくに SSA/P は右側結腸に好発で腫瘍径も小さく、扁平隆起の病変が多いことから便潜血反応検査で陽性となることは非常に少ない。よって SSA/P を見逃さないための新たな検査方法として糞便や腸管洗浄廃液から回収した DNA、RNA による分子診断も将来的に期待されることから、miR-31はそのような超早期診断の有望な分子の一つであると考えられる。

### 〈終わりに〉

わが国において男女ともに増加している大腸癌は発生部位によって分子異常のパターンが異なり、その異常に生活様式や体質も関与しているものと思われる。よってこれらの研究を進め、大腸癌の分子異常とその

リスクとなる後天的な因子との関連を明らかにすることはわれわれの大腸癌に対する考えを改善させ、本質的に推奨される食事や生活様式を患者や健康者に与えてくれるものと思われる。また今回の検討から miR-31は大腸癌の分子診断や標的治療において有望な新規バイオマーカーであることが明らかとなった。今後、さらなる検討を重ねることにより、その臨床応用に向けて取り組んでいきたい。

### 〈文献〉

- 1) Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Noshio K, et al. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol.* 2012;18:2745-55.
- 2) Goel A, Boland CR. Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2012;143:1442-60 e1441.
- 3) Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshio K, Yamamoto H, et al. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2012;72:1126-36.
- 4) Noshio K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, et al. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis.* 2014;35:776-83.
- 5) Noshio K, Kure S, Irahara N, Shima K, Baba Y, et al. A Prospective Cohort Study Shows Unique Epigenetic, Genetic, and Prognostic Features of Synchronous Colorectal Cancers. *Gastroenterology.* 2009;137:1609-20 e1-3.
- 6) Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Noshio K, Naito T, et al. MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. *Int J Cancer.* in press
- 7) Aoki H, Noshio K, Igarashi H, Ito M, Mitsuhashi K, et al. MicroRNA-31 expression in serrated pathway progression. *World J Gastroenterol.* in press.
- 8) Naito T, Noshio K, Ito M, Igarashi H, Mitsuhashi K, Yoshii S, et al. IGF2 DMR hypomethylation in relation to pathological and molecular features of serrated lesions. *World J Gastroenterol.* in press.
- 9) Sun D, Yu F, Ma Y, Zhao R, Chen X, et al. MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *J Biol Chem* 2013;288:9508-18.