

消化器癌の転移再発を制御する non-coding RNA の同定

岩手医科大学外科学講座

講師 岩谷 岳

(共同研究者)

東京大学 医科学研究所 ヒトゲノム解析センター

DNA 情報解析分野 教授 宮野 悟

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 准教授 鈴木 穰

九州大学病院別府病院外科 教授 三森 功士

はじめに

microRNA を含めた non-coding RNA は転写や翻訳を支配する重要な分子であり、その臨床的意義が注目されているが、転移関連機構で重要な役割を担う遺伝子群とそれらを制御する non-coding RNA (ncRNA) については明らかでない。本研究では消化器癌症例の原発巣、転移巣、骨髄中細胞における遺伝子または ncRNA の発現解析から新規転移・再発マーカー、治療標的の同定をこころみた。

研究結果

胃癌患者骨髄細胞からの micro RNA マイクロアレイによる網羅的発現解析から、遠隔転移を有する進行癌では micro RNA 144 (miR-144) の発現低下が認められた。胃癌症例では miR-144 が胚性幹細胞の stemness の維持に関与する ZFX を標的遺伝子としていることを明らかにした⁽¹⁾。

大腸癌 137 症例の検討でも miR-144 低発現群 (n=69) は高発現群 (n=68) に比し有意に予後不良であった ($p=0.0041$, Fig 1)。多変量解析で miR-144 低発現は大腸癌予後に対する独立

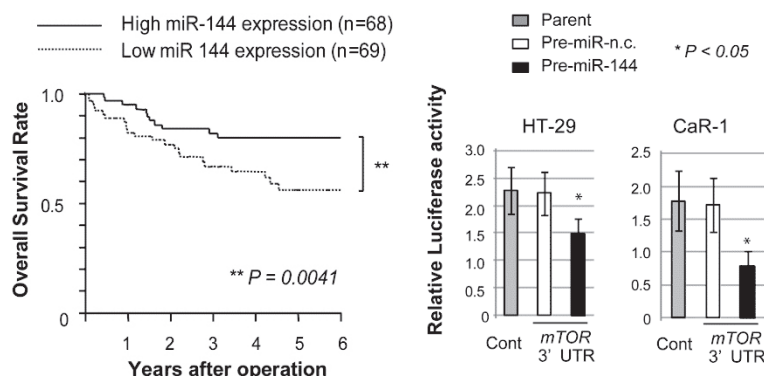


Fig 1. 大腸癌切除検体における miR-144 発現と術後生存率 (左) 大腸癌培養細胞における Luciferase

予後因子であるとともに、強力な肝転移再発の予測因子であることを示した (Table 1, 2)。

mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナルはさまざまな悪性腫瘍の発生・進展に関与する。mTORを標的とした分子標的薬rapamycinは腎癌や膵内分泌腫瘍に対する治療薬として臨床的に用いられ、他の癌腫に対しても第3相試験が進行中である。大腸癌細胞および臨床検体にてmiR-144がmTOR pathway上の複数の分子 (mTOR, Rictorなど)を標的としていることを明らかにした。本研究からmiR-144発現状態が大腸癌予後・肝転移再発・rapamycin感受性を予測する有用なマーカーであることを示した⁽²⁾。

Table 1. Univariate and Multivariate Analysis for Overall Survival (Cox proportional hazard model)

Clinicopathologic variable	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	RR	95% CI	P value	RR	95% CI	P value
Gender (male/female)	0.93	0.65-1.29	0.67	-	-	-
Histology grade ^a (well/others)	0.83	0.58-1.16	0.28	-	-	-
Depth ^b (m,sm,mp,ss/se,si)	2.71	1.93-3.86	<0.0001***	1.96	1.29-3.01	0.0018**
Lymph node metastasis (-/+)	2.73	1.86-4.32	<0.0001***	2.00	1.31-3.23	0.0011**
Lymphatic invasion (-/+)	2.21	1.57-3.23	<0.0001***	1.51	1.03-2.3	0.0345*
Venous invasion (-/+)	1.70	1.15-2.42	0.009**	1.19	0.77-1.8	0.43
Liver metastasis (-/+)	2.45	1.71-3.43	<0.0001***	1.58	1.03-2.42	0.037*
miR-144 expression (high/low)	2.28	1.16-4.73	0.016*	2.60	1.17-6.01	0.019*

Table 2. Univariate and Multivariate Analysis for Liver Recurrence in Dukes ABC (Logistic regression model)

Clinicopathologic variable	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	RR	95% CI	P value	RR	95% CI	P value
Gender (male/female)	0.49	0.10-1.75	0.3029	-	-	-
Histology grade ^a (well/others)	0.41	0.09-1.48	0.2062	-	-	-
Depth ^b (m,sm,mp,ss/se,si)	1.54	0.32-5.76	0.548	-	-	-
Lymph node metastasis (-/+)	4.12	1.21-16.36	0.0289*	3.82	1.03-16.14	0.0506
Lymphatic invasion (-/+)	3.02	0.90-10.90	0.0763	-	-	-
Venous invasion (-/+)	5.30	1.38-19.44	0.0117*	2.89	0.67-11.75	0.1394
miR-144 expression (high/low)	6.74	1.67-45.36	0.0171*	5.59	1.27-39.35	0.0391*

胃癌骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析には次世代シーケンサーによるwhole transcriptome解析を施行した。従来のマイクロアレイ解析では、測定対象がプローブに限定される、発現量の低い遺伝子は測定困難、相同配列によるクロスハイブリの危険性などが欠点としてあったが、次世代シーケンサーによるRNA解析では塩基配列情報をもとにしており高感度・高解像度の解析が可能である。Stage I (4例) およびStage IV (4例) 胃癌症例の骨髄細胞におけるwhole transcriptome解析では、多数のhistone遺伝子がStage

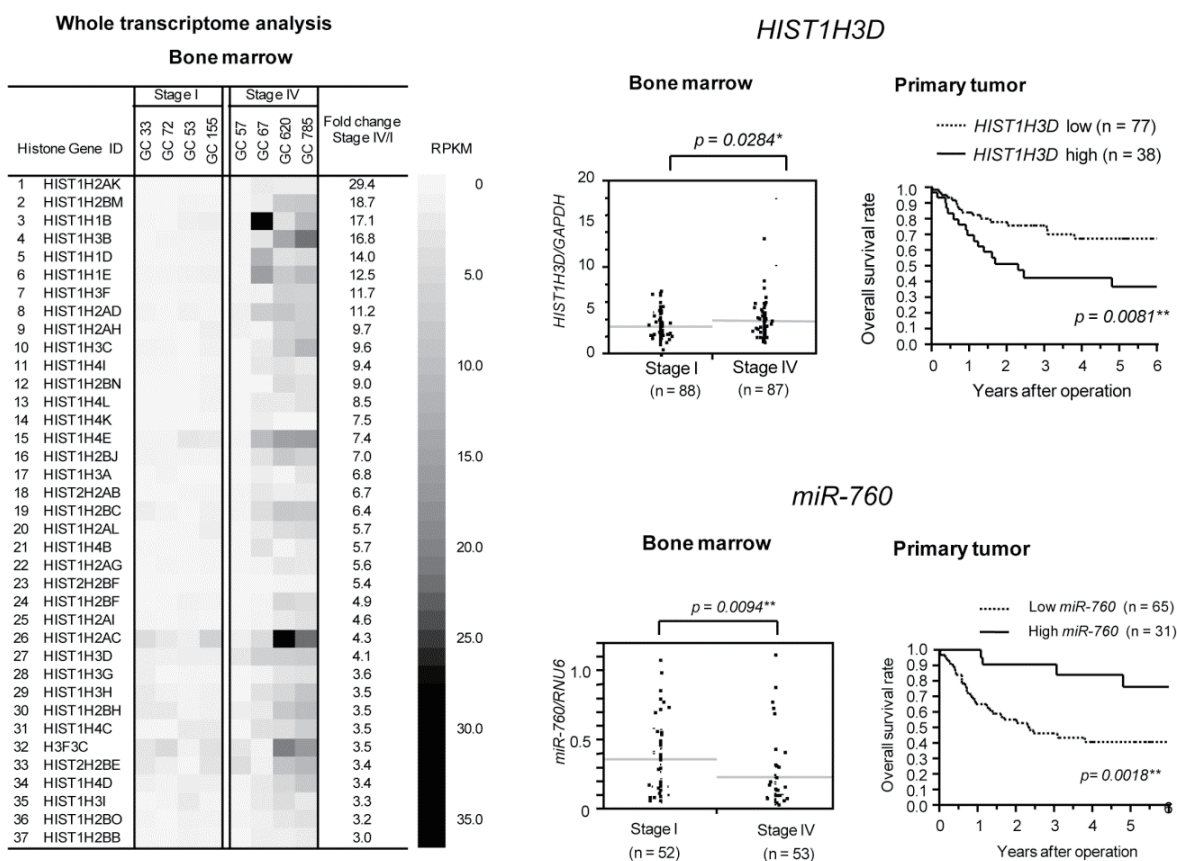


Fig 2. 胃癌骨髓細胞における whole transcriptome 解析 Stage I vs Stage IV (左), 胃癌骨髓細胞における HIST1H3D/miR-760 発現と胃癌原発巣における HIST1H3D/miR-760 発現状態と術後生存率

IV症例で発現上昇していることを明らかにした (Fig 2.)。Histone familyの一つである HIST1H3D 発現の 175 例の骨髓細胞、92 例の末梢血細胞、115 例の胃癌原発巣における検証実験でも進行胃癌で histone 発現が上昇していることが確認された (Fig 2.)。

microRNA は 7-8 塩基程度のシード領域の塩基対合によりで標的 mRNA を制御することから類似遺伝子や同じ Pathway 上の遺伝子群など複数の遺伝子を標的とすることが多い。In silico 解析から Stage IV 胃癌症例骨髓細胞中で発現上昇を認めた histone 遺伝子群のほとんどが共通してその 3' UTR に miR-760 結合部位を有していることを見出した。胃癌臨床検体における miR-760 発現は histone 発現と対照的に進行癌で有意に減少しており、また胃癌培養細胞で miR-760 が histone mRNA と直接結合していることを Luciferase reporter assay により明らかにした。以上より、胃癌症例では histone mRNA/miR-760 の発現状態が転移・予後マーカーとなる可能性を示した (Fig 3.)。

近年の次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析により癌組織中では多くの遺伝子変異が存在し、癌に growth advantage をもたらす driver 変異と中立的な passenger 変異が存在することが明らかとなってきた。癌組織内には部位により異なる遺伝子変異が存在し

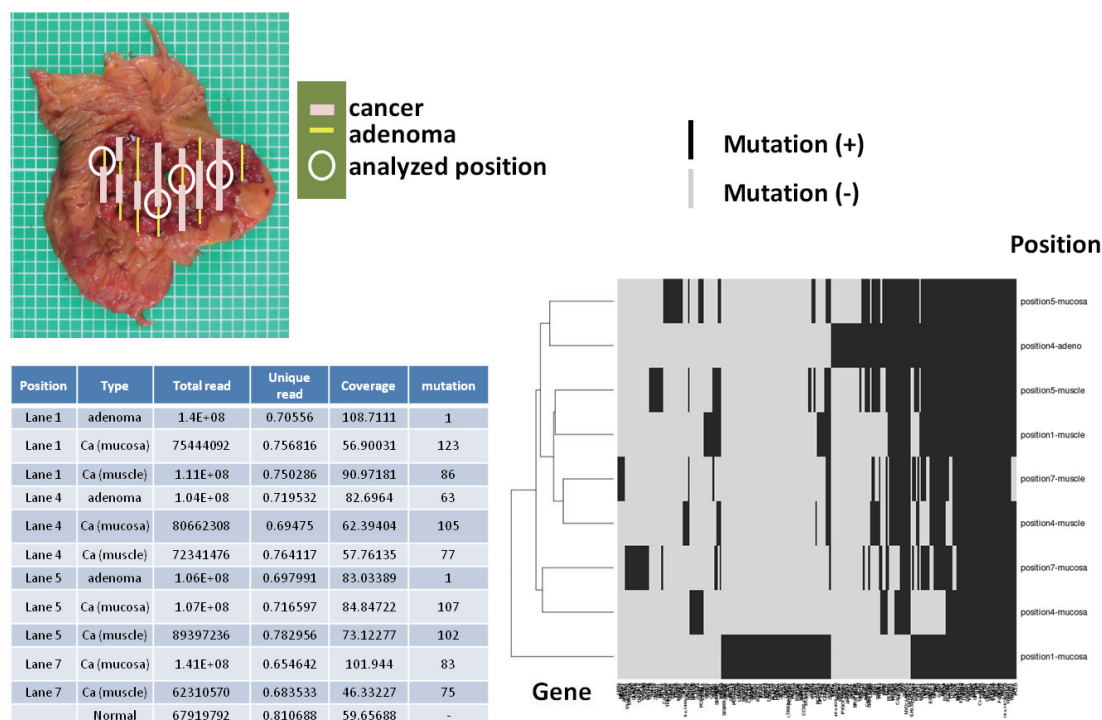


Fig 3. 大腸腺腫内癌における heterogeneity. 腺腫内癌の各部位からの網羅的遺伝子変異解析では部位により変異数変異遺伝子が大きく変化していた。

heterogeneityをもつことが示されているが、転移巣の clone が原発巣のどの clone から生じているかを確認、その clone どうしで遺伝子や non-coding RNA の発現を比較することで、転移に重要な分子が明らかになると思われる。大腸癌肝転移症例の同時切除例の切除検体より Laser microdissection を用い多部位より DNA/RNA を抽出し、現在遺伝子変異および発現を次世代シーケンサーにて解析中である。研究期間初期には対象となる転移症例がなかったため、大腸腺腫内に腺腫内癌を有する大腸癌原発巣組織で heterogeneity 検索を施行した。同定された変異から小さな腺腫内癌の中でも変異遺伝子や総変異は部位により大きく異なっていることが明らかとなった。

考 察

本研究で消化器癌の転移に関与する micro RNA が複数明らかになったが、Non-coding RNA には microRNA 以外にも 200bp ～数十 Kb におよぶ長鎖の long non-coding RNA (lincRNA) が存在し、これらが悪性腫瘍の発生・進展に関与していることが明らかにされている。本研究課題では大腸癌予後に関連する lincRNA の解析を施行中であり、1 つの候補 lincRNA を同定し現在解析中である。また転移 clone の発現解析研究に関しては、網羅的遺伝子変異解析から大腸腺腫内癌の段階ですでに幅広い heterogeneity が存在していることから、進行癌症例ではさらに変異遺伝子・変異数は増加することが予想され、変異解析による転移 clone 同定に

より転移に関わる分子のより正確な検討が可能となると思われる。

要 約

消化器癌症例の原発巣、骨髄中細胞、末梢血細胞中における遺伝子またはncRNA発現解析から、胃癌でmiR-144/ZFXおよびmiR-760/histone mRNAが大腸癌でmiR-144/mTOR pathwayが転移・再発・予後に関与し有用なマーカーとなることを示した。

文 献

1. Akiyoshi S, Fukagawa T, Ueo H, Ishibashi M, Takahashi Y, Fabbri M, Sasako M, Maehara Y, Mimori K, and Mori M. Clinical significance of miR-144-ZFX axis in disseminated tumour cells in bone marrow in gastric cancer cases. *British J Cancer*, 2012.
2. Iwaya T, Yokobori T, Nishida N, Kogo R, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Sawada G, Takahashi Y, Ishibashi M, Wakabayashi G, Mori M, and Mimori K. Downregulation of miR-144 is associated with colorectal cancer progression via activation of mTOR signaling pathway. *Carcinogenesis*, 2012.