

# 大腸癌・大腸鋸歯状病変を対象としたLINE-1メチル化レベルと アレイシステムを用いたmicroRNA発現異常の解析 — 新規バイオマーカーの開発を目指して —

札幌医科大学医学部 消化器・免疫・リウマチ内科学講座

講師 能正 勝彦

(共同研究者)

札幌医科大学医学部 消化器・免疫・リウマチ内科学講座 教授 篠村 恭久

聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科

准教授 山本 博幸

## はじめに

本邦において癌好発年齢である中・高年者の増加と共に大腸癌が増加している。今回の検討で我々は、大腸癌やその前癌病変を対象にゲノムワイドDNAメチル化とノンコーディングRNAの一つであるmicroRNA (miRNA) 発現を解析。大腸癌の発育進展において染色体不安定性等の遺伝子異常に重要な役割を果たすゲノムワイドDNA 低メチル化と強い相関を示すmiRNAを明らかにすることで、その有望なmiRNAを分子診断や治療の新規バイオマーカーとして利用できるかどうか検討した。また近年、大腸癌の発癌経路としてserrated pathwayが世界的に注目されている。serrated polypは鋸歯状構造を有し、BRAF遺伝子変異の頻度が高く、癌関連遺伝子のメチル化も高頻度であることが報告されている。その中でもsessile serrated adenoma (SSA) はマイクロサテライト不安定性 (MSI) の右側結腸癌の前癌病変と考えられているが、その特性は不明な点が多い。我々は、大腸鋸歯状病変を300例以上集積しており、その遺伝子変異やエピジェネティックな変化、またmiRNA等の分子生物学的異常の検索や生活習慣との関係も明らかにすることでその発生や発癌メカニズムの解明を目指し、検討を行った。

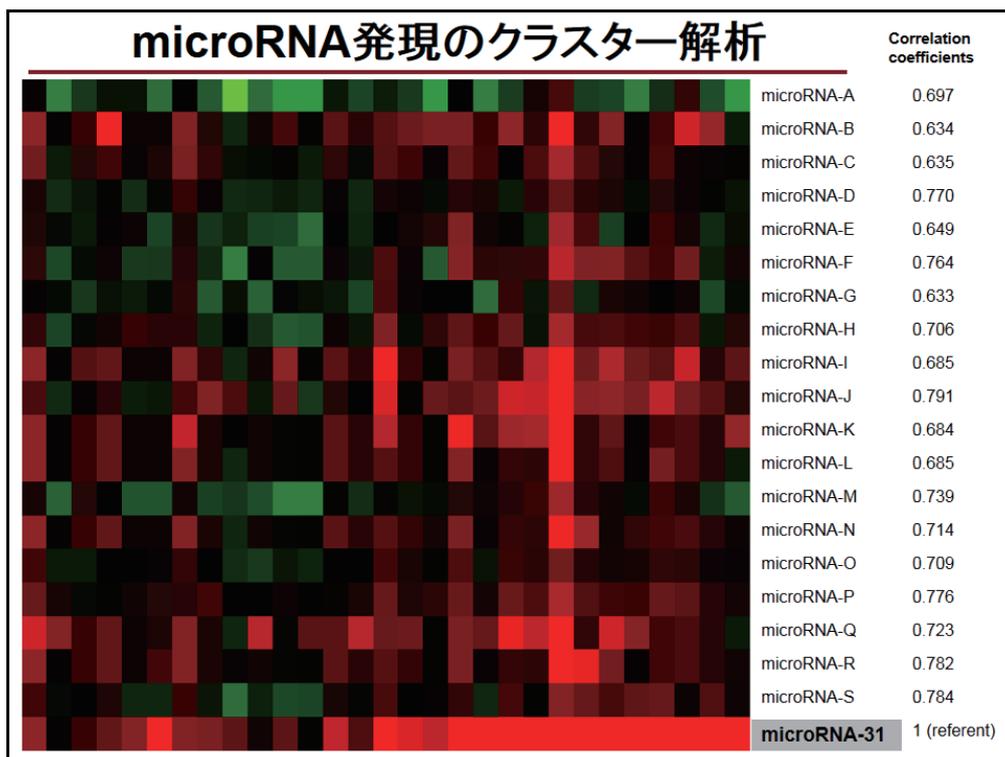
解析方法としては手術あるいは生検により採取された1,500例の大腸癌・通常腺腫・大腸鋸歯状病変からDNAとmiRNAを抽出し、遺伝子変異、癌関連遺伝子のメチル化、miRNA発現を網羅的に解析。メチル化解析を行う際にはDNAをBisulfite処理し、高感度パイロシークエンサーを用いてLINE-1のメチル化レベルや癌関連遺伝子のメチル化の検討を行った。またmiRNA発現に関してはアレイシステムを用いて解析し、同定された有望なmiRNAはその検証として多症例の大腸腫瘍を用いてその発現を定量的RT-PCR法で検討した。

## 1. 大腸癌のLINE-1メチル化レベルとmiRNA 発現異常の相関と臨床への応用

ゲノムワイドDNA低メチル化の指標としてLINE-1メチル化レベルの解析が用いられてい

るが<sup>(文献1)</sup>、臨床検体においてそのメチル化レベルを安定して測定するのは容易ではない。そこで我々はエピジェネティックな変化で制御されるmiRNAに着目。LINE-1メチル化レベルと強い相関を示すmiRNAを同定するためアレイシステムを用いてその発現を網羅的に解析した。アレイ解析の対象として29例の大腸癌症例を用いたが(図1)、その結果、LINE-1メチル化レベルとその発現レベルが最も強く正の相関を示したmiRNA-31(miR-31)が同定された。

図1

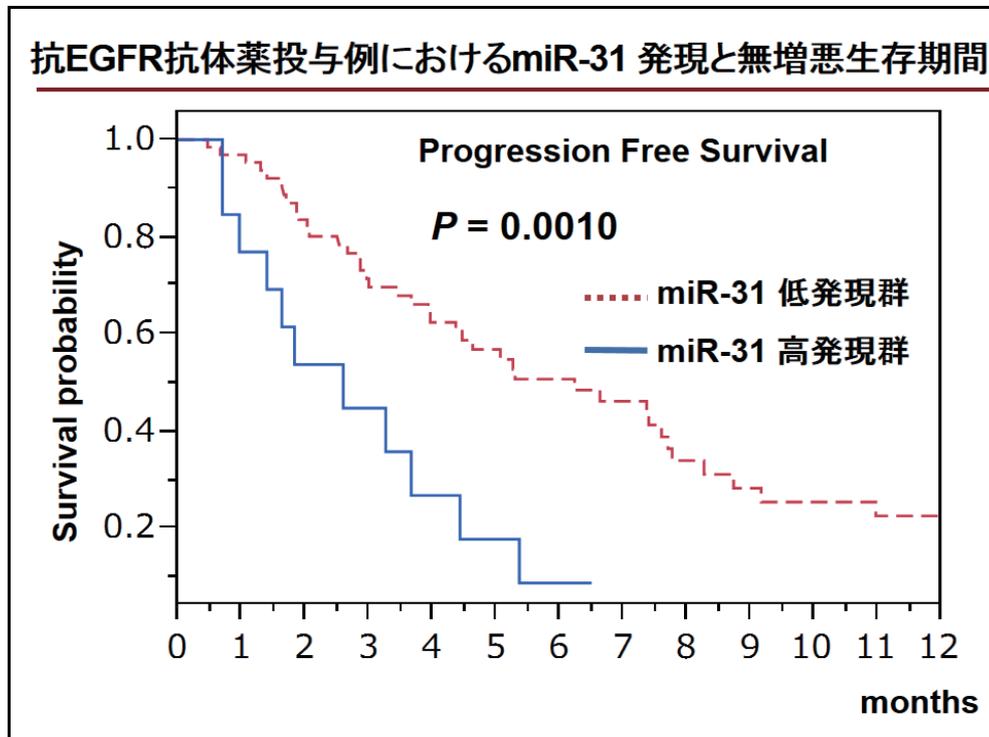


このmiRNAを700例の大腸癌症例で検証してみたところLINE-1メチル化レベルと正の相関を認め( $P < 0.0001$ )、分子異常に関してはBRAF遺伝子変異とも相関を認めた<sup>(文献2)</sup>。

近年、抗EGFR抗体薬の効果が報告され、KRAS野生型転移性大腸癌の治療薬として使用されている。またBRAF、NRAS、PIK3CA遺伝子は、KRASと同様にEGFRを介したRAS-RAF-MEK-ERKやPI3K/Aktシグナル経路で重要な働きをする遺伝子であり、それらの変異症例では、KRAS遺伝子が野生型であっても抗EGFR抗体薬の治療効果が期待できないと報告されている。よってこのmiR-31はBRAF遺伝子変異と強い相関を認めたため、EGFR下流シグナルを制御する可能性があるため、転移性大腸癌の抗EGFR抗体薬投与例で効果予測のバイオマーカーとして有用であるかについても検討。その結果、miR-31高発現群ではprogression free survival (PFS) が有意に短いこと(図2)が明らかとなった。よって現在、我々はこのmiR-31を大腸癌の分子診断・標的治療の新規バイオマーカーとして特許出願中(出願番号: 特願

2013-126021)である。またmiRNAのクラスター解析ではこのmiR-31と同じクラスターに入り、miR-31と強い相関を認めたmiRNAがいくつか発見されたため(図1)、これらのmiRNAについても、抗EGFR抗体薬の効果予測となるものが存在しないかどうか検討しているところである。

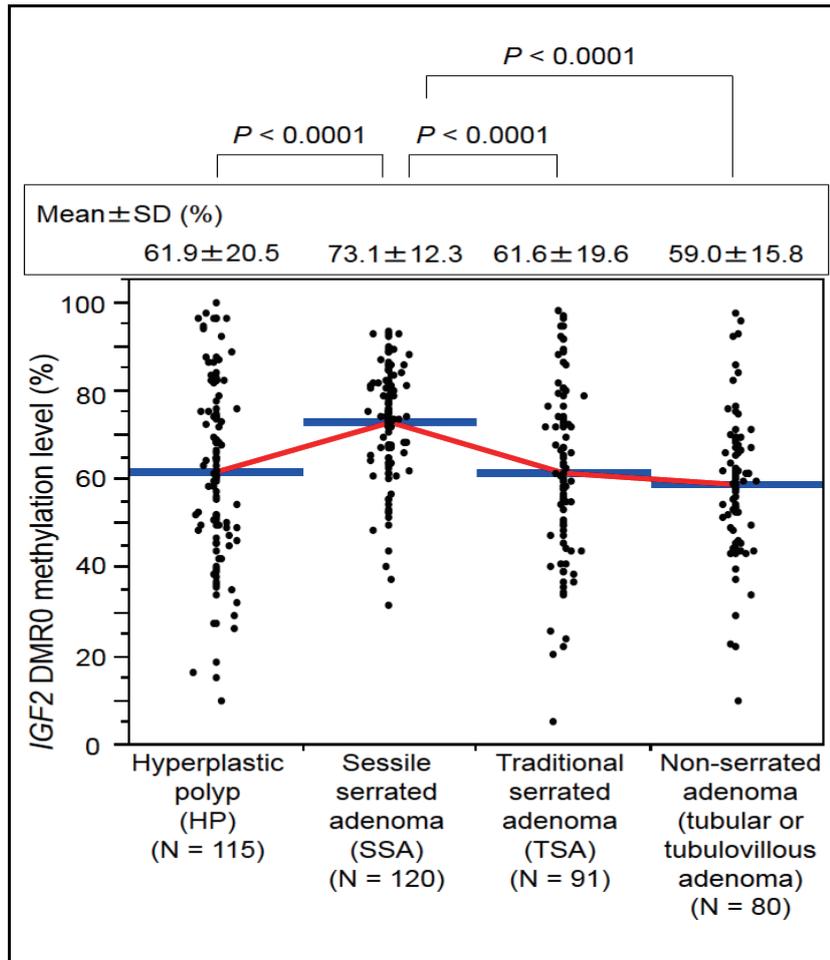
図2



## 2. 大腸鋸歯状病変を対象とした癌関連遺伝子のメチル化・遺伝子変異、miRNA発現の解析

対象は300例を超える大腸鋸歯状病変 (hyperplastic polyp、SSA、traditional serrated adenoma) で、DNAおよびmiRNAを抽出し、遺伝子変異や癌関連遺伝子のメチル化、LINE-1のメチルを解析。更に大腸癌の予後やLINE-1メチル化レベルとも相関するIGF2 DMR0のメチル化レベル(文献<sup>3</sup>)についても検討した。その結果、大腸鋸歯状病変はいずれの組織型においてもLINE-1の低メチル化を示すことはなかったが、IGF2 DMR0の低メチル化はhyperplastic polypやtraditional serrated adenomaと比べ、SSAではほとんどみられず、それらを鑑別するマーカーとなりうる可能性が示唆された(図3)。また癌関連遺伝子のメチル化マーカーを用いてCpG island methylator phenotype (CIMP)についても検討を行ったが、CIMPは他の鋸歯状病変と比較してSSAで有意に多く認められ( $P < 0.0001$ )、またSSAの癌化例では前例CIMP陽性であり、そのエピジェネティックな異常がSSAの癌化に関与している可能性が示唆された。miRNAに関する検討では大腸腫瘍でoncogenicな働きをし、BRAF遺伝子変異とも相関を認めるmiR-31発現を大腸鋸歯状病変で検討。その結果、miR-31はhyperplastic polyp (HP) と比べ、SSAやtraditional serrated adenoma (TSA) で高発現していることが明らかとなった。

図 3



### 3. 大腸多発癌症例におけるメチル化異常とmiRNA発現の解析

大腸多発癌症例における癌のペア同士のLINE-1やIGF2 DMR0メチル化レベル、癌関連遺伝子のメチル化、更にmiR-31発現を解析し、それらを比較検討したが、いずれの分子異常も同一症例のペア同士で相関を示すことが多い傾向がみられた。また大腸正常粘膜においてもそれらを解析したが、正常粘膜では異常は認められなかった。

### 考 察

miRNAアレイシステムにより同定されたmiR-31はLINE-1メチル化レベルだけでなくBRAF変異とも有意に相関していたことから大腸癌のEGFR下流シグナルのRAS-RAF-MEK-ERK経路の活性化に關与する重要なmiRNAの一つである可能性が示唆された。またmiR-31高発現群は大腸癌の不良な予後とも相関し、抗EGFR抗体薬の感受性においてもPFSの短縮が認められたことから、新規バイオマーカーとして大腸癌の分子診断・標的治療のターゲットとなることが期待される。またmiR-31以外にもRAS-RAF-MEK-ERK経路活性化に關わる可能性があるmiRNAがいくつか見つかったためそれらについても、我々は解析を進める予定。

また大腸鋸歯状病変における検討ではSSAではIGF2 DMR0のメチル化レベルが高値でかつ、CIMP陽性例が有意に他の組織型と比べ、多いことが明らかとなった。よってSSAは多くの癌関連遺伝子がメチル化されていること、またIGF2 DMR0のメチル化レベルが高値であることが明らかとなったことから、それらの分子異常の違いを利用した新たな診断方法の開発も期待される。

miRNAに関してはこれまでに多症例の大腸鋸歯状病変を対象に検討した報告はなかったが、今回我々はmiR-31がHPと比較してSSAやTSAで高発現していることを明らかにした。よってmiR-31はserrated pathwayの発育進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。またmiRNAはエピジェネティックな変化を制御することが報告されていることからmiR-31がSSAやTSAの高メチル化に寄与している可能性もあり、今後、更に検討を進める予定である。

## 要 約

1. 今回のmicroRNAアレイを用いた検討で、我々は大腸癌のLINE-1メチル化レベルと関連するmicroRNA-31 (miR-31) を同定し、その分子は大腸癌の予後やBRAF遺伝子変異とも有意に関連していることを明らかにした。
2. 転移性大腸癌の抗EGFR抗体薬投与例でmiR-31高発現群はPFSの短縮が認められたことから、EGFR下流シグナルのRAS – RAF – MEK – ERK経路の活性化に関与する可能性が示唆された。よってmiR-31は大腸癌の新規バイオマーカーとして期待される。
3. 大腸鋸歯状病変における検討ではsessile serrated adenoma (SSA) は他の鋸歯状病変と比較して、多くの癌関連遺伝子のメチル化、またLINE-1やIGF2 DMR0のメチル化レベルも高値であることが判明した。一方、miR-31がSSAやTSAで高発現していることが明らかとなった。よってmiR-31はserrated pathwayの発育進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、それらの分子異常を利用した新たな診断方法の開発も期待される。

## 文 献

1. Ogino S, **Nosho K**, Kirkner GJ, et al. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. J Natl Cancer Inst. 100:1734-38, 2009.
2. **Nosho K**, Igarashi H, Nojima M, et al. Association of MicroRNA-31 with BRAF mutation, Colorectal-Cancer Survival and Serrated pathway. Carcinogenesis. 2013 (in press) .
3. Baba Y\*, **Nosho K**\*, Shima K, et al. Hypomethylation of the IGF2 DMR in Colorectal Tumors, Detected by Bisulfite Pyrosequencing, is Associated with Poor Prognosis. Gastroenterology. 139:1855-64, 2010. \*These authors contributed equally