

平成30年 5月28日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19352

研究課題名(和文) 消化管がん進展過程におけるエピゲノム異常とnoncodingRNA発現の統合解析

研究課題名(英文) Epigenetic dysregulation of noncoding RNAs in gastrointestinal cancer progression

研究代表者

新沼 猛(Ninuma, Takeshi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60708113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：消化管がん転移に寄与するlncRNAをTCGAの大腸がんの遺伝子発現データであるCOADREAD exonexpressionを用いて抽出した。正常大腸より発現が高く、リンパ節転移陽性群で転移陰性群より発現が高いlncRNAから21遺伝子を解析の対象とした。選択したlncRNAの発現を大腸がん細胞で検討し、大腸がんより正常より発現が上昇しているlncRNAとしてDUXAP8, DUXAP10を抽出した。DUXAP10をノックダウンは細胞増殖を有意に抑制し、スクラッチアッセイでは遊走能の抑制が認められた。以上よりDUXAP10は大腸癌において増殖、遊走能に関与するlncRNAと考えられた。

研究成果の概要(英文)：First, we screened for noncoding RNAs which contribute to metastasis of gastrointestinal cancer from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. We selected COADREAD exon expression dataset, and found 21 lncRNA genes were upregulated in the group with lymph node metastasis compared to the group without metastasis. We assessed expression levels of these lncRNA genes in the series of colon cancer cell lines and normal colon tissues. In this analysis, DUXAP8 and DUXAP10 genes showed higher expression in cancer cells than normal tissues. Next, we examined DUXAP10 functions in colon cancer cells by knockdown using lentivirus vector. Depletion of DUXAP10 inhibited colon cancer cell growth and migration ability, thereby, DUXAP10 gene has oncogenic roles in colorectal cancer.

研究分野：cancer epigenetics

キーワード：noncoding RNA colon cancer

1. 研究開始当初の背景

現在、消化管がんの治療として内視鏡および外科的切除、化学療法、放射線治療が行われており、進行度や病期により最適な治療法が決定されている。消化管内視鏡などの技術進歩により早期発見・早期治療による根治が望める症例は確実に増えているが、切除不能例や遠隔転移例の治療成績向上はいまだに解決すべき課題である。そのためにも上皮間葉転換、浸潤、転移などの分子機構のさらなる解明が望まれている。

近年、タンパク質をコードしない noncoding RNA が、腫瘍の発生および進展に重要な役割を担うことが明らかにされつつある。これまで我々は、消化管腫瘍における miRNA および lncRNA とエピゲノム異常との関連を解析することで、診断・治療への応用を目指してきた。まず、miR-196a と lncRNA である HOTAIR の過剰発現が、消化管間質腫瘍(GIST)の悪性を促す一因であり、予後予測マーカーおよび治療標的として有望であることを明らかにした (Cancer Res 2012)。さらに、miR-34a および miR-335 をコードする遺伝子のプロモーター CpG アイランドが GIST において高頻度にメチル化されていること、そして miR-34a および miR-335 が GIST において腫瘍抑制因子として機能することを明らかにした (PLOS ONE 2015, 平成 26-27 年度 科研費若手研究 B)。さらに消化管腫瘍の転移および再発に関与する miRNA を同定し、報告した (Oncol Lett 2017)。これまでの解析を通して、遺伝子発現プロファイルとエピゲノム解析の組み合わせから、がん関連 noncoding RNA を同定する手法を確立し、腫瘍の悪性を促進する RNA 分子の同定にも成功した。これらの知見を推し進め、消化管がんの浸潤・転移に関わる noncoding RNA を明らかにすることで、診断・治療戦略に資する知見を得ることがで

きると着想した。

2. 研究の目的

消化管腫瘍の治療において浸潤・転移は根治を妨げる重要な要因であり、様々な観点からそのメカニズムの解明や治療への応用が研究されている。近年 microRNA (以下 miRNA) および長鎖 noncoding RNA (以下 lncRNA) などの機能性 RNA が、腫瘍発生および進展に関与することが明らかにされつつある。本研究は消化管がん臨床検体を対象に、エピゲノム異常 (DNA メチル化ならびにヒストン修飾) と noncoding RNA 発現を網羅的に解析し、その統合解析から消化管がんの浸潤・転移に関わる分子を同定することを目的とする。また機能解析を行うことで、消化管がんの診断および治療法開発につながる成果を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 消化管がん臨床検体のエピゲノム異常

の解析: 臨床検体の採取においては、札幌医科大学倫理委員会、研究協力施設である秋田赤十字病院倫理委員会の承認を得て行い、内視鏡的あるいは外科的に切除された消化管がんの癌部組織を解析対象とする。微小検体についてはレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションによって病変部のみを分離する。また新鮮検体に対して腺管分離法、または上皮マーカー (EpiCAM) に対する抗体を用いて上皮細胞を分離し、それぞれ DNA および RNA 抽出を行う。DNA メチル化については Infinium Human Methylation 450K BeadArray (Illumina) を用いて網羅的な解析を行う (15 例程度を目標とする)。また、バイサルファイト・パイロシーケンス法により個々の遺伝子メチル化のバリデーションを行う。ヒストン修飾はクロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-seq) により解析する。遺伝子転写活性化のマーカーであるトリメチル化ヒストン H3K4 (H3K4me3)、およびトリメチル化ヒストン H3K27 (H3K27me3) に対する抗体を用いて、それぞれクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、その後ディープシーケンス解析を行う。

(2)消化管がんにおける noncoding RNA の

発現解析:臨床検体より抽出したRNAを対象に SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ ver.3.0 (Agilent)を用いて遺伝子発現を網羅的に解析する。このマイクロアレイはタンパク質をコードする遺伝子に加え、Harvard 大学の Broad Institute が同定した約1万種類の Human lincRNA catalog およびゲント大学で同定された LNCipedia2.1 に基づいたプローブも搭載されており、計約3万の noncoding RNA を検出することができる。同時に SurePrint miRNA microarray (Agilent)によってマイクロ RNA 発現の網羅的な解析を行う。miRNA マイクロアレイは現在 miRBase rel.21.0 に準拠しており2588種の mature miRNA を同時に解析可能である。

(3)エピゲノムデータと noncoding RNA 発

現の統合解析:Infinium Human Methylation 450K BeadArray と ChIP-seq により得られたエピゲノムデータと臨床病理学的所見との比較検討により、浸潤・転移と関連するエピゲノム異常を同定する。同時に、マイクロアレイ解析により得られた noncoding RNA の発現をアレイ統合解析ソフトウェアである GeneSpringGX (Agilent)を用いて解析し、エピゲノム異常と予測される発現変化の挙動が一致する遺伝子群を抽出することで、消化管がんの浸潤・転移に重要な機能を有する noncoding RNA を抽出する。抽出した miRNA については TargetScan などの予測アルゴリズムを用いて標的候補遺伝子を探索し、実際の遺伝子発現変化との統合解析により、転移の形成・維持に重要な役割を果たす miRNA およびその標的遺伝子を抽出する。

(4)抽出した noncoding RNA の機能解

析:miRNA については、培養がん細胞株に

miRNA mimic molecule あるいは miRNA inhibitor (Applied Biosystems)を導入し、機能解析を行う。MTT アッセイ、wound healing assay、Matrigel invasion アッセイなどにより細胞増殖・遊走能・浸潤能に与える影響を評価する。同時に miRNA の標的遺伝子候補を抽出し、レポーターアッセイ、RT-PCR、ウエスタンブロットなどにより検証する。さらに標的候補遺伝子の過剰発現あるいはノックダウンによる効果を検証する。lincRNA については、癌細胞株を用いた強制発現系およびノックダウン系を用いて増殖・浸潤能・遊走能の影響を評価する。以上の解析から noncoding RNA をさらに絞り込み、安定発現あるいはノックダウンさせたがん細胞株をヌードマウスに移植し、腫瘍形成・浸潤・転移への影響を評価する。

(5)臨床病理学的所見との比較検討:抽出

した noncoding RNA の発現、またその遺伝子のエピゲノム変化と、腫瘍病期、TMN 分類、予後などの臨床病理学的因子との相関を、多数の臨床検体(目標 200~300 症例)を用いて解析し、バイオマーカーとしての有用性を評価する。

4. 研究成果

本研究においてはまず、消化管がん転移に寄与する noncoding RNA を The Cancer Genome Atlas (TCGA) データによるスクリーニングを試みた。TCGA の大腸がんの遺伝子発現データである COADREAD exon expression を用いて正常大腸より発現が高く、リンパ節転移陽性群で転移陰性群より発現が高い noncoding RNA の exon を抽出したところ、有意な 156 exon が抽出された。その中から複数の exon が存在していた 21 の noncoding RNA を解析の対象とした。選択した noncoding RNA の発現を大腸がん細胞株 SW480 とそのリンパ節転移より樹立された SW620 正常大腸において解析したとこ

るLOC441178とDNAJC3-AS1が正常よりSW480で高く、SW620でさらに発現が上昇しているnoncoding RNA候補として抽出された。その他大腸がん全体で正常より発現が上昇しているnoncoding RNAとしてDUXAP8, DUXAP10が抽出された。大腸癌細胞株を用いてレンチウイルスベクターによりDUXAP10をノックダウンしたところ細胞増殖を有意に抑制し、スクラッチアッセイでは遊走能の抑制が認められた。以上より消化管がん特に大腸がん転移に関与する可能性のあるnoncoding RNAを抽出することができた。cell viability assayならびにwound healing assayの機能解析の結果からDUXAP10は大腸癌において増殖、遊走能に関与するlncRNAと考えられた。DUXAP10については臨床検体での解析やエピゲノム解析中である。DNAJC3AS1などのlncRNAについては順次ノックダウン・過剰発現系による機能解析を行っているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Niinuma T, Suzuki H, Sugai T. Molecular characterization and pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 3;2 2018. 査読あり

Aoki H, Yamamoto E, Takasawa A, Niinuma T, Yamano HO, Harada T, Matsushita HO, Yoshikawa K, Takagi R, Harada E, Tanaka Y, Yoshida Y, Aoyama T, Eizuka M, Yorozu A, Kitajima H, Kai M, Sawada N, Sugai T, Nakase H, Suzuki H. Epigenetic silencing of SMOC1 in traditional serrated adenoma and colorectal cancer. *Oncotarget.* 9:4707-4721, 2017. 査読あり

Shindo T, Shimizu T, Nojima M, Niinuma T, Maruyama R, Kitajima H, Kai M, Itoh

N, Suzuki H, Masumori N. Evaluation of Urinary DNA Methylation as a Marker for Recurrent Bladder Cancer: A 2-Center Prospective Study. *Urology.* 113:71-78, 2018. 査読あり

Niinuma T, Kai M, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Maruyama R, Nobuoka T, Nishida T, Kanda T, Hasegawa T, Tokino T, Sugai T, Shinomura Y, Nakase H, Suzuki H. Downregulation of miR-186 is associated with metastatic recurrence of gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Lett.* 14:5703-5710, 2017. 査読あり

Kai M, Yamamoto E, Sato A, Yamano HO, Niinuma T, Kitajima H, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Hatahira T, Nakase H, Sugai T, Yamashita T, Toyota M, Suzuki H. Epigenetic silencing of diacylglycerol kinase gamma in colorectal cancer. *Mol Carcinog.* 56:1743-1752, 2017. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

新沼 猛 「消化管腫瘍の再発に関連するmicroRNAの解析」 第10回日本エピジェネティクス研究会年会 2016年5月19日~5月20日 大阪府豊中市 千里ライフサイエンスセンター

新沼 猛 「消化管腫瘍の再発に関連するmicroRNAの解析」 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6日~10月8日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

新沼 猛 「消化管間質腫瘍においてエピジェネティックに制御される長鎖noncoding RNAの探索」 第74回日本癌学会学術総会 2017年9月28日~9月30日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

新沼 猛 「消化管間質腫瘍においてエピジェネティックに制御される長鎖noncoding RNAの解析」 第11回日本エピジェネティクス研究会年会 2017年5月22日~5月23日 東京都千代田区 一橋講堂

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新沼 猛 (Ninuma Takeshi)
札幌医科大学・分子生物学講座・助教
研究者番号：60708113

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

鈴木 拓 (Suzuki Hiromu)
札幌医科大学・分子生物学講座・教授
研究者番号：20381254