

令和元年6月14日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14989

研究課題名(和文) スキルス胃がんの転移に関わる長鎖ノンコーディングRNAの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of long non-coding RNAs associated with metastasis of human scirrhous gastric cancers

研究代表者

原 敏文 (Hara, Toshifumi)

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：80456219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：スキルス胃がんは、高頻度に転移を起こす極めて予後の悪い癌である。本研究では、タンパクに翻訳されない長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)に注目し、癌の転移の分子機構の解析を行った。我々研究グループが樹立した腹膜転移細胞モデルを用いて統合的遺伝子発現解析を行った結果、これまでに癌の転移では機能の知られていない数多くのlncRNAが癌転移能獲得に伴って発現変動していることが明らかとなった。また、lncRNAの発現変動により、癌細胞の増殖が変動することを明らかにした。本研究により、lncRNAがスキルス胃がんの腹膜転移の新たなシグネチャーとなることを提起している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の癌治療において、癌転移を標的とする治療薬は開発されていない。その原因の一つは、癌転移の分子機構が未だ解明されていないことにある。本研究では、ヒトスキルス胃がんの腹膜転移細胞モデルを用いた解析により、これまで癌の転移で機能の知られていない数多くのlncRNAが癌の転移能獲得に伴って発現変動していることを明らかにした。本研究の成果は、腫瘍におけるlncRNA発現レベルが癌転移を予測するための転移予測マーカーとして利用できることを示唆している。今後、さらに研究が進むことで、将来的に癌転移の分子機構解明の一端を解き明かすだけでなく、癌治療薬の開発に繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of human scirrhous gastric cancers (SGCs) is very poor, mainly owing to high frequency of metastasis. In this study we analyzed the molecular mechanisms of SGCs metastasis, particularly focused on long non-coding RNAs (lncRNAs) associated with SGCs metastasis. By analysis of the integrated gene expression in our original metastatic cell models, we found the alteration of lncRNAs expression associated with acquisition of metastatic property. In particular, a majority of lncRNAs are largely unknown in cancer metastasis. Manipulation of lncRNAs expression had impact in cell growth. Our findings indicate that lncRNAs are novel signatures of SGCs metastasis, and would be a key for approaching to understand the molecular mechanisms of SGCs metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌 転移 ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

癌による死の90%は、癌の転移が原因である。そのため、癌転移の分子機構を明らかにし、転移を食い止める癌の治療法が開発できれば、癌の予後は劇的に改善されると予想される。近年、次世代シーケンサーの急速な発展に伴い、腫瘍発生の原因となる宿主遺伝子の変異が網羅的に明らかとなる一方で、癌転移の分子機構については未だ不明な点が多い。癌転移の分子機構の解析が難しい要因は主に以下の2点である。癌転移の研究がこれまで非常に限定された細胞株や臨床を反映しない実験モデルのみで解析が進められてきたこと。癌の転移は、生体内において癌細胞とそれを取り巻く正常細胞が複雑に相互作用をする過程を経る現象であること。つまり、癌転移の分子機構の本質を理解するためには、個体レベルで癌細胞が正常細胞との相互作用を受けながら周辺組織へ転移をする癌臨床を踏まえた実験モデルを構築することが重要である。

我々は、スキルス胃がん(びまん性胃がん)に注目して研究を進めている。スキルス胃がんは、胃がんの主要なサブタイプである低分化型腺癌であり、通常の胃がんに比べて癌の進行が早く、リンパ節や肝臓、腹膜へ高頻度に転移を起こす。原発巣を切除した場合でも、転移を起した患者の5年生存率は、10%程度と予後は不良である。

スキルス胃がん転移の分子機構を明らかにするため、我々はスキルス胃がんの患者由来の細胞株 HSC-44PE と 44As3 を用いた。HSC-44PE は、スキルス胃がんの患者より樹立された癌細胞株である。HSC-44PE をヌードマウス胃の漿膜下に同所性移植すると、一部の細胞が腹膜に転移する。この転移細胞を再び同所性移植することを繰り返した結果、高い転移能をもつ 44As3 が樹立された。本研究では、親細胞である HSC-44PE と転移モデル細胞 44As3 で発現する遺伝子を比較解析することにより、スキルス胃がんの転移に関わる分子機構を明らかにし、癌転移を標的とした治療研究基盤の確立を目指している。

近年、タンパクに翻訳されない長鎖ノンコーディング RNA(lncRNA)が、生体の発生や細胞機能の維持に重要な役割を持つだけでなく、その機能破綻により癌、神経疾患、感染症など様々な疾患の原因になることが報告されている(Batista PJ and Chang HY, Cell, 2013)。そこで、転移能の増加に伴い発現変動する lncRNA を網羅的に解析し、それら機能を明らかにすることで、スキルス胃がんの転移機構の一端が明らかになる可能性がある。

2. 研究の目的

癌は様々な細胞機能の獲得に伴い、遺伝子発現プロファイリングを劇的に変化させることが知られている。近年では、上皮系遺伝子プロファイリングを持つ癌細胞が、間葉系遺伝子プロファイリングを持つ癌細胞へと変化する上皮間葉転換(Epithelial to mesenchymal transition; EMT)により、癌転移能を獲得することが知られている。そこで、本研究ではスキルス胃がんの親細胞である HSC-44PE と転移モデル細胞 44As3 を用いて、それぞれの細胞の遺伝子発現プロファイリングの全貌を明らかにすることで、スキルス胃がんの転移能獲得に伴って、発現が変動する lncRNA を網羅的に明らかにする。また、スキルス胃がんの転移能獲得に伴って発現変動した lncRNA の機能と転移における役割を明らかにすることで、lncRNA の発現制御の視点からがん転移を標的とした癌治療の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

スキルス胃がんの患者より樹立された親株(HSC-44PE)、および親株をヌードマウス胃に同所性移植を繰り返したことにより樹立された 44As3 からなるスキルス胃がんの転移細胞モデルを本研究に用いた。これら転移細胞モデルの RNA 発現プロファイルを網羅的に明らかにするとともに、Cap analysis analysis of gene expression (CAGE)法による遺伝子発現解析を行った。これら結果を統合的に解析することにより、転移細胞モデルの精度の高い遺伝子発現プロファイリングデータを取得した。遺伝子発現プロファイリングデータを解析し、癌転移能獲得に伴い発現変動する lncRNA 群を明らかにする。遺伝子発現プロファイリングデータについて、遺伝子毎に qPCR を行うことで、個別に発現変動の検証を行う。また、siRNA を用いて lncRNA の発現量を変動させて、細胞機能の変化について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 転移細胞モデルの網羅的遺伝子発現解析

腹膜転移能獲得に伴って発現変動する遺伝子を網羅的に明らかにするため、HSC-44PE 細胞株および 44As3 細胞株より RNA を抽出し、マイクロアレイ法による解析を行い、細胞内で発現する遺伝子情報を取得した(図 1)。また、両細胞株を用いて CAGE 法による遺伝子発現解析を行い、転写開始点および遺伝子発現量データを取得した。2 つの異なる方法から得られた遺伝子発現解析の結果を統合することで、HSC-44PE 細胞株および 44As3 細胞株の精度の高い遺伝子発現情報を取得し、腹膜転移能獲得に伴って発現変動する遺伝子群の同定を行った。

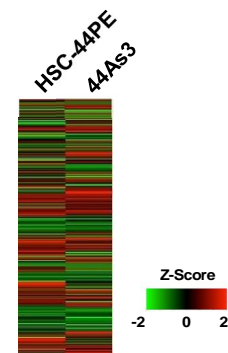


図1. マイクロアレイ法による遺伝子発現解析結果

(2) 腹膜転移能獲得に伴って発現変動する遺伝子群の同定

腹膜転移能獲得に伴い発現変動する遺伝子群のうち、発現が5倍以上増加する遺伝子を調べたところ、マイクロアレイ法による解析では377遺伝子、CAGE法による解析では1603遺伝子が明らかとなった。また、マイクロアレイ法およびCAGE法の両方で共通する遺伝子は163遺伝子であることが明らかとなった(図2)。163遺伝子の中には、H19など既に癌転移において発現上昇することが知られている遺伝子も含まれていたことから、今回の解析で得られた163遺伝子は、腹膜転移において特に注目すべき遺伝子群と考えられた。

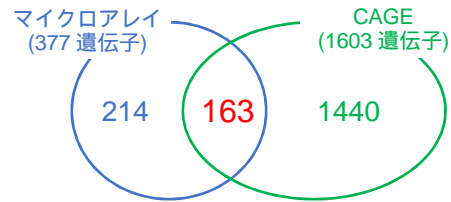


図2. 腹膜転移能獲得に伴い発現増加する遺伝子数の統合解析の結果

(3) 腹膜転移能に伴い発現増加する lncRNA の同定

腹膜転移能獲得に伴い発現変動する lncRNA のうち、マイクロアレイ法による解析で複数のプローブで発現増加が確認された lncRNA に解析対象を絞った。その結果、本研究では LINC01060 および LINC01133 について解析を進めた。qPCR 法により個別に lncRNA の発現量を検証したところ、LINC01133 では、HSC-44PE 細胞株に対し 44As3 細胞株ではおよそ 20 倍の発現増加を、また LINC01060 では、60 倍の発現増加を見出した。また、これら lncRNA の発現と胃癌患者の予後について相関性を調べたところ、LINC01133 を高発現する患者は、低発現の患者よりも予後が悪いことが判明した。LINC01060 については、患者のデータが得られないため、患者の予後と lncRNA 発現の相関については不明であった。

(4) 腹膜転移能に伴い発現増加する lncRNA の機能解析

lncRNA の細胞機能を解析するため、siRNA を用いて lncRNA の発現抑制を試みた。siRNA の細胞への導入により細胞内の LINC01060 および LINC01133 発現レベルは、それぞれ 90%以上低下することが分かった。そこで、これら siRNA を細胞に導入し細胞増殖能の変化を調べたところ、LINC01060 および LINC01133 の発現低下は、それぞれ細胞増殖能を抑制することが明らかとなった。さらに、細胞遊走能について、創傷治癒アッセイにより評価したところ LINC01060 および LINC01133 の発現低下は、細胞遊走能には有意な変化を確認することは出来なかった。

(5) 結果のまとめ、および考察

本研究は、腹膜転移能獲得に伴い発現変動する新規の lncRNA 群の存在を見出すことができた。これら lncRNA の細胞機能については、その一部が明らかとなった。本研究の成果を足がかりに、今後研究を進めていくことにより、腹膜転移における lncRNA の具体的な役割の解明に発展させていくことが可能であると考えられた。また、本研究の成果は、腫瘍における lncRNA 発現レベルが癌転移を予測するための転移予測マーカーとして利用できることを示唆している。今後、さらに研究が進むことで、将来的に癌転移の分子機構解明の一端を解き明かすだけでなく、癌治療薬の開発に繋がる可能性を秘めていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Takei Y, Shen G, Morita-Kondo A, Hara T, Mihara K, Yanagihara K. MicroRNAs Associated with Epithelial-Mesenchymal Transition Can Be Targeted to Inhibit Peritoneal Dissemination of Human Scirrhous Gastric Cancers. *Pathobiology*, 85, 232-246 (2018) 査読有, DOI: 10.1159/000488801.
2. Kozakai T, Takahashi M, Higuchi M, Hara T, Saito K, Tanaka Y, Masuko M, Takizawa J, Sone H, Fujii M. MAGI-1 expression is decreased in several types of human T-cell leukemia cell lines, including adult T-cell leukemia. *Int J Hematol*, 107, 337-344 (2018) 査読有, DOI: 10.1007/s12185-017-2359-1.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Hara T, Yanagihara K, Takei Y. Comprehensive genome-wide gene expression profiling reveals novel signatures of peritoneal metastasis in human scirrhous gastric cancer. 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, 2019年2月8日-12日、Westin Maui Resort & Spa(マウイ島・米国)
2. 浅野秀斗, 森田あや美, 原敏文, 武井佳史. スキルス胃癌の腹膜転移において Galectin 4 が果たす役割の解明. 日本薬学会第 139 年会、2019年3月20日-23日、幕張メッセ

(千葉県・千葉市)

3. 森田あや美、須藤夕稀、原敏文、武井佳史. 活性型ビタミン D3 がスキルス胃癌の腹膜転移能に与える影響. 日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月 20 日-23 日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)
4. 原敏文、柳原五吉、武井佳史. The hallmarks of long non-coding RNA associated with metastasis in human scirrhus gastric cancer. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年 9 月 27 日-29 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
5. 原敏文、柳原五吉、武井佳史. スキルス胃がんの腹膜転移に伴って発現変動する lncRNA の同定とその機能解析. 第 20 回日本 RNA 学会年会、2018 年 7 月 9 日-11 日、コスモスクエア国際交流センター(大阪府・大阪市)
6. 原敏文、服部真晃、花井檀、森田あや美、武井佳史. スキルス胃癌の転移に伴い発現変動する遺伝子シグネチャーの同定とそれら遺伝子の機能解析. 第 82 回日本生化学会中部支部例会、2018 年 5 月 19 日、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)
7. 野村有紀、原敏文、森田あや美、小幡徹、田中基裕、武井佳史. スキルス胃がんの転移を標的とした化合物スクリーニング方法の確立と一次スクリーニングの結果. 第 64 回日本薬学会東海支部総会大会、2018 年 6 月 30 日、金城学院大学(愛知県・名古屋市)
8. 山口優紀、原敏文、森田あや美、武井佳史. スキルス胃がんの転移に伴い発現変動する長鎖非コード RNA(lncRNA)の同定とその機能解析. 第 64 回日本薬学会東海支部総会大会、2018 年 6 月 30 日、金城学院大学(愛知県・名古屋市)
9. 服部真晃、原敏文、森田あや美、武井佳史. スキルス胃癌の腹膜転移機構の解明に関する研究. 日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日-28 日、石川県立音楽堂他(石川県・金沢市)
10. 花井檀、原敏文、森田あや美、武井佳史. スキルス胃癌の腹膜転移に関わる遺伝子の機能解析. 日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日-28 日、石川県立音楽堂他(石川県・金沢市)
11. 原敏文、柳原五吉、武井佳史. スキルス胃がんの網羅的転写解析による新たな転移シグネチャーの抽出. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 日-30 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
12. 武井佳史、原敏文、落谷孝広、柳原五吉. スキルス胃癌患者由来のリンパ行性転移細胞株の樹立とその抗転移療法への応用. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 日-30 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
13. Hara T, Nakamura M, Fujii M. Selective targeting of adult T-cell leukemia by miR-124-3p through repression of multiple genes essential for the survival of HTLV-1-infected cells. 第 43 回内藤コンフェレンス、2017 年 6 月 27 日-30 日、シャトレーゼガトーキングダムサッポロ(北海道・札幌市)

〔その他〕

ホームページ等

愛知学院大学薬学部生体機能化学講座

http://www.phar.agu.ac.jp/lab/med_biochem/index.html

6. 研究組織

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、研究者個人に帰属されます。