

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300366

研究課題名(和文)機能性RNA統合解析による日米欧の胃・大腸発癌の分子疫学的解明と臨床応用・癌予防

研究課題名(英文)Molecular epidemiological elucidation of Japanese, American, and European gastric and colorectal carcinogenesis by integrated analysis of functional RNA and clinical application and cancer prevention

研究代表者

山本 博幸 (YAMAMOTO, Hiroyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40332910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,000,000円、(間接経費) 5,100,000円

研究成果の概要(和文)：日米欧の胃癌、大腸癌を対象に、DNAメチル化、miRNA発現、標的癌関連遺伝子変異、宿主SNPの点からmiRNA異常を統合的に解析した。DNAメチル化およびmiRNA発現プロファイルの詳細、個々の重要なDNAメチル化およびmiRNA発現変化を明らかにした。標的癌関連遺伝子の3'-UTR、5'-UTRなどnon-coding DNA領域の複数の遺伝子変異を明らかにした。pri-miR、pre-miR、miRNAプロセッシングに関わる各遺伝子、さらに標的となる癌関連遺伝子のmiRNA結合配列等のSNPを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have done integrative analysis of miRNA alterations, including DNA methylation, miRNA expression, target tumor-related genes, and host SNP in Japanese, American, and European gastric and colorectal cancers. Alterations in the profiling of DNA methylation and miRNA expression were revealed. Based on the profiling results, alterations in the particular DNA methylation and miRNA were also revealed. Alterations in the non-coding DNA regions of tumor-related genes, such as 3'-UTR and 5'-UTR, were characterized. Finally, SNPs in the miRNA-related genes, such as pri-miR, pre-miR, miRNA-processing genes, and miRNA-binding sequences of tumor-related genes were characterized. These results are promising for the understanding of carcinogenesis and future clinical application.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、がん疫学・予防

キーワード：機能性RNA 消化器癌 日米欧比較 分子疫学 SNP

1. 研究開始当初の背景

日米欧の胃・大腸癌を対象に、microRNA (miRNA)、標的癌関連遺伝子、宿主の3方向からmiRNA異常を統合的に明らかにすることは、分子疫学的に発癌の機序を明らかにするばかりでなく、宿主の遺伝子情報と環境要因の関連の解明、早期診断や発癌リスク診断に臨床応用可能と考えられる。

2. 研究の目的

日本人および欧米人の胃・大腸癌組織、隣接非癌部組織、血清等を対象に次世代シーケンサーをも用いた先端的解析により以下を明らかにする。

(1) miRNA発現異常およびその原因となるmiRNAプロセッシングやエピジェネティックな機構を中心とするmiRNA制御機構の破綻の解明

(2) miRNAにより制御を受ける癌関連遺伝子の3'-非翻訳領域(untranslated region: UTR)を中心とするnon-coding DNA領域遺伝子異常の解明

(3) miRNAに関わる single nucleotide polymorphism (SNP)の網羅的解析と発癌リスクや薬剤感受性等、癌の個性との関連の解明

(4) 上記とエピゲノム解析結果を統合し、胃癌、大腸発癌進展におけるmiRNA関連異常の役割を分子疫学的に解明する。遺伝子異常の中から、診断、治療、予防に亘り革新的臨床応用つまり、発癌リスク診断や早期診断に有用なmiRNA関連異常を抽出し、即戦力となる分子マーカーを開発する。

3. 研究の方法

(1) DNAメチル化プロファイル

DNA methylome (fingerprint) を GoldenGate Assay、パイロシーケンス、methylation-specific PCR (MSP) などにより解析した。細胞株を用いてメチル化と発現との相関を解析した。

(2) miRNA発現プロファイル

miRNA microarray、real time PCR 等を用いて解析した。

(3) 癌関連遺伝子の3'-UTR、5'-UTR その他 non-coding DNA 領域の網羅的変異解析

胃癌および大腸癌の癌組織および癌細胞株より、DNAを抽出し、PCR、シーケンス等により解析した。

(4) miRNA関連 SNP、copy number variation (CNV)の網羅的解析

PCR、real time PCR 等を用いて、pri-miR、pre-miR、miRNA プロセッシングに関わる各遺伝子、さらに標的となる癌関連遺伝子の miRNA 結合配列等の SNP の関連を網羅的に明らかにした。

4. 研究成果

(1) 胃癌、大腸癌におけるDNAメチル化プロファイルの詳細を明らかにした。詳細データからさらに個々の遺伝子メチル化を解析し、その重要性を明らかにした。

(2) 胃癌および大腸癌の癌組織、隣接非癌組織におけるmiRNA発現をmiRNA microarrayを用いて解析し、miRNA発現プロファイルを明らかにした。TARBP2遺伝子やexportin-5遺伝子などのmiRNA生合成に関わる遺伝子異常の有無で、miRNA発現プロファイルに違いを認めた。さらに、DNA methylomeデータとの関連も明らかにした。

miRNA発現プロファイルから、候補遺伝子を絞り詳細に解析を進め、個々の重要なmiRNA発現変化を明らかにした。

例えば、胃癌では、多発胃癌の背景胃粘膜におけるmiR-34b/cの高メチル化を明らかにし、さらに胃癌異時性再発のマーカーとしての有用性を明らかにした。大腸癌では、miR-31がBRAF遺伝子変異群で野生型の群と比較して発現亢進しているmiRNAとして同定された。miR-31は大腸癌の不良な予後とも相関が認められたことから分子診断・標的治療の新規バイオマーカーとして期待される。

(3) 胃癌および大腸癌の癌組織および癌細胞株において、癌関連遺伝子の3'-UTR、5'-UTR その他 non-coding DNA 領域の変異解析を網羅的に行い、複数の遺伝子変異を明らか

にした。変異を認めた遺伝子に関して、変異と miRNA およびその他の機序による発現調節異常や mRNA 安定性との関連などを機能解析により明らかにした。

(4) miRNA関連SNP、CNVに関して、pri-miR、pre-miR、miRNAプロセッシングに関わる各遺伝子、さらに標的となる癌関連遺伝子のmiRNA結合配列等のSNPの相関を網羅的に明らかにした。これらSNP、CNVと上記で明らかにしたmiRNA発現変化や癌関連遺伝子の発現変化等との相関を明らかにした。

(5) miRNA発現およびその制御機構の破綻、miRNAにより制御を受ける癌関連遺伝子 non-coding DNA領域異常とその分子機構、宿主側としてmiRNAに関わるmiR-SNP、CNVと発癌リスク、癌の個性との関連の解析結果は、有用であると考えられる。

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 15 件)

1. Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Nosho K (他16名, 4番目), Yamamoto H (20番目). MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. Int J Cancer 2014 Apr 20 [Epub ahead of print]. 査読有.

DOI: 10.1002/ijc.28920

2. Suzuki R, Nosho K (他14名, 12番目), Yamamoto H (13番目), Shinomura Y (18番目). Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. J Gastroenterol, 2013 Aug 13 [Epub ahead of print]. 査読有.

DOI 10.1007/s00535-013-0861-7

3. Yamamoto H (他14名, 1番目), Nosho K (13番目), Shinomura Y (16番目). An updated

review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: Insights from bench to bedside and *vice versa*. World J Gastroenterol 20: 3927-3937, 2014. 査読有.

DOI: 10.3748/wjg.v20.i14.3927

4. Nosho K (他18名, 1番目), Igarashi H, Ito M, Nojima M, Yamamoto H (23番目), Shinomura Y (24番目). Association of microRNA-31 with *BRAF* mutation, colorectal cancer survival, and serrated pathway.

Carcinogenesis 35: 776-783, 2014. 査読有.

DOI: 10.1093/carcin/bgt374

5. Sukawa Y, Yamamoto H (他9名, 2番目), Nosho K (3番目), Shinomura Y (13番目). HER2 expression and PI3K-Akt pathway alterations in gastric cancer.

Digestion 89:12-17, 2014. 査読有.

DOI: 10.1159/000356201

6. Fernandez AF, Yamamoto H (他35名, 7番目). A DNA methylation fingerprint of 1,628 human samples. Genome Res 22: 407-419, 2012. 査読有.

DOI: 10.1101/gr.119867.110

7. Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Nosho K (他19名, 4番目), Yamamoto H (5番目), Shinomura Y (25番目). Upregulation of miR-196 α and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res 72 1126-1136, 2012. 査読有.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1803

8. Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Nosho K, Suzuki H, Shinomura Y. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA

in gastrointestinal cancer. World J Gastroenterol 18: 2745-2755, 2012. 査読有.

DOI: 10.3748/wjg.v18.i22.2745

9. Sukawa Y, Yamamoto H (他11名, 2番目), Nosho K (3番目), Shinomura Y (15番目). Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. World J Gastroenterol 18: 6577-6586, 2012. 査読有.

DOI: 10.3748/wjg.v18.i45.6577

10. Takamaru H, Yamamoto H (他15名, 12番目), Shinomura Y (18番目). Aberrant methylation of RASGRF1 is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. Cancer Prev Res (Phila) 5:1203-1212, 2012. 査読有.

DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0056

[学会発表] (計 54 件)

1. 沼田泰尚他. 大規模コホートをを用いた高齢者大腸癌と大腸鋸歯状病変の分子病理学的検討. 第86回日本消化器内視鏡学会総会. 2013年10月9日. 東京.

2. 五十嵐央祥他. microRNA-31は大腸癌におけるBRAF遺伝子変異予後と関連する. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月3日. 横浜.

3. 五十嵐央祥他. 大腸癌におけるmicroRNA-31発現とBRAF遺伝子変異・抗EGFR抗体薬感受性との関連性. 第33回日本分子腫瘍マーカー研究会. 2013年10月2日. 横浜.

4. 能正勝彦他. 大腸癌の新規バイオマーカー探索を目指したEGFR下流シグナルを制御する

マイクロRNAの検討. 第79回大腸癌研究会. 2013年7月5日. 大阪.

5. 鈴木 亮他. 胃癌の異時性多発リスク予測マーカーとしてのmicroRNA-34b/c異常メチル化測定. 第50回日本臨床分子医学会学術集会. 2013年4月12日. 東京.

6. 能正勝彦他. 大腸腫瘍におけるKRAS、BRAF、PIK3CA変異と相関を示すmicroRNAの同定を目指したアレイシステムによる網羅的検討. 第99回日本消化器病学会総会. 2013年3月22日. 鹿児島.

7. 能正勝彦他. 大腸癌におけるLINE-1メチル化レベルとmicroRNA発現を標的とした診断・個別化治療への応用. 第9回日本消化管学会総会学術集会. 2013年1月25日. 東京.

8. 能正勝彦他. 大腸癌の分子診断学におけるLINE-1メチル化レベルの重要性とmicroRNA発現の網羅的解析. 第54回日本消化器病学会大会. 2012年10月13日. 東京.

9. 山本博幸他. 遺伝子異常に基づく消化器癌の分子診断と個別化治療. 第71回日本癌学会学術集会. 2012年09月21日. 札幌.

10. 能正勝彦他. 大腸癌症例における新規バイオマーカーとしてのLINE-1メチル化レベルとmicroRNA発現の網羅的解析. 第71回日本癌学会学術集会. 2012年09月21日. 札幌.

11. 能正勝彦他. 消化器癌におけるゲノムワイドDNAメチル化・microRNA異常発現の網羅的解析とそれらを標的とした新規バイオマーカーの同定. 第71回日本癌学会学術集会. 2012年09月21日. 札幌.

12. 鈴木 亮他. miR-34b/cの異常メチル化は胃癌の異時性多発リスクに関与する. 第71回日本癌学会学術集会. 2012年09月20日. 札幌.

13. 國本浩明他. ヒトがんにおけるDNAメチル化フィンガープリントの同定: 原発不明癌の原発巣検索における有用性. 第71回日本癌学会学術集会. 2012年09月20日. 札幌.

14. 高丸博之他. 胃癌におけるエピジェネティックな遺伝子異常の網羅的解析. 第8回日本消化管学会総会学術集会. 2012年2月10日. 仙台.

15. 高丸博之他. DNAメチル化異常の網羅的な解析による新規胃癌関連遺伝子の検索. 第19回日本消化器関連学会週間. 2011年10月20日. 福岡.

16. 山本博幸他. マイクロサテライト不安定性陽性ヒト癌におけるマイクロRNA生合成経路に関わる新たな遺伝子異常: 同定と臨床応用. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月4日. 名古屋.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 博幸 (YAMAMOTO, Hiroyuki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40332910

(2) 研究分担者

能正 勝彦 (NOSHO Katsuhiko)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10597339

渡邊 嘉行 (WATANABE, Yoshiyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90329243

前畑 忠輝 (WATANABE, Yoshiyuki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90534199

篠村 恭久 (SHINOMURA Yasuhisa)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90162619

(3) 連携研究者

()

研究者番号: