

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701001

研究課題名(和文) アンチセンスRNAの機能解析と血液を用いた消化器癌の新規診断法の開発

研究課題名(英文) Analysis of antisense RNA and development of new diagnostics of gastrointestinal cancer using blood.

研究代表者

高野 恵輔 (KOHNO, Keisuke)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70615038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：アンチセンス RNA の機能解析と末梢血中の RNA の網羅的解析を行い、消化器癌の層別化・テーラーメイド治療のマーカーとすることを目的とする。大腸癌患者の血液中で健常人と変化しているアンチセンスRNAを20種同定し、これらのRNAが大腸癌患者と健常人を明確に区別することを確認した。また大腸癌患者、膵癌患者の血液中エクソソーム内で健常人と変化しているRNAをそれぞれ15種、17種同定した。これらのRNAは大腸癌患者と健常人を明確に区別することが可能であった。今後は癌種を増やし同様の解析を行いつつ、低コストで迅速診断が可能な新しい癌診断カスタムマイクロアレイの開発などを行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to analyze of antisense RNA and develop of new diagnostics of gastrointestinal cancer using blood.

We identified 20 anti-sense RNA that is changing with the healthy people in the blood of patients with colorectal cancer. These antisenseRNA was possible to clearly distinguish the healthy people and colon cancer patients. We also identified 15 miRNA and 17 miRNA, respectively, changing to healthy people in the blood of exosomes in patients with colon cancer and pancreatic cancer patients. These miRNA was possible to distinguish clearly healthy people and patients with colorectal cancer.

From these results, we will develop new low cost custom microarray for diagnosis of gastrointestinal cancer.

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：腫瘍診断学 アンチセンスRNA 消化器癌 機能性RNA ハイスループットスクリーニング法

1. 研究開始当初の背景

近年, タンパク質をコードしない non-coding RNA が, 高次クロマチン構造制御や遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた. また, トランスクリプトーム解析の結果, 予想をはるかに上回るゲノム領域において, 既知の転写単位と相補的な配列を有するアンチセンス RNA が細胞内で転写されていることが示され, センス鎖遺伝子の発現制御におけるそれらの役割が注目されている. これまで体内で数多く作られているアンチセンス RNA がどのような働きをするかは不明であったが, いくつかの研究でアンチセンス RNA がセンス RNA の働きを抑制, もしくは促進していることが報告された (Yu W, *Nature*, 2008, Faghihi M, *Nat Med*, 2008). しかし, 癌の発症や進行に関与するアンチセンス RNA の網羅的解析の報告はこれまでない. 我々の研究室では, 大腸癌における癌部特異的なアンチセンス RNA の発現パターンを確認し, さらに転移の有無により癌部のアンチセンス RNA の発現パターンが異なることを報告している (Kohno K, *Int J Oncol*, 2010). さらに, 肝細胞癌においても癌部特異的なアンチセンス RNA の発現パターンを確認し, その組織型毎での解析でも脱分化に伴う, アンチセンス RNA の発現変化があることを確認した (Nagai, *EASL*, 2011). このように, アンチセンス RNA の発現解析をセンス RNA の解析と並行して行うことで, センス RNA の解析だけでは認識されなかった発癌過程や癌の進行に伴う遺伝子発現変化の理解が進むと同時に, 新たなバイオマーカーの探索の一助となることが期待できる.

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの解析で明らかにな

った特定の複数のアンチセンス RNA の機能解析を行い, 癌診断および治療におけるアンチセンス RNA 解析の重要性を検討し, 大腸癌・膵癌・胆道癌患者の末梢血中の RNA を抽出して網羅的解析を行い, 最終的には早期発見が困難な消化器癌の層別化ならびにテーラーメード治療のマーカーとすることを目的とする.

3. 研究の方法

(1)大腸癌患者の血液中アンチセンス RNA の解析

本研究の同意を得た大腸癌患者から末梢血を採取する. 対照群として大腸癌患者と同年代の健常人からも同意を得た上で血液を採取する. 血液から RNA 抽出は, PAX gene blood RNA kit を使用して行う. RNA の質に関しては, Bioanalyzer を用い, RIN 値の高い検体を解析に使用する.

大腸癌の発生, 進展, 再発に関連するアンチセンス RNA を同定するためにカスタムマイクロアレイを用いた発現の網羅的解析を行う. 採取した RNA を Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent Technologies 社) を使用して Cy3 蛍光色素を標識した cDNA を合成する. マイクロアレイ解析は, 我々が設計した 22,000 対のセンス/アンチセンス RNA 検出プローブ (in situ hybridization と共通のプローブ領域を使用) を搭載したカスタムマイクロアレイを用い, センス/アンチセンス RNA の発現を網羅的に解析し, 大腸癌の発生, 進展に関連して特異的に発現が変化する血清エクソソーム中のセンス/アンチセンス RNA を同定する. (図 1)



(2)膵癌，大腸癌患者の血液中のエクソソーム内 miRNA の解析

近年エクソソーム由来分泌型 ncRNA はさまざまな癌のバイオマーカーとして注目を集めている．その中心は miRNA であるが大腸癌，膵癌においてはその詳細なメカニズムは未だ不明である．我々はこれまで培ってきた解析技術を用いて，血清エクソソーム中の miRNA の解析を行った．

本研究の同意を得た大腸癌，膵癌患者から末梢血を採取して血清を分離する．血清からのエクソソーム回収は超遠心法および ExoMir Plus Kit (Bioo Scientific 社)を使用して行う．対照群として癌患者と同年代の健常人からも同意を得た上で血清を採取する．血清中エクソソームから RNA 抽出は，BiooPure 試薬 (Bioo Scientific 社)および ISOGEN II (ニッポンジーン社)を使用して行う．エクソソーム RNA には small RNA が多いため，バイオアナライザ(Agilent Technologies社)により small RNA の存在を確認する．癌の発生，進展，再発に関連する血清中エクソソーム内の miRNA を同定するためにマイクロアレイを用いた発現の網羅的解析を行う．血清エクソソーム中の RNAは微量であるため，そのままではマイクロアレイ解析を行うことができない．そこで，Ovation Pico WTA System V2 (NuGEN 社)を使用して血清エクソソーム RNA を増幅する．増幅された RNA を Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent Technologies 社)を使用して Cy3 蛍光色素を標識した cDNAを合成する．miRNAの発現を網羅的に解析し，肝癌の発生，進展に関連して特異的に発現が変化する血清エクソソーム中のmiRNA を同定する．

4. 研究成果

(1)大腸癌患者の血液中アンチセンス RNA の解析

大腸癌患者28例と健常人6例を対象として，末梢血中のアンチセンス RNA の網羅的解析を行った．大腸癌患者の血液中で健常人と変化しているアンチセンス RNA を 20 種同定した．これらの RNA は大腸癌患者と健常人を明確に区別することが可能であった(図 2)．

さらに，大腸癌患者と健常人において最も，fold change の大きかったアンチセンス RNA(HDHD1)の変化を術後1週間，術後3ヶ月と解析したところ，術後の発現は健常人レベルまで発現が落ちていることがわかった(図 3,4)．

末梢血液中のアンチセンス RNA の測定が大腸癌の診断に有用である可能性が示唆された．(論文投稿準備中)

図 2

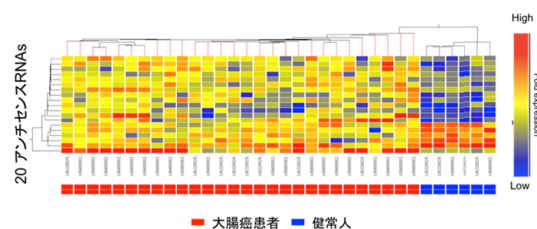


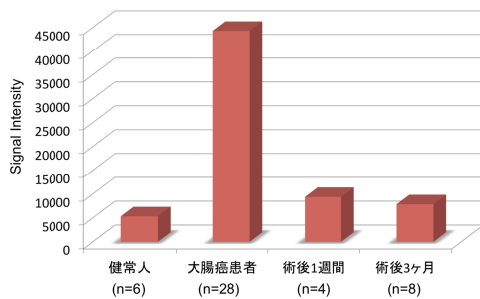
図 3

Top 10 アンチセンスRNAs 大腸癌患者 vs. 健常人

Accession Number	Gene Symbol	Gene Name	Fold change
NM012080	HDHD1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1	5.68
NM005824	LRRC17	Leucine rich repeat containing 17	4.38
NM016630	SPG21	Spastic paraplegia 21	2.71
NM175611	GRIK1	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1	2.54
NM003290	TPM4	Tropomyosin 4	2.40
NM006516	SLC2A1	Solute carrier family 2, member 1	2.39
NM015317	PUM2	Pumilio homolog 2	2.36
NM024494	WNT2B	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B	-2.35
NM025140	CCDC92	Coiled-coil domain containing 92	2.31
NM001037738	NPM1	Nucleophosmin 1	2.31

図 4

HDHD1アンチセンスRNAの術前後での発現変化



(2)膵癌，大腸癌患者の血液中のエクソソーム内 miRNA の解析

大腸癌患者 10 例と膵癌患者 10 例と健常人 4 例を対象として、エクソソーム内 miRNA の網羅的解析を行った。大腸癌患者，膵癌患者の血液中エクソソーム内で健常人と変化している RNA をそれぞれ 15 種，17 種同定した。これらのエクソソーム内 miRNA は大腸癌患者と健常人を明確に区別することが可能であった(図 5)。膵癌に関しては明確に区別することができなかった(図 6)。末梢血液中エクソソーム内 miRNA の測定が大腸癌の診断に有用である可能性が示唆された。

図 5

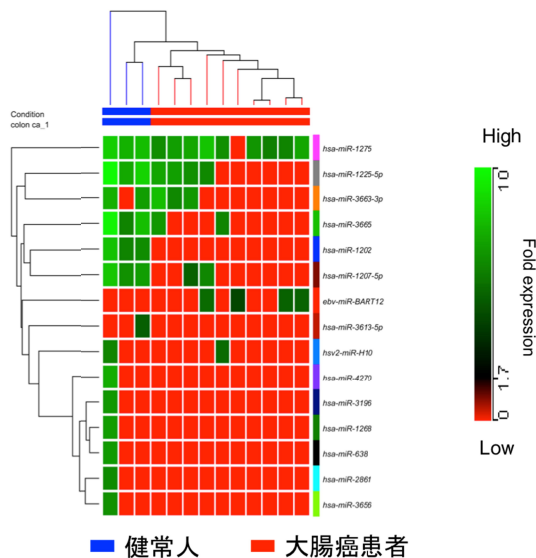
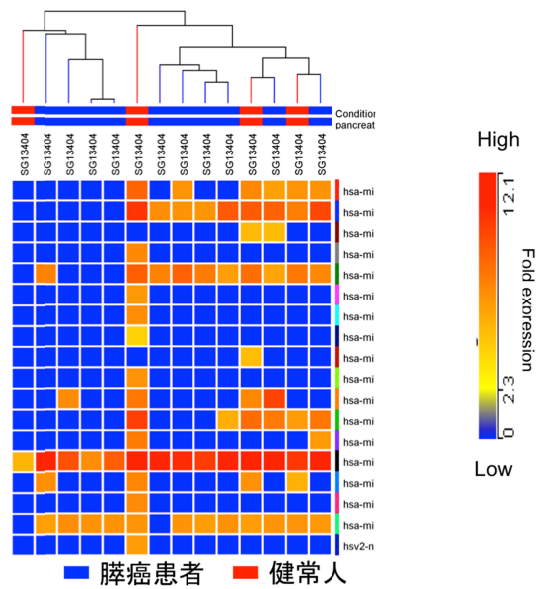


図 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nagai K, Kohno K, Chiba M, Pak S, Murata S, Fukunaga K, Kobayashi A, Yasue H, Ohkohchi N: Differential expression profiles of sense and antisense transcripts between HCV-associated hepatocellular carcinoma and corresponding non-cancerous liver tissue. *Int J Oncol* 40: 1813-1820, 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

高野恵輔, 朴秀吉, 永井健太郎, 千葉 満, 村田聡一郎, 久倉勝治, 稲川 智, 安江 博, 大河内信弘: 血液中センス/アンチセンス RNA を用いた大腸癌の新規診断法の開発. 第 112 回日本外科学会定期学術集会. 2012.4.12 千葉

〔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〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

高野 恵輔 (KOHNO, Keisuke)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70615038