

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25250019

研究課題名(和文) がんのゲノム・エピゲノム情報の包括的理解に基づく個性診断法の開発

研究課題名(英文) Comprehensive understanding of molecular carcinogenesis through omics analysis and development of molecular diagnostics for personalized medicine

研究代表者

稲澤 譲治 (Johji, Inazawa)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30193551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究は、統合的ゲノム・エピゲノム解析に基づくがん分子病態の包括的理解により、画期的ながん分子診断法の開発ならびに治療標的分子の同定を目的とした。成果は以下である。(1) タンパク質翻訳に関与するハイプシン経路ががん転移性に関与することを同定した。(2) 胃癌細胞株を用いた機能的スクリーニング法によりEMT誘導性microRNAのmiR-544aを同定した。(3) アダプター分子p62が子宮体がん予後不良因子のバイオマーカー候補であることを明らかにした。(4) 酸化ストレス応答転写因子NRF2活性化がんにおいてmiR-634が強い細胞増殖抑制、細胞死誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The principle aim of this research project is to understand the molecular mechanism underlying intractable cancer and to contribute to the development of molecular target-therapy and diagnosis for the personalized cancer medicine. Our achievements of the project as follows; (1) The hypusine cascade involved in protein synthesis was identified as a novel cancer therapeutic target. (2) Using function-based screening we identified a novel EMT-inducing microRNA, miR-544a in gastric cancer cell line. (3) We found that high expression of p62 is associated with poor prognosis in endometrial cancers. (4) Overexpression of miR-634 activates the mitochondrial apoptotic pathway, indicating the utility of miR-634 therapy against NRF2-activated tumors.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん個別化医療 オミクス解析 上皮間葉転換 p62 マイクロRNA バイオマーカー 治療標的 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

次世代型高速シーケンサーの開発ならびに大量ヒトゲノム情報を利用可能とするインフラが整備された。これにより機能性 RNA を含む種々の網羅的分子情報の収集と多次元的解析が加速化されており、大量オミックス情報を基盤としたがん個別化医療の実現に大きな期待が寄せられている。

2. 研究の目的

今回の研究は、我々が 10 余年をかけて構築したがんのゲノム・エピゲノムハイスループット解析システムとその解析情報を基軸に、遺伝子発現解析、エピジェネティック発現調節異常の同定、蛋白発現・機能変化、さらにはがん特異的クロマチン構造異常やマイクロ RNA 機能異常の探索などを合わせ「がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析とその成果」に基づきがん病態を包括的に理解することで、各種がんの主要シグナル伝達経路や細胞文脈とその変調を明らかにし、がん個別化治療や予防法確立の分子基盤を構築する。以上の成果に基づき、画期的ながん分子診断法の開発ならびに治療標的分子を同定する。

3. 研究の方法

申請者らが得意とするゲノム・エピゲノム解析システムとこれまでに蓄積した各種がんのオミックス解析データに基づき、各種がんゲノム・エピゲノム異常を探索してがん特異的異常を同定し、これをランダムマークに治療標的となる関連遺伝子候補を同定する。がん特異的ゲノム・エピゲノム異常スクリーニングには、既存法に加え新型次世代型シーケンサーとその応用技術 (ChIP シーケンス他)、MeDI P 法などメチル化 DNA ハイスループット解析技術等を利用する。また、約 500 種類のオミックスデータ付随がん細胞株パネル、腫瘍バイオリソース、組織アレイ、in vitro、in vivo イメージング法、siRNA による遺伝子機能ノックダウン、免疫不全マウスおよび遺伝子改変マウス等を用いて、候補がん関連遺伝子のがん病態形成機構への関与を詳細に調べ、診断バイオマーカーや治療標的分子としての意義を検証する。さらに、合成二本鎖 RNA ライブラリーの機能的スクリーニングによる新規がん抑制遺伝子型 miRNA の網羅的探索システムにより、がん関連マイクロ RNA を同定、RNA 創薬の可能性を追究する。

4. 研究成果

(1)がん抑制遺伝子型マイクロ RNA の同定:
腫瘍特異的な DNA 過剰メチル化により遺伝子サイレンシングを受ける複数の新規がん抑制遺伝子型マイクロ RNA (TS-miR) を同定した。口腔扁平上皮がん (OSCC) の TS-miR として *miR-596* とその標的分子 *LGALS3BP* を同

定した (Endo H. et al., *Carcinogenesis* 2013)。OSCC において *miR-596* が *LGALS3BP* の発現・翻訳阻害を介して ERK1/2 のリン酸化を抑制し、細胞増殖を負に制御することを明らかにした。また、miR ライブラリーの機能的スクリーニングと miR 発現アレイを用いた網羅的発現解析により、肝細胞がん (HCC) の TS-miR の *miR-195*, *miR-497* を同定し、*miR-195* の新規標的遺伝子として *BTRC*, *CDC25A*, *CDK4*, *Cyclin D3*, *Cyclin E1* を同定した (Furuta M. et al., *PLoS One* 2013)。

がんの浸潤転移の悪性特性には上皮-間葉転換 (EMT) が深く関与する。miR 機能的スクリーニング法を用いて EMT 抑制性 miR を探索することで、新規 EMT 抑制性 *miR-655* を (Harazono Y. et al., *PLoS One* 2013) さらには EMT 誘導性 miR として *miR-544a* を同定した (Yanaka Y. et al., *Carcinogenesis* 2015)。

さらに、ストレス応答転写因子 NRF2 の転写活性を指標とするレポーターシステムを構築し、これを用いた miR ライブラリースクリーニング法により、NRF2 転写活性を直接的に負に制御する 4 種の miRNA (*miR-507*, *-634*, *-450a*, *-129-5p*) を同定した (Yamamoto S. et al., *Molec Cancer Res.* 2014)。中でも *miR-634* はミトコンドリアを介した細胞死経路に関与する複数の遺伝子群を直接標的とすることで抗がん核酸薬として有望な候補となることを明らかにした (Fujiwara N. et al., *Can Res.* 2015)。また、共同研究により、網羅的遺伝子発現データベース情報を用いた in silico miR 解析から疾患関連 miRNA を抽出するアルゴリズムを開発して有用性を実証した (Okada Y. et al., *Sci Rep.* 2016)。

(2)オートファジー活性を指標としたがん個別化医療の確立:

分子標的治療薬開発が比較的遅れている卵巣がんや子宮体がんを対象にオートファジータンパク質分解の基質 p62/SQSTM1 の発現解析を行った。その結果、卵巣がん (Iwade R et al. *Acta Histochem. Cytochem.* 2014)、子宮体がん (Iwade R et al., *Am J Pathol* 2015) において p62 タンパク高発現の症例が予後不良であることを明らかにした。また、細胞内小胞の膜に発現する *LAPTM5* が各種がん、がん抑制遺伝子として機能することを明らかにした (Nuylan M et al., *Oncotarget* 2016)。

(3) その他の成果

がん浸潤・転移の理解は難治がん克服において重要な課題である。高転移性 OSCC 細胞株を樹立し、親株との比較 Omics 解析から

蛋白翻訳因子 eIF5A のハイプシン化修飾を律速する酵素である *DHPS* 遺伝子の増幅と機能亢進を明らかにした (Muramatsu T., *Oncogene* 2016)。

また、陽子線マイクロ照射によって惹起される細胞核 DNA 二重鎖切断・修復後の細胞株ゲノムシーケンス解析結果に基づく網羅的ゲノム DNA 再構成情報に基づき Chromothripsis (染色体粉砕) の生成メカニズムの可能性を提唱した (Morishita et al., *Oncotarget* 2016)。

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) 査読有

1. Nuylan M, Kawano T, Inazawa J, Inoue J: Down-regulation of LAPTM5 in human cancer cells. *Oncotarget* 2016 Apr 6. doi: 10.18632/oncotarget.8614.
2. Muramatsu T, Kozaki K-I, Imoto S, Ymaguchi R, Tsuda T, Kawano T, Fujiwara N, Morishita M, Miyano S, Inazawa J: The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2016 Apr 4. doi: 10.1038/onc.2016.71.
3. Okada Y, Muramatsu T, Suita N, Kanai M, Kawakami E, Iotchkova V, Soranzo N, Inazawa J, Tanaka T: Significant impact of miRNA-target gene networks on genetics of human complex traits. *Sci Rep.* 6:22223. 2016 Mar 1;6:22223. doi: 10.1038/srep22223.
4. Morishita M, Muramatsu T, Suto Y, Hirai M, Konishi T, Hayashi S, Shigemizu D, Tsunoda T, Moriyama K, Inazawa J: Chromothripsis-like chromosomal rearrangements induced by ionizing radiation using proton micro-beam irradiation system. *Oncotarget* 7: 10182- 92. 2016 doi: 10.18632/oncotarget.7186.
5. Yanaka Y, Muramatsu T, Uetake H, Kozaki K, Inazawa J: miR-544a induces epithelial-mesenchymal transition through the activation of WNT signaling pathway in gastric cancer. *Carcinogenesis*. 36:1363-71. 2015 doi: 10.1093/carcin/bgv106.
6. Fujiwara N, Inoue J, Kawano T, Tanimoto K, Kozaki K, Inazawa J: miR-634 activates the mitochondrial apoptosis pathway and enhances chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res.* 75:3890-901. 2015 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0257.
7. Iwadata R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J: High expression of p62 protein is associated with poor prognosis and aggressive phenotypes in endometrial cancer. *Am J Pathol.* 185:2523-33. 2015 doi: 10.1016/j.ajpath.2015.05.008.
8. Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, Nagata H, Nishimura Y, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E: Overexpression of SMYD2 contributes to malignant outcome in gastric cancer. *Br J Cancer.* 112:357-64. 2015 doi: 10.1038/bjc.2014.543.
9. Hosoda F, Arai Y, Okada N, Shimizu H, Miyamoto M, Kitagawa N, Katai H, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Ohki M, Shibata T: Integrated genomic and functional analyses reveal glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer. *Oncogene.* 34:1196-206. 2015 doi: 10.1038/onc.2014.57.
10. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, Noji H, Kitamura K, Eto T, Takahashi T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama H, Hase M, Li L, Johnson K,

- Lazarowski A, Tamburini P, [Inazawa J](#), Kinoshita T, Kanakura Y: Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med*. 370:632-9. 2014 doi: [10.1056/NEJMoa1311084](#).
11. Iwadate R, [Inoue J](#), Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, [Inazawa J](#). High expression of SQSTM1/p62 protein is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 47:295-301. 2014 doi: [10.1267/ahc.14048](#).
 12. Yamamoto S, [Inoue J](#), Kawano T, [Kozaki K](#), Omura K, [Inazawa J](#): The impact of miRNA-based molecular diagnostics and treatment of NRF2-stabilized tumors. *Mol Cancer Res*. 12:58-68. 2014 doi: [10.1158/1541-7786.MCR-13-0246-T](#).
 13. Harazono Y, [Muramatsu T](#), Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, [Inazawa J](#), [Kozaki K](#): miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLoS One*. 8:e62757. 2013 doi: [10.1371/journal.pone.0062757](#).
 14. Furuta M, [Kozaki K](#), Tanimoto K, Tanaka S, Arai S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, [Inazawa J](#): The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 8:e60155. 2013 doi: [10.1371/journal.pone.0060155](#).
 15. Endo H, [Muramatsu T](#), Furuta M, Uzawa N, Pimkhaokham A, Amagasa T, [Inazawa J](#), [Kozaki K](#): Potential of tumor-suppressive miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer. *Carcinogenesis*. 34:560-9. 2013 doi: [10.1093/carcin/bgs376](#).
1. [Inoue J](#), Fujiwara N, Yamamoto S, Kawano T, [Inazawa J](#): MicroRNA-based diagnosis and therapy in NRF2-stabilized tumor. AACR New Orleans, USA. 18/April/2016
 2. [Muramatsu T](#), [Tanimoto K](#), [Inazawa J](#): Exploring target genes of eukaryotic initiation factor 5A in cancer using RNA sequence analysis. AACR2016 Annual Meeting New Orleans, USA. 18/April/2016
 3. [Inoue J](#), [Inazawa J](#): Screening of autophagy modulators for cancer therapy using high-content imaging system. The 34th Sapporo International Cancer Symposium . Sapporo, Japan. 26/June/2015
 4. Sujata S, [Muramatsu T](#), [Inazawa J](#): Highly metastatic cancer cell exosomes contribute to cancer cell growth and metastatic traits .The 34th Sapporo International Cancer Symposium. Sapporo, Japan. 26/June/2015
 5. Sato T, [Muramatsu T](#), Tanabe M, [Inazawa J](#): Characterization of circulating tumor cell phenotype in pancreatic cancer. The 34th Sapporo International Cancer Symposium. Sapporo, Japan. 26/June/2015
 6. Hiramoto H, [Muramatsu T](#), Ichikawa D, Othuji E, [Inazawa J](#): Exploring EMT-related miRNAs using cell-based reporter system in pancreatic cancer. The 34th Sapporo International Cancer Symposium. Sapporo, Japan. 26/June/2015
 7. Michelle N, [Inoue J](#), Kawano T, [Inazawa J](#): Inactivation of LAPTM5 gene in human cancer. The 34th Sapporo International Cancer Symposium. Sapporo, Japan. 26/June/2015
 8. Morishita M, [Muramatsu T](#), Hayashi S, Hirai M, Suto Y, Konishi T, Moriyama K, [Inazawa J](#): Exploration of mechanisms for chromothripsis by irradiation. 106th Annual

- Meeting of the American Association for Cancer Research 2015. Philadelphia, USA. 18-22/April/2015
9. Muramatsu T, Kozaki K, Imoto S, Yamaguchi R, Tsuda H, Kawano T, Morishita M, Miyano S, Inazawa J: The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma. 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2015. Philadelphia, USA. 18-22/April/2015
 10. Inazawa J: Exploring cancer-related miRNAs by function-based screening.international conference on the 19th Annual Meeting of Korean Society of cancer Prevention. Seoul, Korea. 12/December/2014
 11. 稲澤譲治: がんの特性を制御するマイクロ RNA の探索と核酸抗がん薬への応用. ゲノム・エピゲノム標的分子療法の最前線. シンポジウム. 第20回日本がん分子標的治療学会学術集会. 別府国際コンベンションセンター B-CON PLAZA. 大分. 2016年6月1日
 12. 稲澤譲治: 乳がんにおけるゲノム・エピゲノム標的分子療法の最前線. 東山乳癌会議 2016. ホテルグランヴィア京都. 京都. 2016年5月14日
 13. 稲澤譲治: がん細胞におけるアミノ酸欠乏時細胞文脈応答とオートファジー機能. 千里ライフサイエンス新適塾・「難病への挑戦」第26回会合. 千里ライフサイエンスセンタービル. 大阪. 2016年5月9日
 14. 稲澤譲治: がん細胞におけるアミノ酸欠乏時細胞文脈応答とオートファジー機能. がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動. 公開シンポジウム. 一橋講堂. 東京. 2016年2月9日
 15. 井上純, 稲澤譲治: ハイコンテンツイメージングによるオートファジー制御因子のスクリーニング. 第74回日本癌学会学術総会. 愛知. 2015年10月9日
 16. 村松智輝, 谷中淑光, 原園陽介, 小崎健二, 稲澤譲治: miR-655 と miR-544a は EMT レポーターシステムにより同定された EMT 制御 miRNA である. 第74回日本癌学会学術総会. 愛知. 2015年10月10日
 17. 稲澤譲治: がんの増殖を抑える小さな分子、マイクロ RNA. 第25回日本癌学会市民公開講座. アクロス福岡国際会議場. 福岡. 2015年6月20日
 18. 稲澤譲治: 機能的スクリーニングによるがん関連マイクロ RNA の探索. 日本がん分子標的治療学会第19回学術集会. 松山全日空ホテル. 愛媛. 2015年6月11日
 19. 稲澤譲治: ゲノム情報を利用したがん医療の実現化のための取り組み. 文部科学省科学技術試験研究委託事業 オーダーメイド医療の実現プログラム ゲノム医療の実現に向けて. シンポジウム. 一橋講堂. 東京. 2015年3月23日
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 2 件)
1. 名称: マイクロ RNA の測定方法、並びに、がん治療剤及びこれを含有するがん治療のための医薬組成物. 発明者: 稲澤 譲治・井上 純・山本 信祐・河野 辰幸・小崎 健一
権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学、PCT/JP2014/053594、出願年月日: 2014年2月17日、国内
 2. 名称: がんに対する L-アスパラギナーゼ剤とオートファジー阻害剤の併用療法の効果の予測方法、及び、がん治療剤、発明者: 稲澤 譲治・井上 純・高橋寛吉、権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル、出願年月日: 2015年12月22日、国内
- 取得状況 (計 14 件)
1. 名称: 核酸マイクロアレイの品質検査方

法、発明者：氏原大・稲澤讓治・井本逸勢、
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特許第 5765841 号、取得年月日：2015 年 6 月 26 日、国内。

2. 名称：甲状腺癌の検出方法、発明者：稲澤讓治・井本逸勢・石原孝也・津田均、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特許第 5704545 号、取得年月日：2015 年 3 月 6 日、国内。

3. 名称：卵巣癌の検出方法、発明者：稲澤讓治・井本逸勢・菊池良子、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特許第 5645089 号、取得年月日：2014 年 11 月 4 日、国内。

4. 名称：食道癌の検出又は予後の予測のための方法及び食道癌抑制剤、発明者：稲澤讓治・井本逸勢・春木茂男、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特許第 5557139 号、取得年月日：2014 年 6 月 13 日、国内。

5. 名称：食道癌の検出方法及び抑制剤、発明者：稲澤讓治・小松周平・井本逸勢・小崎健一・津田均、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特許第 5429735 号、取得年月日：2013 年 12 月 13 日、国内。

6. 名称：先天性異常症の染色体欠失の検出方法、発明者：稲澤讓治・林深・井本逸勢、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特許第 5331404 号、取得年月日：2013 年 8 月 2 日、国内。

7. 名称：口腔扁平上皮癌の検出方法、発明者：稲澤讓治・井本逸勢・中村恵理奈・津田均、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特許第 5288456 号、取得年月日：2013 年 6 月 14 日、国内。

8. 名称：食道癌の検出方法及び抑制剤、発明者：稲澤讓治・小松周平・井本逸勢・小崎健一・津田均、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、番号：特許第 9090942 号、取得年月日：2015 年 7 月 28 日、国外 (US)

9. 名称：核酸マイクロアレイのデータ補正方法、発明者：稲澤讓治・井本逸勢、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、番号：特許第 9034796 号、取得年月日：2015 年 5 月 19 日、国外 (US)

10. 名称：卵巣癌の検出方法、及び抑制方法、発明者：稲澤讓治・井本逸勢・菊池良子、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、番号：特許第 8741641 号

取得年月日：2014 年 6 月 3 日、国内外の別：国外 (US)

11. 名称：核酸マイクロアレイのデータ補正方法、発明者：稲澤讓治・井本逸勢、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、番号：特許第 2297337 号、取得年月日：2015 年 12 月 25 日、国外 (EP)

12. 名称：食道癌の検出方法及び抑制剤、発明者：稲澤讓治・小松周平・井本逸勢・小崎健一・津田均、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、番号：特許第 2253720 号、取得年月日：2013 年 11 月 27 日、国外 (EP)

13. 名称：核酸マイクロアレイのデータ補正方法、発明者：稲澤讓治・井本逸勢、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、番号：200980128809X、取得年月日：2014 年 7 月 2 日、国外 (CN)

14. 名称：先天性異常症の染色体欠失の検出方法、発明者：稲澤讓治・林深・井本逸勢、権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、番号：200980130226.0、取得年月日：2013 年 7 月 17 日、国外 (CN)

〔その他〕

ホームページ等

(1) <http://www.tmd.ac.jp/mri/cgen/framepage.htm>

(2) http://www.cghtmd.jp/CGHDatabase/index_j.jsp

(3) <http://www.cghtmd.jp/CNVDatabase/top.action>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲澤 讓治 (Inazawa, Johji)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：30193551

(2) 研究分担者

小崎 健一 (Kozaki, Ken-ichi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50270715

井上 純 (Inoue, Jun)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師
研究者番号：50568326

谷本 幸介 (Tanimoto, Kosuke)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：60611613

村松 智輝 (Muramatsu, Tomoki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：90732553