

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 26 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461984

研究課題名(和文) 消化器癌における lincRNA の網羅的発現解析ならびに機能解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of expression and function of lincRNA in gastroenterological cancer

研究代表者

日吉 幸晴 (Hiyoshi, Yukiharu)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・その他

研究者番号：30573612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：消化器癌切除検体を用いて、正常組織、癌組織中のlincRNA (HOTAIR、Malat1、MEG3、GAS5) の発現をreal-time PCRで解析した。HOTAIRは食道癌、胃癌、大腸癌で正常粘膜よりも癌組織で発現が上昇していたが、Malat1、MEG3、GAS5は正常粘膜、癌組織で一定の発現変化はみられず、臨床病理学的因子、予後との相関もみられなかった。次に、血清中のlincRNAを解析するため、大腸癌患者血清を用いたが、発現量が極めて少なく、定量解析は不可能であった。本解析では、消化器癌におけるlincRNAを解析したが、新たなバイオマーカーを見つけることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：The expression levels of lincRNA (HOTAIR, Malat1, MEG3 and GAS5) were analyzed in cancer tissue and adjacent normal epithelium of patients with gastrointestinal cancer by real-time PCR. HOTAIR was up-regulated in cancer tissue compared with adjacent normal epithelium in patient with esophageal cancer, gastric cancer and colorectal cancer. However, the expression levels of Malat1, MEG3, GAS5 were not significantly changed between cancer tissue and normal epithelium. There was no significant correlation between the expression of these lincRNAs and patient survival. Then, we tried to analyze the expression of lincRNA in serum of patient with colorectal cancer. However, we could not quantify the expression because the expression levels was too low. In summary, we could not identify specific lincRNAs as hopeful biomarker or therapeutic target in gastrointestinal cancer.

研究分野：消化器癌の外科治療

キーワード：消化器癌 non-coding RNA real-time PCR 組織 血清

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)は 20 数塩基の短い RNA で、遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合して転写、翻訳抑制に関与しており、癌を含む多くの疾患との関連が知られている。一方、複数の exon を含み、既知の蛋白コード遺伝子とは重なり合わずに遺伝子間領域に存在する比較的高分子の、Large intergenic non-coding RNA (lincRNA)が新たな癌のバイオマーカーとして注目されている。ヒトゲノムからは 5000 以上の lincRNA が転写されていることが示唆されているが、疾患との関係はほとんど明らかになっていない。lincRNA の発現異常は、癌を含めたさまざまな疾患の発症や進展に関与している可能性が高く、lincRNA が新たな癌のバイオマーカーあるいは治療標的になり得ると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、消化器癌における large intergenic non-coding RNA (lincRNA)の網羅的発現解析ならびに機能解析を行い、新たなバイオマーカー、治療標的としての lincRNA の有用性を検討することが目的である。

3. 研究の方法

- A) 消化器癌切除検体からの total RNA 抽出
- B) 消化器癌における lincRNA 発現の網羅的解析 (microarray 解析, 定量的 RT-PCR 法)
- C) 抽出されてきた標的 lincRNA の発現と臨床病理学的因子、予後、治療効果との関連の検
- D) 討標的 lincRNA の細胞生物学的機能解析 (細胞増殖、アポトーシス、浸潤能、遊走能、薬剤感受性)
- E) lincRNA の発現制御機構の解明、標的遺伝子の同定

4. 研究成果

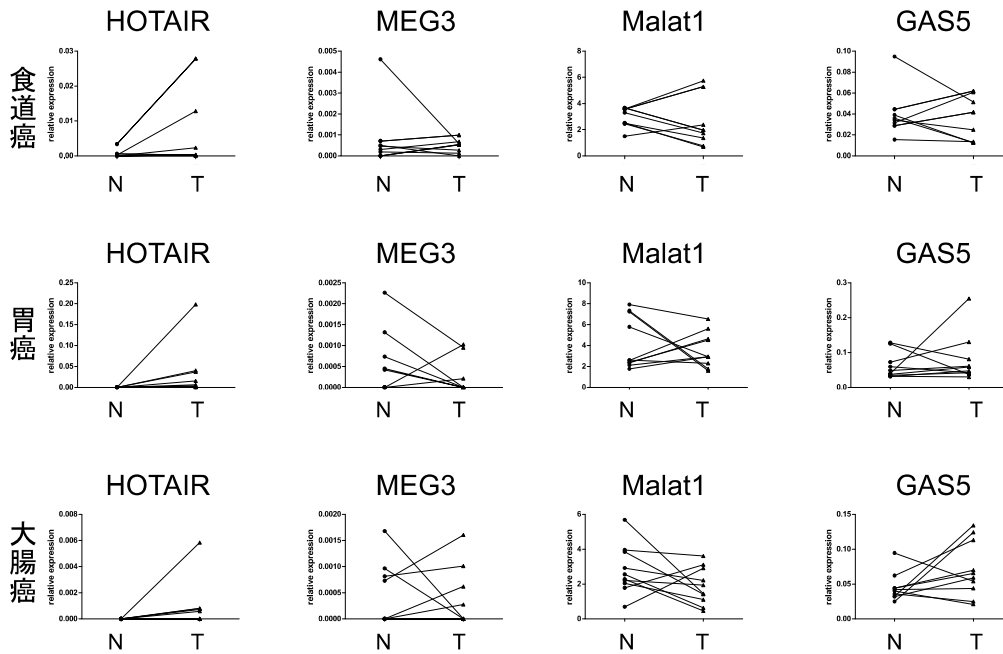
平成 25 年度から 26 年度は、九州大学第二外科、熊本大学消化器外科の消化器癌(食道癌、胃癌、大腸癌)切除検体(凍結標本)を用いて、正常組織、癌組織中の lincRNA 測定を行った。食道癌、胃癌、大腸癌それぞれ 10 症例の癌組織、正常粘膜から Trizol を用いて total RNA を抽出し、逆転写反応を行い cDNA を作成した。過去に癌との関連が報告されている lincRNA の中から、oncogenic なものとして HOTAIR、Malat1 を、tumor suppressor として MEG3、GAS5 の発現を real time PCR で解析した。GAPDH をコントロールとし、解析は Ct 法で行った。HOTAIR は食道癌、胃癌、大腸癌で正常粘膜よりも癌組織で発現が上昇していた。これは過去の様々な報告と一致する結果である。Matat1、MEG3、GAS5 は

正常粘膜、癌組織で一定の発現変化はみられなかった(図 1)。

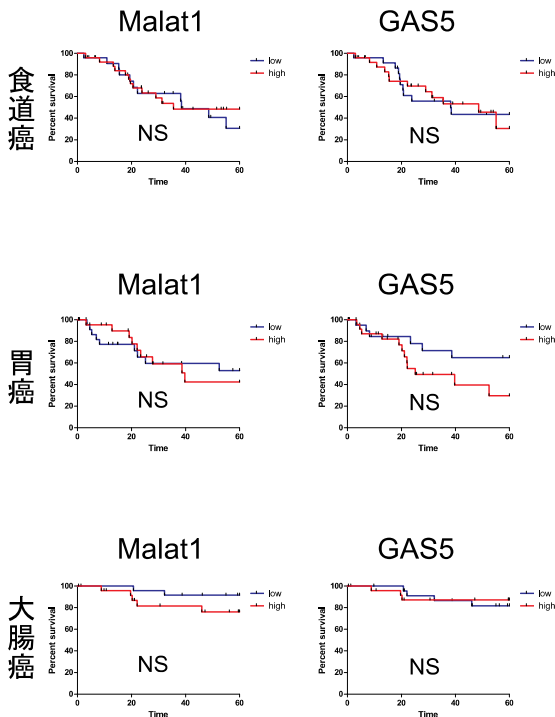
HOTAIR はすでに食道癌、胃癌、大腸癌で予後との相関が報告されている。また、今回の解析で MEG3 は、発現量が非常に少なく、real time PCR での正確な解析は困難と考えられた。そこで次に、癌における Malat1、GAS5 の発現と、予後との相関を検討した。食道癌、胃癌、大腸癌それぞれ 40 症例の癌組織から RNA を追加で抽出し、total 50 例で Malat1、GAS5 を同様に解析し、発現量を中央値で分けて、高発現群、低発現群とした。2 群間で無再発生存、全生存を Kaplan-Meier 法を用いて比較した。結果は、胃癌の GAS5 高発現例ならびに、大腸癌の Malat1 高発現例で全生存が不良の傾向があったが、いずれの癌種でも Malat1、GAS5 の発現と予後との有意な相関はみられなかった(図 2)。その他、これらの lincRNA の発現と、臨床病理学的因子との相関も比較したが、有意な相関はみられなかった。

平成 27 年度はがん研有明病院で、直腸癌術前化学放射線療法感受性予測マーカーとしての血清中 lincRNA の有用性について検討した。術前化学放射線療法前に採取した血清サンプルから RNA を抽出し、まず、大腸癌患者血清に存在するとされる HOTAIR を real-time PCR で解析しようとした。しかし、発現量が極めて少なく、定量解析は不可能であった。

まとめると、平成 25 年度から 27 年度にわたって、消化器癌患者の組織中、血清中に存在する lincRNA を解析し、新たなバイオマーカーや治療感受性予測マーカー、治療標的となりうるかどうかを検討してきた。しかしながら、解析した lincRNA のなかでは有望な結果を導き出すことができなかった。



(図1)食道癌、胃癌、大腸癌における lincRNA の発現異常



(図2) lincRNA と予後

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4件)

Hiyoshi Y, Schetter AJ, Okayama H, Inamura K, Anami K, Nguyen GH, Horikawa I, Hawkes JE, Bowman ED, Leung SY, Harris CC. Increased microRNA-34b and -34c predominantly expressed in stromal tissues is associated with poor prognosis in human colon cancer. PLoS One 2015; 10: e0124899.

Hiyoshi Y, Yoshida N, Watanabe M, Kurashige J, Baba Y, Sakamoto Y, Baba H. The presence of serum p53 antibody predicts the pathological tumor response to neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, cisplatin and fluorouracil (DCF) in esophageal squamous cell carcinoma. World J Surg 2016 in press.

Hiyoshi Y, Yoshida N, Watanabe M, Kurashige J, Karashima R, Iwagami S, Baba Y, Baba H. Late recurrence after radical resection of esophageal cancer. World J Surg 2016; 40: 913-920.

Hiyoshi Y, Morita M, Kawano H, Otsu H, Ando K, Ito S, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Saeki H, Oki E, Ikeda T, Baba H, Maehara Y. Clinical significance of surgical resection for the recurrence of esophageal cancer after radical esophagectomy. Ann

〔学会発表〕(計1件)

日吉幸晴、Schetter AJ、馬場祥史、吉田直矢、Harris CC、馬場秀夫、「大腸癌における miR-34 family 発現解析」第25回日本消化器癌発生学会総会 2014年11月13日～11月14日、ホテル日航福岡

〔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

日吉 幸晴 (HIYOSHI, Yukiharu)
がん研有明病院 消化器外科
研究者番号：30573612

(2) 研究分担者

渡邊 雅之 (WATANABE, Masayuki)
がん研有明病院 消化器外科
研究者番号：80254639

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()