

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670371

研究課題名(和文)消化管間質腫瘍の悪性度を規定する長鎖non-coding RNAの探索

研究課題名(英文)Analysis of long non-coding RNAs that predict biological malignancy in GIST

研究代表者

篠村 恭久(Shinomura, Yasuhisa)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90162619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ノンコーディングRNAのうち、microRNA以外の長鎖ncRNAの機能はほとんど不明であったが、近年その機能のひとつとして、クロマチン修飾酵素複合体と相互作用することで標的遺伝子発現をエピジェネティックに制御する機能が提唱された。今回の検討で我々はmicroRNA-196aと長鎖non-coding RNA(ncRNA)であるHOTAIRの過剰発現がGISTの悪性度と強く相関することを明らかにした。細胞株を用いた詳細な検討の結果、これらの過剰発現にはヒストン修飾が関与すること、そしてHOTAIRの阻害がGIST細胞の浸潤能を抑制することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Large intergenic noncoding RNAs (lincRNA) have been less studied than miRNAs in cancer, although both offer considerable theranostic potential. In this study, we identified frequent upregulation of miR-196a and lincRNA HOTAIR in high-risk gastrointestinal stromal tumors (GIST). miR-196a genes are located within the HOX gene clusters and microarray expression analysis revealed that the HOXC and HOTAIR gene were also coordinately upregulated in GISTs which overexpress miR-196a. In like manner, overexpression of HOTAIR was also strongly associated with high-risk grade and metastasis among GIST specimens. RNA interference-mediated knockdown of HOTAIR altered the expression of reported HOTAIR target genes and suppressed GIST cell invasiveness. These findings reveal concurrent overexpression of HOX genes with noncoding RNAs in human cancer in this setting, revealing miR-196a and HOTAIR as potentially useful biomarkers and therapeutic targets in malignant GISTs.

研究分野：消化器腫瘍

キーワード：GIST ゲノム HOTAIR non-coding RNA

### 1. 研究開始当初の背景

近年、non-coding RNA (ncRNA) の発現異常は様々な消化器癌で報告され、消化器癌においても診断や治療のバイオマーカーになる可能性が示唆されている。消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) 治療の第一選択は原則として外科手術である。腫瘍径 5 cm 以上の GIST は特に転移のリスクが高いため外科的切除が推奨されるが、2~5 cm の GIST を全て切除すべきかどうかは未だ議論のあるところである。GIST の悪性度や予後を規定する遺伝子は不明であり、リスク予測に有用な分子マーカーの発見が待ち望まれている。近年我々は、GIST におけるエピジェネティクス異常の解析から、ゲノムワイドな DNA 低メチル化が悪性度と強く関連することを見いだした (Clin Cancer Res, 2010)。さらに microRNA-196a の過剰発現が GIST の悪性度と強く関連することを明らかにした。細胞株を用いた詳細な検討の結果、その過剰発現にはヒストン修飾が関与することがわかった (Cancer Res, 2012)。これらの知見は、エピゲノム異常および ncRNA が GIST の性質を規定する上で重要な役割を担っていることを示唆している。しかし GIST における ncRNA の役割については多くがいまだ不明であり、microRNA に関する研究報告は散見されるが、長鎖 ncRNA についての報告はほとんどない。本研究では GIST の悪性度を規定する長鎖 ncRNA の異常を同定し、診療へ応用しうる知見を得ることを目的とする。GIST において高発現している長鎖 ncRNA、特に悪性度に直結する ncRNA は、臨床診断マーカーや病型分類のマーカーとして即時応用可能である。また、ncRNA は siRNA によるノックダウンが容易であり、新たな治療標的候補となりうる。さらに本研究の成果を足掛かりに、分子細胞生物学的な手法により、長鎖 ncRNA の機能そのものに関する画期的な知見を得ることも期待

される。

### 2. 研究の目的

消化管間質腫瘍 (GIST) の悪性度を規定する遺伝子異常については不明な点が多い。近年長鎖 non-coding RNA (ncRNA) の細胞・生命活動における重要性が次々と明らかになっているが、悪性腫瘍におけるその病的意義に関しては一部の例を除きほとんど分かっていない。よってそのような長鎖 ncRNA の異常とそれを一義的な原因とする GIST サブタイプを同定することができれば、1) それを確認するための実験手技自体は簡便であるので、臨床診断マーカーや病型分類のマーカーとして即時応用可能である。2) 長鎖 ncRNA は RNA 干渉の技術を用いて発現の抑制が可能で、新しい siRNA 創薬の標的候補となりうる。相補的な塩基配列を利用できるので、蛋白質を標的とする場合に比較し、薬剤のデザインが容易となる。3) 本研究の成果を足掛かりに、分子細胞生物学的な手法により、長鎖 ncRNA の機能そのものに関する画期的な知見を得ることも期待される。

### 3. 研究の方法

内視鏡的あるいは外科手術で切除された GIST 検体を用いた ChIP-seq 法および RNA-seq 法を確立し、安定したワークフローの構築を目指す。次に低リスク群 GIST および高リスク群 GIST の臨床検体を用いて、ゲノムワイドなヒストン修飾および RNA 発現を解析し、その分布様式を網羅的に検討することで、GIST において発現している長鎖 ncRNA を同定する。臨床病理像と併せて検討し、悪性度に応じて発現変動の見られる長鎖 ncRNA を同定する。さらに GIST においてそれら ncRNA にジェネティック、エピジェネティックな異常が認められないか、多数の臨床検体を用いて検証する。

#### 4. 研究成果

今回の検討で我々は microRNA-196a と長鎖 non-coding RNA (ncRNA) である HOTAIR の過剰発現が GIST の悪性度と強く相関することを明らかにした。細胞株を用いた詳細な検討の結果、これらの過剰発現にはヒストン修飾が関与すること、そして HOTAIR の阻害が GIST 細胞の浸潤能を抑制することがわかった (投稿中)。これらの知見は、エピゲノム異常および ncRNA が GIST の性質を規定する上で重要な役割を担っていることを示唆している。ncRNA のうち、microRNA 以外の長鎖 ncRNA の機能はほとんど不明であったが、近年その機能のひとつとして、クロマチン修飾酵素複合体と相互作用することで標的遺伝子発現をエピジェネティックに制御する機能が提唱されている。長鎖 ncRNA である HOTAIR は二つのヒストン修飾酵素と同時に相互作用し、クロマチン調節因子のいわば足場的な役割を持つとされる。ごく近年では、HOTAIR の過剰発現が乳癌・大腸癌など様々な悪性腫瘍の独立した予後不良因子であることが明らかにされはじめ、ncRNA が悪性腫瘍において重要な役割を担っている可能性が急速にクローズアップされていることから今回の GIST 症例を対象にした検討で HOTAIR がその悪性度と強く相関することを同定できたことは大変興味深い。

上記のように長鎖 ncRNA が遺伝子発現調節において転写因子と同程度かそれ以上に重要な役割を担っていると仮定すると、それらの量的な異常 (増幅や欠失、DNA メチル化による抑制など) や、質的な異常 (突然変異や染色体転座による融合遺伝子など) が増殖、浸潤、転移に関与している可能性が十分に考えられる。すなわち、これまで KIT や PDGFRA 変異のみでは説明しきれなかった GIST の病態の多様性を解明し、新たな分子マーカーや治療標的となり得るかもしれない。

#### 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)

(1) Igarashi H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Ito M, Okuda H, Kanno S, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Kusumi T, Hasegawa T, Sukawa Y, Adachi Y, Okita K, Hirata K, Imamura Y, Baba Y, Imai K, Suzuki H, Yamamoto H, Nosho K, Shinomura Y. Association of microRNA-31-5p with clinical efficacy of anti-EGFR therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. DOI: 10.1245/s10434-014-4264-7. in press 査読有

(2) Nosho K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2014;35:776-783. doi: 10.1093/carcin/bgt374. 査読有

(3) Yamamoto H, Watanabe Y, Maehata T, Morita R, Yoshida Y, Oikawa R, Ishigooka S, Ozawa S, Matsuo Y, Hosoya K, Yamashita M, Taniguchi H, Nosho K, Suzuki H, Yasuda H, Shinomura Y. An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: insights from bench to bedside and vice versa. *World J Gastroenterol*. 2014;20:3927-3937. doi: 10.3748/wjg.v20.i14.3927. 査読有

(4) Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Nosho K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H, Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. *J Gastroenterol*. 2014;49:1135-1144. doi: 10.1007/s00535-013-0861-7. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

(1)新沼猛, 篠村恭久, 鈴木拓: 消化管間質腫瘍における microRNA 遺伝子のエピジェネティックな制御: 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月横浜

(2)伊早坂舞, 篠村恭久, 鈴木拓: 消化管間質腫瘍の再発に関する microRNA の解析: 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月横浜

〔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

<http://web.sapmed.ac.jp/im1/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

篠村 恭久 (Shinomura Yasuhisa)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90162619

### (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