

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860514

研究課題名(和文) GISTにおけるnoncoding RNAのエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of noncoding RNA in gastrointestinal stromal tumor

研究代表者

新沼 猛 (Takeshi, Niinuma)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60708113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：GISTにおいてエピジェネティックに不活化されるnoncodingRNAの探索目的に遺伝子サイレンシングの解除のためGIST-T1細胞株に5-aza-dcおよび4-PBAによる薬剤処理を行った後にnoncodingRNAの発現変化、ChIPシーケンズ解析を行った。エピジェネティックな機序で転写抑制を受けると考えられるnoncoding RNAを抽出し、臨床検体のメチル化状態を解析し高頻度にメチル化されるmiR-34a, miR-335を見出した。また、tumor suppressiveに働くと考えられているlncRNAのCpG island高メチル化が予後不良と関連することが確認された。

研究成果の概要(英文)：We performed screening for detection of epigenetically silenced noncodingRNAs in GIST. For this purpose, GIST-T1 cells were treated by 5-aza-dc and 4-PBA. After which, expression of noncodingRNA and ChIP sequencing analysis were performed. We selected candidate genes which epigenetically silenced and found that miR-34a and miR-335 were frequently methylated in primary GIST. We also identified CpG island methylation of possible tumor suppressive lncRNA is associated with poor prognosis of GIST patients.

研究分野：消化器がん

キーワード：消化管間質腫瘍 エピジェネティクス noncoding RNA

## 1. 研究開始当初の背景

GISTは消化管間葉系腫瘍の中で最も多い腫瘍である。GISTの多くはc-kit遺伝子の機能獲得性変異によるカハール介在細胞の自律増殖により生じるものと考えられている。GISTは基本的に悪性ポテンシャルを有する腫瘍と考えられており、臨床においては腫瘍径、核分裂数、腫瘍発生部位などをもとにリスク分類を行い、治療方針を決定している。

GISTの悪性度と相関する分子異常としてはKIT、PDGFRAの変異やCD26の高発現などが報告されているが、GIST悪性化機序の全容は未だ明らかにされていない。我々は、microRNAのひとつであるmiR-196a、および長鎖noncoding RNAであるHOTAIRの高発現が、高リスク群GISTにおいて高頻度に認められること、またこれらの高発現がGISTの転移や予後不良と強く相関することを明らかにした(Cancer Res, 2012)。また、GIST細胞株を用いた検討では、miR-196aあるいはHOTAIRの阻害により細胞増殖および浸潤能が抑制されたことから、これらのnoncoding RNAの過剰発現がGIST悪性化の一因であると考えられた。

## 2. 研究の目的

DNAメチル化異常に代表されるエピジェネティックな変化はほぼあらゆる悪性腫瘍に見られる現象である。我々はGISTにおいてゲノムワイドな低メチル化が高悪性度と強く相関することを報告した(Clin Cancer Res, 2010)。また最近では、GISTにおけるCpGアイランドのメチル化をマイクロアレイ解析し、悪性度と相関する遺伝子メチル化の報告もある。これらの結果は、GISTの悪性化にメチル化異常が関与していることを示唆しているが、GISTのエピジェネティクス異常に関する研究報告はいまだ数少ない。近年、noncoding RNA遺伝子のエピジェネティックな不活化が発癌において重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。我々は消化器癌においてエピジェネティックに不活化されたmicroRNAのスクリーニングを行い、miR-34b/c遺伝子のメチル化が胃癌リスクマーカーとなり得ることを明らかにした(Carcinogenesis, 2010)。さらに、様々な悪性腫瘍においてmicroRNA遺伝子のエピジェネティック異常の報告が相次いでいる。GIST悪性化においてもmicroRNAや長鎖ncRNA遺伝子のエピジェネティクス異常が関与している可能性が十分に考えられるが、そのような検討はいまだなされていない。そこで本研究においてはGISTにおいてエピジェネティックな不活化を受けているmicroRNAおよび長鎖noncoding RNAを同定することで、GIST悪性化のメカニズムを解明するとともに、診断・治療の新たな標的分子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 網羅的遺伝子発現解析

GIST細胞株を5-aza-dCおよび4-PBAで処理した後total RNAを抽出する。抽出したRNAを用いてマイクロRNAについてはTaqManアレイによって発現プロファイルを網羅的に解析した。また、lncRNAについてはAgilentのSurePrint G3 Human GEマイクロアレイによって遺伝子発現を網羅的な解析を行う。マイクロアレイでは蛋白をコードする遺伝子の他、Harvard大学のBroad Instituteが同定した約1万種類のlncRNAの検出を行った。

### (2) ヒストン修飾状態の解析

GIST細胞株におけるヒストン修飾をクロマチン免疫沈降シーケンシング法(ChIP-seq)により解析する。遺伝子転写活性化のマーカーであるトリメチル化ヒストンH3K4 (H3K4me3)に対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降(ChIP)を行う。転写開始点領域のH3K4me3は遺伝子発現を鋭敏に反映するため、発現解析データと統合解析を行った。

### (3) データの統合解析およびGIST関連ncRNAの同定

遺伝子発現データおよびエピゲノムデータをGene Spring GX、IGVなどを用いて解析し、エピジェネティックにサイレンシングされるmiRNA・長鎖ncRNAの同定およびプロモーター領域のDNAメチル化を評価する。さらに個々の遺伝子領域のDNAメチル化を、バイサルファイトパイロシーケンシング法で解析した。

### (4) 臨床病理学的因子との相関

上記で同定した遺伝子の発現およびメチル化を、臨床検体を対象に解析する。腫瘍径、核分裂像、転移、再発などの臨床病理学的因子との関連を検討し、悪性度と相関するncRNA遺伝子を検討した。

### (5) 機能解析

GISTにてエピジェネティックに不活化されたncRNAの機能解析を行う。miRNAのmimicをトランスフェクションし、細胞増殖に与える影響をMTTアッセイにより解析する。遊走能への影響をBoyden chamber assayにて、浸潤能に与える影響をマトリゲル浸潤アッセイで検討した。

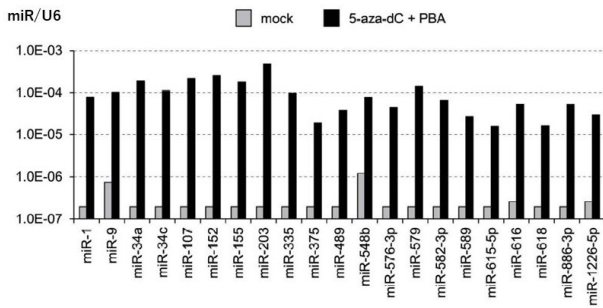
## 4. 研究成果

### A: エピジェネティックに不活化されるmiRNAの解析

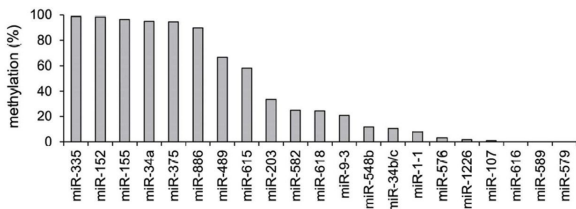
#### (1) マイクロRNA発現プロファイル

Taqman miRNAアレイを行いGIST-T1細胞株において5-aza-2'-deoxycytidineおよび4-phenylbutyric acid処理により発現が上昇(fold change > 50)し、推測される転写開始点近傍の5kb前後にCpG islandを有するマイクロRNAとしてmiR-1、miR-9、miR-34a、miR-34c、miR-107、miR-152、miR-155、miR-203、miR-335、miR-375、miR-489、miR-548b、miR-576-3p、miR-579、miR-582-3p、miR-589、miR-615-5p、miR-616、

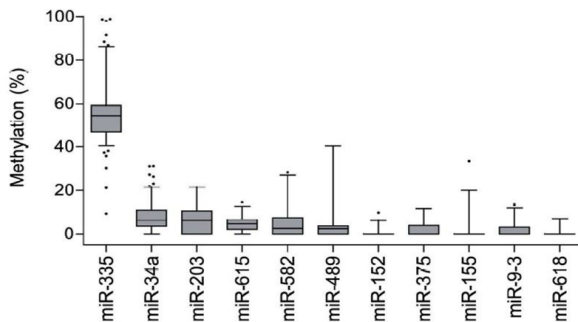
miR-618、miR-886-3p、miR-1226-5p を同定した。



これらをメチル化によりサイレンシングされるマイクロRNA遺伝子の候補として解析を行うこととし、GIST-T1細胞においてそれらの発現解析を行った。

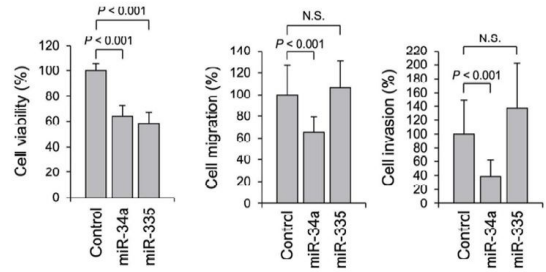


GIST-T1細胞株において高メチル化していたmiRNAについては臨床検体を用いて、そのメチル化を解析した。



臨床検体において比較的高頻度にメチル化されているmiRNAとしてmiR-335およびmiR-34aを抽出し、そのメチル化と臨床病理学的所見について比較検討したがGISTのリスク分類、転移、腫瘍系などといった因子との統計学的に有意な相関は見られなかった。

miR-335およびmiR-34aの機能解析のためmiR-34a mimic、miR-335 mimicのトランスフェクションしたところGIST-T1細胞の増殖能は有意に抑制された。またmiR-34aは細胞の遊走能および浸潤能を有意に抑制した。



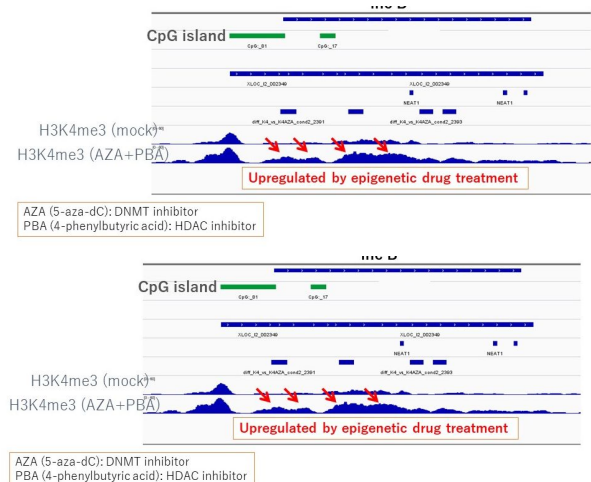
## B: エピジェネティックに不活化される lncRNA の解析

miRNAと同様にGIST-T1細胞株における網羅的遺伝子発現解析: エピジェネティックな遺伝子サイレンシングの解除を目的にGIST-T1細胞株に5-aza-dCおよび4-PBAによる薬剤処理を行った。抽出したRNAを用いてAgilentの遺伝子発現アレイを用いて遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ約1万プローブのnoncoding RNAのうち709 probeにおいて薬剤処理後に発現上昇が認められた。

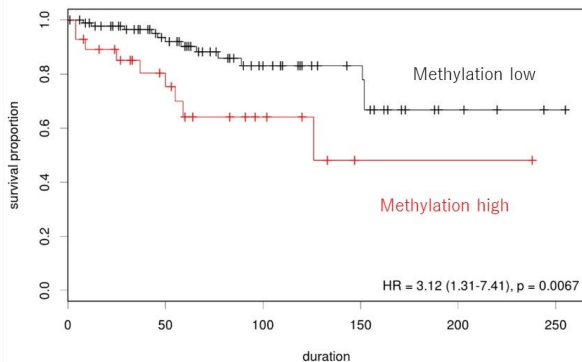
統計学的処理および転写開始点近傍のCpG islandの有無にてさらに絞り込みを行い、58 probeをエピジェネティックな機序で不活化されているnoncoding RNA候補として抽出した。

ヒストン修飾状態の解析: 薬剤処理により変化する、転写活性化のマーカとなるヒストンH3K4のトリメチル化の状態を解析するために薬剤処理前後の細胞株DNAを用いてChIP シークエンス解析を行った。シークエンス後にアライメント、MACS2によるピーク解析を行い、約14000のdifferential peakを検出した。

遺伝子発現アレイとヒストン修飾状態の統合解析: 薬剤処理後に上昇するピークと遺伝子発現を統合解析し、数個のエピジェネティックな機序で転写抑制を受けると考えられるnoncoding RNAを絞り込んだ。



抽出した lncRNA の CpG island のメチル化頻度を臨床検体 (=132) を用いパイサルファイトパイロシーケンス法で解析し、臨床データと相関を調べたところ高メチル化が予後不良と相関する lncRNA を見出した。現在解析を継続中である。



### 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 1 件)

PLoS One. 2015 Jul 27;10(7):e0133754.  
doi: 10.1371/journal.pone.0133754.  
eCollection 2015.

#### A Screen for Epigenetically Silenced microRNA Genes in Gastrointestinal Stromal Tumors.

Isosaka M<sup>1</sup>, Niinuma T<sup>2</sup>, Nojima M<sup>3</sup>, Kai M<sup>2</sup>, Yamamoto E<sup>4</sup>, Maruyama R<sup>1</sup>, Nobuoka T<sup>5</sup>, Nishida T<sup>6</sup>, Kanda T<sup>7</sup>, Taguchi T<sup>8</sup>, Hasegawa T<sup>9</sup>, Tokino T<sup>10</sup>, Hirata K<sup>5</sup>, Suzuki H<sup>2</sup>, Shinomura Y<sup>1</sup>.

〔学会発表〕(計 5 件)

消化管間質腫瘍における microRNA のエピジェネティックな制御  
第8回日本エピジェネティクス研究会  
2014.5.25-27 伊藤国際学術研究センター  
(東京都文京区)

消化管間質腫瘍における miRNA 遺伝子の  
エピジェネティックな制御機構  
第73回日本癌学会総会  
2014.9.25-27 パシフィコ横浜(横浜市)

消化管間質腫瘍の再発に関連する  
microRNA の解析  
日本分子生物学会年会  
2014.11.25-27 パシフィコ横浜(横浜市)

消化管間質腫瘍における miRNA 遺伝子の  
エピジェネティックな制御機構  
第9回エピジェネティクス研究会  
2015.5.25-5.26 学術総合センター一橋講  
堂(東京都千代田区)

消化管間質腫瘍の再発に関連する  
microRNA の解析

第74回日本癌学会総会  
2015.10.8-10.10 名古屋国際会議場(名古屋  
市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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

新沼 猛 (Takeshi Niinuma)  
札幌医科大学 医学部 助教  
研究者番号: 60708113

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: