

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861060

研究課題名(和文) 血清エクソソームの機能性RNA発現解析による非B非C肝癌の新規診断法の開発

研究課題名(英文) Serum exosomal non-coding RNAs as novel biomarkers for non-viral hepatocellular carcinoma

## 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非B非C肝癌患者における血清エクソソーム中のアンチセンスRNA発現異常の解析と新しい治療法への応用を検討する。本研究の同意を得た非B非C肝癌患者約30名から末梢血を採取して血清の分離を行い、対照群として肝癌患者と健常人からも同意を得た上で血清を採取している。アンチセンスRNAのマイクロアレイを用いた網羅的発現解析を行った。差があった個別アンチセンスRNAのリアルタイムPCRおよびISHを用いた発現解析を行っている。

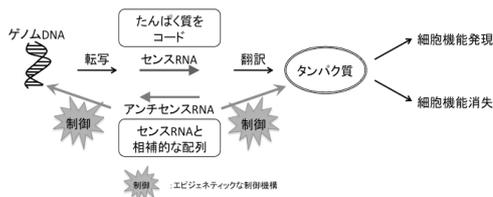
研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that circulating non-coding RNAs are a potential biomarker in various types of malignancies. Natural antisense transcripts have important cellular functions such as the stabilization and silencing of mRNA. The aim of this study was to investigate the feasibility of using serum exosomal natural antisense RNAs as novel serological biomarkers for non-viral hepatocellular carcinoma (HCC) in patients. We measured the serum exosomal natural antisense RNAs in patients with non-viral HCC(n=30). The expression levels of natural antisense RNA was subjected to expression profile analysis of sense and antisense transcripts using a human custom microarray. The expression of the natural antisense transcripts found to be clearly separated into different clusters. The expression levels are quantified by real-time PCR. This study suggests that serum exosomal natural antisense RNAs may be used as novel serological biomarkers for non-viral HCC.

研究分野：医歯薬学

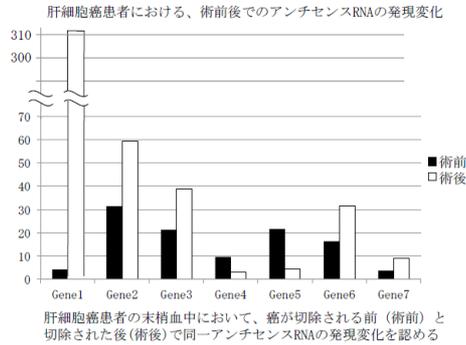
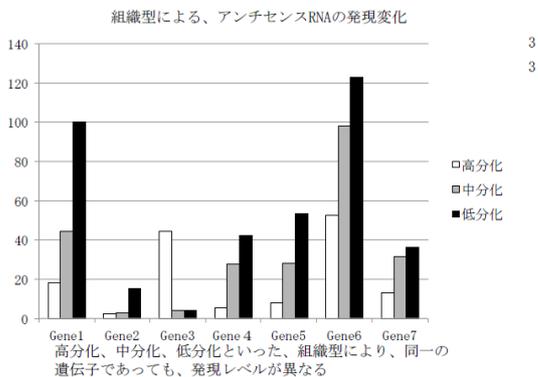
キーワード：エクソソーム アンチセンスRNA 非B非C肝癌 ncRNA 早期診断

1. 研究開始当初の背景

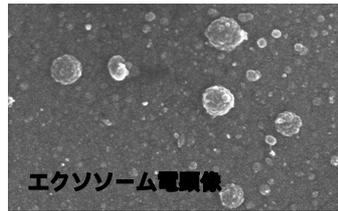
タンパク質をコードしない non-coding RNA(ncRNA)が大量に転写されていることが明らかになってから約 10 年が経過した。microRNA(miRNA)に代表される ncRNA のなかの 20~30 塩基の「小さな RNA」が「RNA サイレncing」と総称される遺伝子発現抑制機構で癌の発生・進展に非常に重要な役割を果たしていることがわかってきた。一方ここ数年、それ以外の長鎖 ncRNA の細胞・生命活動における重要性が次々と明らかになっているが、癌におけるその病的意義に関しては一部の例を除きほとんど分かっていない。肝癌は肝炎治療の進歩により C 型肝炎由来の肝癌は確実に減少しているが、高齢者肝癌や非 B 非 C 型肝炎は発症数、死亡者数が増加傾向にあり、より早期発見につながる診断法や効果の高い治療法の開発が急がれる。肝炎ウイルスが原因ではないと思われる非 B 非 C 肝癌の多くは大量飲酒や非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)由来と想定され、我が国では過去 10 年間で倍増している。我々はこれまで長鎖 ncRNA の 1 種であるアンチセンス RNA に注目して研究を行ってきた。ヒト大腸癌・肝癌(C 型)組織に関して、4 万種類を超えるセンス/アンチセンス RNA の発現を網羅的に解析し、個別のセンス/アンチセンス RNA が大腸癌・肝癌(C 型)の発生・進行に伴って増加又は減少していることを確認した。ヒト癌組織のアンチセンス RNA の網羅的発現解析は、我々の報告が世界初である。



癌におけるアンチセンス RNA の発現異常の解析は、癌の発生・進展のメカニズムの解明に非常に重要であるだけでなく、新しい治療法開発に向けてその研究の進展が期待されている。肝癌(C 型)において、癌の分化度によってアンチセンス発現が違ったり血液において癌切除前後でそれらの発現が大きく変化することを明らかにした。



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 であるが肝癌においてはその詳細なメカニズムは未だ不明であり、アンチセンス RNA が関与している可能性が考えられる。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にアンチセンス RNA が存在するか非かに注目した。すでに予備的実験で、健康人の末梢血清に存在するエクソソームを単離し、アンチセンス RNA が存在することを確認した。これらの予備実験の結果を踏まえて、本研究の目的は、非 B 非 C 肝癌患者における血清エクソソーム中のアンチセンス RNA および miRNA の発現異常の解析と新しい治療法への応用を検討することである。



2. 研究の目的

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、癌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わかっていない。我々はこれまで長鎖 ncRNA の 1 種であるアンチセンス RNA に注目して研究を行ってきた。ヒト癌組織の内在性アンチセンス RNA の網羅的発現解析は、我々の報告が世界初である。また、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。そこで我々はこれまで培ってきた解析技術を用いて、非 B 非 C 肝癌患者における血清エクソソーム中のアンチセンス RNA および miRNA の発現異常の解析を行いその機能を解析し、全く新しい非 B 非 C 肝癌の血清バイオマーカーを同定し、さらに新しい治療法への応用を検討することである。本研究の目的が達成することで、血液検査という簡便な検査で過去 10 年間で倍増している非 B 非 C 肝癌の早期発見が可能になり、世界的な健康増進に大きく寄与する。将来的に

は肝癌だけでなく各種の癌に関しても本法を用いた新規の診断法が可能となり、より無駄のない医療が実現、癌の予後改善と医療費削減、さらには患者の身体的負担軽減に大きく貢献できる。

アンチセンス RNA の機能解析を行うことにより、これまで機能が解明されていなかった長鎖 ncRNA が生体内でどのような役割を果たしているかを解明できる。カスタムマイクロアレイ等の技術を用いて癌以外の難治性疾患へのアンチセンス RNA の関与についても今後さらに研究を進展させていくことが可能になる。

### 3. 研究の方法

(1) 非 B 非 C 肝癌患者および健常人の末梢血からのエクソソーム単離と RNA 抽出

本研究の同意を得た非 B 非 C 肝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。対照群として肝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。

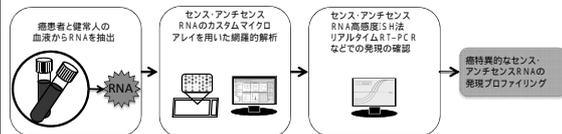
(2) センス/アンチセンス RNA のカスタムマイクロアレイを用いたアンチセンス RNA 発現の網羅的解析

肝癌の発生、進展、再発に関連するエクソソーム中の miRNA およびアンチセンス 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。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。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、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センス/アンチセンス RNA を同定する (非 B 非 C 肝癌 50 症例を予定)。

(3) リアルタイム PCR を用いた個別アンチセンス RNA の発現解析

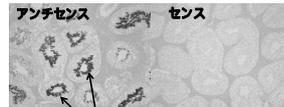
肝癌の発生、進展に伴ってセンス/アンチセンス RNA の発現に差が見られた個別のセンス/アンチセンス RNA の血清エクソソーム中の発現量をリアルタイム RT-PCR で定量的に

評価・確認する。



(4) 個別アンチセンス RNA の組織中での発現部位の解析 (In situ Hybridization)

血清エクソソーム中の個別センス/アンチセンス RNA に関して、手術切除組織を用いて in situ hybridization (ISH) を行い、組織において発現が見られるのかを確認し、発現が見られる場合発現部位を同定する。



アンチセンス RNA の発現が組織上で確認できる

センス/アンチセンス RNA の ISH 解析

(5) Tumorgraft の血清エクソソーム中の個別アンチセンス RNA の発現の確認

手術切除組織をマウス背部に移植した二次移植マウスの血清エクソソーム中の個別アンチセンス RNA の発現を確認する。

(6) 低コストで迅速診断が可能な新しい癌診断用カスタムマイクロアレイの開発

非 B 非 C 肝癌患者の癌組織および血清中エクソソーム内の RNA の解析で明らかになったセンス/アンチセンス RNA の発現プロファイリングから、スクリーニング診断および再発ハイリスク診断に有用と思われる遺伝子を 20~30 個に厳選し、低コストでのスクリーニング検査を実現する。肝癌の血清マーカーとして層別化診断が可能になる。



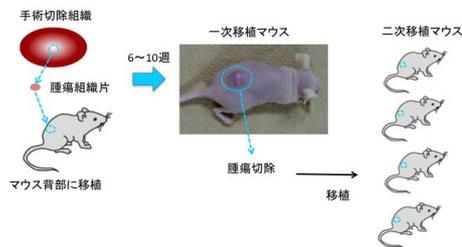
(7) 個別のアンチセンス RNA の発現解析および機能抑制による治療への応用の検討

アンチセンス RNA の肝癌における機能を確認するために肝癌細胞株 (Huh7) を使用し、in vitro にて機能の解析を行う。個別のアンチセンス RNA のシーケンスを行い、センス RNA とオーバーラップしない領域に siRNA を設計し、アンチセンス RNA 機能抑制が肝癌細胞に与える影響 (増殖能、浸潤能) を検討する。さらに、個別のアンチセンス RNA が抑制する標的遺伝子を検索し、Western blot、ルシフェラーゼアッセイでアンチセンス RNA と標的遺伝子との関連を明らかにする。

(8) Tumorgraft を用いた個体レベルでの個別アンチセンス RNA の loss-of-function による治療効果判定

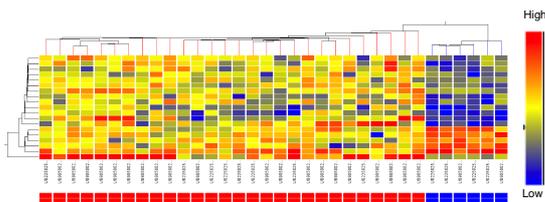
手術切除組織をマウスの背部に移植した二次移植マウスに Transit hydrodynamic delivery system を用いてターゲットアンチ

センス RNA に対する siRNA を導入し、個体レベルでの抗腫瘍効果を検討する。

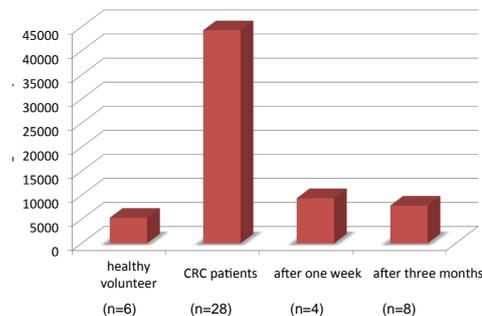


#### 4. 研究成果

予備的実験で、健常人の末梢血清中存在するエクソソームを単離し、アンチセンス RNA が存在することを確認した。予備実験の結果を踏まえて、本研究の目的は、非 B 非 C 肝癌患者における血清エクソソーム中のアンチセンス RNA および miRNA の発現異常の解析と新しい治療法への応用を検討することである。現在までに本研究の同意を得た非 B 非 C 肝癌患者約 30 名から末梢血を採取して血清の分離を行っている。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) を使用して行っている。対照群として肝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している。症例が目標の 30 例に達したため、センス/アンチセンス RNA のカスタムマイクロアレイを用いたアンチセンス RNA 発現の網羅的解析を行った。



網羅的発現解析により発現に差があった個別アンチセンス RNA のリアルタイム PCR および ISH を用いた発現解析を行っている。



最終的には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を行う。

本研究の目的が達成することで、血液検査という簡便な検査により過去 10 年間で倍増している非 B 非 C 肝癌の早期発見が可能になり、

世界的な健康増進に大きく寄与すると考えている。

#### 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)

Kurokawa T, Kohno K, Chiba M, Pak S, Murata S, Fukunaga K, Yasue H, Ohkohchi N. Antisense RNA in blood is a new diagnostic marker for colorectal cancer.

Oncol letters. 査読有. 2016. in press

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

#### 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