

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07123

研究課題名(和文) 環状RNAによるびまん性胃癌の悪性形質獲得とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification and function of circular RNAs in diffuse-type gastric cancer

研究代表者

庄田 勝俊 (Katsutoshi, Shoda)

京都府立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：70783421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、次世代シーケンサー解析など新たな核酸解析手法の開発により、数百もの環状RNAがヒトで発現し生理的・病態生理的に機能している事が確認されるとともに、その生成機構の一端が報告され、更なる環状RNAの探索と機能解析が癌領域でも注目を集めている。我々は、びまん性胃癌に特異的に発現する環状RNAを同定するため、癌部・非癌部RNAを抽出し、網羅的解析により環状RNA発現の比較検討を行った。びまん性胃癌では環状RNAは正常組織と比較し有意に低下しており、癌関連micro RNAのスポンジとして機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In recent years, through development of next generation sequencer, it has been confirmed that hundreds of circular RNAs are expressed in humans and function pathophysiologically. To identify circular RNA that is specifically expressed in diffuse-type gastric cancer, we conducted comprehensive analysis of circular RNA and compared the expression between cancer and noncancerous tissue in patients with diffuse-type gastric cancer. In diffuse stomach cancer, circular RNA in cancer tissues was significantly decreased as compared with noncancerous tissues, suggesting the possibility of functioning as a sponge of cancer related micro RNA.

研究分野：消化器外科

キーワード：環状RNA びまん性胃癌

1. 研究開始当初の背景

胃癌は病因論的にも病理組織学的にも多様性を持ち、従来のゲノム解析や近年の次世代シーケンサーによる解析により、分子レベルでいくつかの分子サブタイプに分類した個別化医療が考慮されるようになってきている (TCGA. Nature. 2014, Cristescu R et al. Nature Med. 2015)。しかし、胃癌においては、コンパニオン診断の存在する分子標的薬として国内では抗 HER2 薬のみが保険医療として承認されているに過ぎない。進行胃癌の約 20%に見られる HER2 陽性胃癌は分化型 (腸型) に多く見られ (Bang Y-J et al. Lancet. 2010)、難治性のびまん性胃癌 (Diffuse-type gastric cancer, DGC) は HER2 陰性であることが多い。DGC は、分子サブタイプではゲノム安定性を持つ genomically stable tumor (GS サブタイプ) パターンが多いとされ、RHOA、CDH1 などの遺伝子変異や CLDN18-ARHGAP 融合遺伝子などが報告されているものの、治療標的となりうる変異はない。そのため、DGC は、腹膜播種性転移などを起こし根治切除不能となる場合が多く、治療困難で予後不良な難治癌であるにもかかわらず分子標的治療を含め有効な治療法がない。また、胃癌は、DGC を含めて高度な組織学的不均一性を持つことから、時間的・空間的に正確な病態把握が困難であるが、これに対して、繰り返し施行可能で腫瘍の不均一性を integrate した情報を得ることが期待できる循環遊離核酸を用いた液体生検 (liquid biopsy) の有用性が報告されてきている (Murtaza M et al. Nature. 2013)。我々も liquid biopsy に注目し (Ichikawa D et al. Anticancer Res. 2004)、特に胃癌において分子標的薬 (抗 HER2 薬) に関する、治療選択や治療効果の予測とモニタリングでの有用性を報告してきた (Shoda et al. Gastric Cancer. 2015)。このことから、新規の治療標的分子の同定と、その異常の liquid biopsy での検出法開発は、有効な治療法の無い DGC のような難治癌克服における喫緊の課題である。

近年、次世代シーケンサー解析により、環状 RNA (circRNA) の存在が明らかになり、ciRS-7 (CDR1as) が miR-7 のスポンジとして作用する調節分子であることが報告された (Hansen TB et al. Nature. 2013)。その後、数百もの環状 RNA がヒトで発現し生理的・病態生理的に機能している事が確認されるとともに、その生成機構の一端が報告され、更なる環状 RNA の探索と機能解析が癌領域でも注目を集めている (Conn SJ et al. Cell. 2015)。環状 RNA には、マイクロ RNA を抑制する転写後調節因子としての機能や、RiboCluster の中で RNA 結合蛋白質と結合し上皮 - 間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition、EMT) を制御する機能 (Conn SJ et al. Cell. 2015)、環状という特徴を生か

した恒常的な蛋白翻訳機能 (Abe N et al. Sci Rep. 2015) が報告され、さらに RNase による分解を受けにくいという特徴から、血漿中循環 RNA でも比較的安定して存在することも報告されている (Li P et al. Clinica Chimica Acta. 2015)。

このような学術的背景を基に、本研究課題では『DGC の悪性形質獲得に関与する分子の発現や機能異常を引き起こす特異的環状 RNA が存在する』という仮説を立て、DGC 特異的な環状 RNA の同定を行うとともに、その調節標的分子と調節の分子機構の解明とその阻害の効果の検証により新規 DGC 治療戦略の構築を目指すとともに、コンパニオン診断や病状把握のためのバイオマーカーとして同定した環状 RNA の血漿中での検出法の確立を行う。

2. 研究の目的

(1) DGC に特異的に発現する環状 RNA の同定と血漿中での検出

未分化・スキルス胃癌由来ヒト胃癌細胞株、DGC 手術症例検体、非癌部胃組織から抽出した RNA を用いて、次世代シーケンサー解析により DGC に発現する環状 RNA を同定する。候補環状 RNA の腸型胃癌での発現を検討し、DGC 系譜特異的な環状 RNA を絞り込む。さらに、患者術前術後、ならびに健常対象者の末梢血中から血漿中 cell-free RNA を抽出し、DGC 特異的環状 RNA の検出を行う。

(2) DGC に発現する候補環状 RNA の悪性形質獲得への関与と分子機構の解明

候補環状 RNA が癌悪性化に関与する機構を明らかにするため、未分化型癌細胞株を用い、環状 RNA の発現抑制や強制発現を行うことによる表現型 (細胞増殖・浸潤・転移能) の変化を検討する。同時に、変化する micro RNA や mRNA を網羅的に解析し、候補環状 RNA の標的分子を同定することで、RiboCluster における候補環状 RNA の役割を解明する。

(3) 候補環状 RNA を標的とした新たな DGC 治療法の検討

候補環状 RNA 特異的な RNA interference (RNAi) を用いて、2 で検討した環状 RNA 特異的な転写後調節機能や恒常的な蛋白翻訳能の喪失に伴う、癌細胞株の増殖能、浸潤能の変化を検討する。更に、癌細胞株を皮下移植したモデルにおいて in vivo で環状 RNA 特異的 RNAi の血中投与による、腫瘍増殖・浸潤・転移抑制効果を評価し、新規治療法としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) バイオマーカーとしての DGC 特異的に発現する環状 RNA 探索

胃癌切除組織を用いた環状 RNA 探

索

肉眼的に3型または4型胃癌と診断され、かつ組織学的に印鑑細胞癌または非充実性低分化型腺癌と診断された症例10例のDGC患者における胃癌切除組織(癌部・非癌部、癌部では出来るだけ癌細胞が多く含まれるようマクロダイセクションを行う)から抽出したtotal RNAをRNase R処理し、oligo dTでキャプチャーされない(polyAを持たない)分画をからさらにTruseq total RNA Ribo-Zero kitでrRNAを除去したライブラリ作製を行い、illumina Miseqを用いてRNA seqを行う。得られた配列情報のうちマッピングされないものを専用のパイプラインを用いて情報解析することで環状RNAの配列とリード数の情報を得て、癌部非癌部のサブトラクションにより、癌特異的な環状RNAの同定を行う。DGC由来癌細胞株(KATO-III、MKN-45、NUGC-4、等)6株でも同様に解析を行い、非癌部全例のRNA-seq情報とのサブトラクションを行う。

液体生検を用いたDGC特異的に発現する環状RNA探索

上記10例の臨床検体に対応した保存血漿(手術前後)と、10例の健常対象者血漿からQIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを抽出する。で同定した候補環状RNAを、特異的なプライマーを設計することでPCRでの検出を試み、検出可能であったものは手術前後でデジタルPCR(dPCR)による定量的検出を行って、腫瘍特異性を確かめる。

候補環状RNAの一般性の検討

Validation cohortとして、50例の術前・術後DGC患者血漿、50例の健常対象者血漿サンプルを用いてdPCRを行い、選択された数個の候補環状RNAの血漿中での特異的検出を評価する。

(2) DGCに発現する候補環状RNAの機能解析 遺伝子導入による癌悪性度変化の検討

遺伝子導入による癌悪性度変化の検討

DGC細胞株のうち、特に候補環状RNAの発現の高い細胞株を選択し、候補環状RNA遺伝子抑制実験(siRNA)を行い、候補環状RNAの癌に対する増殖・浸潤・転移能の評価を行う。項目としては、1) MTTアッセイによる細胞増殖能、2) 細胞機能の変化を観察・評価、3) Boyden chamber assay法による癌細胞の遊走・浸潤アッセイ等について検討する。

標的分子の同定

DGC細胞株を用いて、候補環状RNAのsiRNAを用いたknock downにより変化するmicro RNA及びmRNAに関してmicroarrayを用いた網羅的解析を用いて検討し、標的分子の同定を行う。平行してピオチン化直鎖RNA(非

環状化)を用いたプルダウンアッセイにより結合(吸着)mRNA、miRNAを網羅的に同定し、これらを統合することにより標的分子候補を決定する。候補は、定量PCRにより確認する。標的候補群を用いたGO解析、パスウェイ解析から、表現型に関連した環状RNAによる調節機構をバイオインフォマティクに推定し、下流に位置する分子の発現導入やノックダウンでの表現型のレスキューによって実験的に確認する。

4. 研究成果

(1) 胃癌切除組織を用いた環状RNA探索

既報の癌関連環状RNAの発現量の評価 胃癌における癌関連環状RNA発現量を把握するため、cirs-7 (CDR1as) (Cancer Res. 2013, J Cancer Res Clin Oncol. 2017, Onco Targets Ther. 2017)、MT0-1を含めたいくつかの環状RNA発現を評価した。予想に反して、胃癌組織において周囲胃正常組織よりも発現が低くなる傾向を認めた。びまん性胃癌組織と周囲の正常胃組織から抽出したtotal RNAに対しRNaseR処理を行い、数種類の環状RNA特異的なprimerで定量的PCRをかけたところ、RnaseR処理前よりも環状RNAがenrichされていることを確認した。これらtotal RNAを用いて、circRNA array (Arraystar)による網羅的解析を検討した。胃癌組織で正常胃組織より有意に環状RNAの発現が低下していた。その中で数少なく癌部で上昇している環状RNA(USP22)特異的なprimerを用いて胃癌組織から抽出した50例でvalidationを行なったが、癌部非癌部で有意な変化を認めず、びまん性胃癌に特異的に上昇している環状RNAの検出は困難であった。その他、他癌腫で固形癌との関連が示唆されているcirs-7 (CDR1as) (Cancer Res. 2013, J Cancer Res Clin Oncol. 2017, Onco Targets Ther. 2017)の発現量を胃癌組織50例で検討し、臨床病理学的因子との検討を行なった。癌部非癌部の比較では非癌部で発現が高い傾向であったが、癌部で上昇している症例では脈管浸潤が高度である傾向を認めた。

(2) 液体生検を用いたDGC特異的に発現する環状RNA探索

胃癌患者血漿中RNAは微量であり、preamplificationを用いた解析手法で検討した。組織で発現が高い症例においてはcirs-7をはじめ環状RNAの安定した検出が可能であった。術前術後の検討では術前高発現であった症例で術後の有意な低下を認め、胃癌組織での発現が高い症例においてはバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された(投稿準備中)。

胃癌患者血漿遊離RNA中の環状RNAの検出は可能であるが微量な発現量であるため、より

安定した解析手法の確立のために、新たな手法により検討する必要がある。

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6件)

(1) Kohmoto T, Shoda K, (他9名) Construction of a combinatorial pipeline using two somatic variant calling methods for whole exome sequence data of gastric cancer. J Med Invest. (2017) 64:233-240. 査読有

(2) Shoda K, Ichikawa D, (他12名) Clinical utility of circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in patients with gastric cancer. Oncotarget. (2017) 8:28796-28804. 査読有

(3) Konishi H, Shoda K, (他13名) Early thrombomodulin- α administration outcome for acute disseminated intravascular coagulopathy in gastrointestinal surgery. World J Gastroenterol. (2017) 23:891-898. 査読有

(4) Shoda K, Ichikawa D, (他13名) Risk Stratification According to the Total Number of Factors That Meet the Indication Criteria for Radical Lymph Node Dissection in Patients with Early Gastric Cancer at Risk for Lymph Node Metastasis. Ann Surg Oncol. (2016) 23:792-797. 査読有

(5) Arita T, Shoda K, (他13名) Tumor exosome-mediated promotion of adhesion to mesothelial cells in gastric cancer cells. Oncotarget. (2016) 7:56855-56863. 査読有

(6) Shoda K, Konishi H, (他10名) Investigation of a Quality Check for Plasma Samples. Biochem Pharmacol (Los Angel) (2016) 5:1000208. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

(1) 庄田勝俊, 他 EBV 関連胃癌における循環遊離 DNA の臨床的意義 第28回日本消化器癌発生学会総会・第9回国際消化器癌発生会議 2017年11月17日(熊本市)

(2) 庄田勝俊, 他 Droplet digital PCR を用いた胃癌患者血漿遊離 DNA における HER2 増幅モニタリング 第27回日本消化器癌発生学会総会 2016年9月15日(鹿児島市)

(3) 庄田勝俊, 他 EBV 関連胃癌患者における遊離 DNA の有用性の検討 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月7日(横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

京都府立医科大学消化器外科ホームページ
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/dgstv-surg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄田 勝俊 (SHODA, Katsutoshi)

京都府立医科大学・消化器外科・研究員

研究者番号：70783421