

平成30年4月27日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15247

研究課題名(和文) 分泌型T-UCR非翻訳RNAの消化管癌・泌尿器癌リキッドバイオプシーへの応用

研究課題名(英文) Secretory Transcribed-ultraconserved regions in gastrointestinal and urological cancers and their application to liquid biopsy

研究代表者

安井 弥 (YASUI, WATARU)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・教授

研究者番号：40191118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：非翻訳RNAコード超保存領域(transcribed-ultraconserved region: T-UCR)の内、消化管癌、泌尿器癌において発現が亢進しているUC.63+, UC.416+Aなどがリキッドバイオプシーのマーカーとなることを見いだした。血中のUC.416+Aは、前立腺癌検体において転移を有する症例、去勢抵抗性の症例(CRPC)、docetaxel抵抗性の症例で有意に高値であった。さらに、Uc.249+A、Uc.266+Aなどが大腸癌の癌幹細胞性を制御する可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Up-regulated transcribed ultraconserved region (T-UCR) transcripts in gastrointestinal cancers and urological cancers, such as U.63+, Uc.416+A, were found to be a candidate marker for liquid biopsy. Concerning prostate cancer, Uc.416+A in the blood was significantly higher in cases with metastases, with castration resistance (CRPC), and with docetaxel resistance. We also identified that Uc.249+A, Uc.266+A, etc. might regulate cancer stem cell properties of colorectal cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分泌型T-UCR 非翻訳RNA 消化管癌 泌尿器癌 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムには種を超えて保存された非翻訳 RNA をコードする超保存領域 (T-UCRs) が存在する。最近、申請者らは Uc.158+A をはじめ多くの T-UCR が胃癌・前立腺癌で発現異常を示し、Uc.416+A は miR-153 の下流に位置し、増殖能を制御することを見だし報告した (Oncogene 2016)。ncRNA の代表である miRNA は、Exosome を介して種々の生物学的特性を制御するが、Exosome 内には mRNA や DNA 断片、種々のタンパク質も含まれている。したがって、分泌型 T-UCR の解析は、新しい癌の分子病態の解明に大きく資することが期待される。一方、血液や体液中に存在する癌細胞由来の Exosome や DNA 断片を利用したリキッドバイオプシーは、患者に優しい高感度・高精度な診断法として注目されている。我々も T-UCR が Exosome 内に存在することを示唆する知見を得ている。しかしながら、Exosome 内に存在する T-UCR を標的としたリキッドバイオプシーへの応用研究は国内外で全く行われていない。

癌の発生・進展の分子機序の観点から見ると、種を超えて普遍的に保存されている T-UCR の機能を明らかにすることにより、miRNA 以外の非翻訳 RNA の役割の全貌解明へと発展する可能性がある。さらに広く言えば、生命現象を、ゲノム、エピゲノム、遺伝子、miRNA、T-UCR の総和で捉えなければならないという新しい原理への発展につながるものである。一方、治療面においても、T-UCR を標的とした革新的な癌治療への展開が大いに期待される。

2. 研究の目的

T-UCR から転写される非翻訳 RNA が Exosome 内にも存在することが示唆されており、体液を試料とした患者に優しいリキッドバイオプシーへの応用、治療への展開が期待される。本研究では、消化管癌・泌尿器癌に

おいて、癌由来 T-UCR を明らかにし、患者および健常対象者の血清ならびに尿検体での T-UCR の測定を行ない、臨床病理学的事項との関連を明らかにする。siRNA 等による機能解析、治療実験も行なう予定である。これらにより、T-UCR を標的とした消化管癌・泌尿器癌についてのリキッドバイオプシーという全く新しい切り口の診断法の開発につながり、治療への展開も期待される。得られる成果は当該癌に留まらず、癌の広い領域における T-UCR の理解とそれを応用した診断・治療開発にも大いに役立ち、波及効果は大きい。

3. 研究の方法

1) 消化管癌・泌尿器癌の癌組織および癌細胞培養上清中 Exosome 内の T-UCR の発現解析と特異的高発現 T-UCR の同定：特異的高発現 T-UCR の同定には、約 30 例の胃癌・前立腺癌と非癌部の新鮮凍結組織および胃癌細胞株 (TMK-1、MKN シリーズ、HSC シリーズ)、前立腺癌細胞株 (LNCAP、DU145、PC3) を用いる。Exosome からは total RNA を準備し、RNA Integrity number が 6.0 以上を使用する。これについて、上記で選定した特徴的に高発現を示す T-UCR の発現を定量的に解析する。解析対象は、胃癌・前立腺癌細胞株に加えて、代表的な食道癌・大腸癌・腎細胞癌・膀胱癌細胞株も含む。

2) 高発現 T-UCR-ncRNA についての生物学的機能解析と治療実験 (増殖、浸潤、薬剤感受性): 特徴的に高発現を示す T-UCR について、分子細胞生物学的な機能解析および siRNA を用いた in vitro 治療実験を行なう。上記の胃癌・前立腺癌細胞株を対象とし、機能解析としては、増殖能、浸潤能、遊走能等を解析する。治療感受性への影響を知るために、抗癌剤は 5-FU およびタキサン系を用い、培養液に添加後経時的に MTT アッセイで生存細胞を算出する。本検討で癌の生物学的態度を規定することが明らかとなった T-UCR に関して

は、代表的な食道癌・大腸癌・腎癌・膀胱癌細胞株についても同様の解析を行なう。必要に応じて、T-UCR の上流、下流の pathway 解析も行なう。

3) 消化管癌・泌尿器癌の血清および尿サンプルにおける T-UCR の測定

1)、2) の検討で同定された癌特異的高発現 T-UCR を対象とする。消化管癌(食道癌・胃癌・大腸癌)では血清サンプル、泌尿器癌(膀胱癌、前立腺癌、腎癌)では尿サンプルを用いる。サンプルサイズは 100 検体程度とする。T-UCR のレベルを Droplet digital PCR にて定量的に解析し、健常対照者から得られたサンプルで得られたレベルと比較する。

4) 体液中 T-UCR-ncRNA 測定値と臨床病理学的事項・治療情報との関連解析: 3) で得られた体液中 T-UCR-ncRNA 測定値と臨床病理学的事項および治療情報との関連を解析する。特に、早期診断の可能性、抗癌剤治療反応性(前立腺癌では去勢抵抗性) 予後との関連に注目する。

4. 研究成果

1) 前立腺癌の癌組織および癌細胞において特異的高発現する T-UCR- の同定と機能解析: 代表的な 26 種の T-UCR について、前立腺癌組織と非癌部前立腺を材料に定量的 RT-PCR によって発現を解析し、Uc.3+、Uc.4+、Uc.63+ が高発現することを見いだした。特に Uc.63+ は正常 14 臓器では低レベルであった。前立腺癌における Uc.63+ の発現は、高グリソンスコアおよび PSA 値と有意に相関していた。前立腺癌細胞株 PNCaP と DU145 を用いた生物学的解析で、Uc.63+ は細胞増殖ならびに細胞運動を制御することが分かった。Uc.63+ の発現は miR-130b によって制御され、MMP2 が下流の重要な標的であることを示した。

2) 前立腺癌患者血清中 Exosome 内の T-UCR の測定と治療感受性との関係: 前立腺癌細

胞株を用いた検討で、Uc.163+ は Androgen receptor と PSA の発現を制御し、docetaxel 抵抗性を惹起することを見いだした。さらに、droplet digital PCR によって血清中の Uc.63+ を測定したところ、特に、転移を有する症例、去勢抵抗性の症例(CRPC)、docetaxel 抵抗性の症例で有意に高値であった。転移を有する CRPC では、Uc.163+ 高値例が有意に予後不良であった。

3) 胃癌、腎細胞癌における T-UCR の発現と機能解析: Uc.63+ は胃癌において発現が亢進し、癌の進行と有意な相関を認めた。細胞株において、Uc.63+ を強制発現もしくはノックダウンすると、増殖能、遊走能が亢進、低下することを確認した。下流に関する Pathway 解析により、NF- κ B 経路の亢進を介することを見いだした。

Uc.416+A について腎細胞癌での発現を定量的 RT-PCR で検討し高発現を見いだした。細胞株を用いた実験で、Uc.416+A は細胞増殖・遊走を制御し、さらに miR-153 を介して上皮間葉転換に関与することを明らかにした。肉腫型腎細胞癌では Uc.416+A は通常型に比較して有意に高レベルであった。

4) 大腸癌オルガノイドを用いた癌幹細胞特異的 T-UCR の発現・機能解析: 代表的 61 種の T-UCR の qRT-PCR 解析において、大腸癌オルガノイドでは正常と比較し Uc.91+、Uc.182+、Uc.249+A、Uc.266+A の 4 つが高発現していた。これら大腸癌細胞株で強制発現させると、幹細胞マーカーである CD44 および LGR5 の発現が上昇した。5-FU、L-OHP、CRT-11 に対する感受性を評価したところ、Uc.249+A および Uc.266+A を高発現させた場合に抵抗性を示した。さらに、癌部における Uc.266+A の発現と N grade および Stage に有意な正の相関を認めた。

今後、これらの T-UCR について、前年度の血清中 Exosome 内の Uc.163+の測定と同様に解析を進め、リキッドバイオプシーのマーカーの可能性を検討する。

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 7 件)

1. Goto K, Honma R, Sakamoto N, Sentani K, Que N, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: Transcribed Ultra-conserved Regions in prostate and gastric cancer: DNA hypermethylation and microRNA-associated regulation. *Oncogene* 35: 3598-3606, 2016, 査読有 doi: 10.1038/onc.2015.445.
2. Honma R, Goto K, Sakamoto N, Sekino Y, Sentani K, Que N and Yasui W: Expression and function of Uc.160+, a transcribed ultra-conserved region, in gastric cancer. *Gastric Cancer* 20(6):960-969, 2017, 査読有 doi: 10.1007/s10120-017-0714-9.
3. Mukai S, Que N, Oshima T, Tatsumoto Y, Sakamoto N, Sentani N, Hinoi T, Ohdan H and Yasui W: Overexpression of transmembrane protein BST2, participating in cell growth, is associated with poor survival in patients with esophageal, gastric and colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 24(2):594-602, 2017, 査読有 doi: 10.1245/s10434-016-5100-z.
4. Hattori T, Sentani K, Que N, Sakamoto N and Yasui W: The clinicopathological significance of SPC18 in colorectal cancer: SPC18 participates in tumor progression. *Cancer Sci* 108(1):143-150, 2017, 査読有 doi: 10.1111/cas.13121.
5. Sekino Y, Sakamoto N, Goto K, Honma R, Shigematsu Y, Sentani K, Que N,

Teishima J, Matsubara A and Yasui W: Transcribed ultraconserved region Uc.63+ promotes resistance to docetaxel through regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Oncotarget* 8(55):94259-94270, 2017, 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.21688.

6. Mukai S, Que N, Oshima T, Imai T, Sekino Y, Honma R, Sakamoto N, Sentani K, Tanabe K, Yoshida K, Ohdan H and Yasui W: Overexpression of PCDHB9 promotes peritoneal metastasis and correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer. *J Pathol* 243:100-110, 2017, 査読有 doi: 10.1002/path.4931.

[学会発表](計 23 件)

1. Yasui W: Molecular pathological approach to develop novel cancer diagnostics and therapeutics. The 27th Annual Meeting of the Japanese Society of Oral Pathology, Special Lecture, Hiroshima (Japan), August 10-12, 2016
2. Yasui W: Cross-disciplinary approach to control gastric cancer in precision medicine. The 2016 Annual Congress of Korean Surgical Society, 20 years of Korean Gastric Cancer Association: Past, Present and Future, Seoul (Korea), November 3-5, 2016
3. Naito Y, Yashiro M, Hirakawa K, Kiyono T, Yasui W and Ochiya T: Functional analysis of extracellular vesicles in scirrhous type gastric cancer microenvironment. 2016 Annual Meeting of the International Society for Extracellular Vesicles. Rotterdam (Netherlands), May 4-7, 2016
4. Honma R, Goto K, Sekino Y, Sakamoto N, Sentani K, Que N and Yasui W: The transcribed-ultraconserved region

- Uc.160+ in gastric cancer. The 35th Sapporo International Cancer Symposium 2016. Sapporo (Japan), June 24-25, 2016
5. 後藤景介、本間りりの、坂本直也、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥：転写超保存領域 Uc.416+A の胃癌における生物学的機能解析．第 105 回日本病理学会総会、仙台、5 月 12-14 日、2016
 6. 本間りりの、後藤景介、坂本直也、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥：胃癌における転写超保存領域 T-UCR の DNA メチル化解析．第 105 回日本病理学会総会、仙台、5 月 12-14 日、2016
 7. 坂本直也、日比野佑美、後藤景介、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥：miR-148a は大腸癌の発がん・進展に寄与している．第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 6-8 日、2016
 8. 本間りりの、後藤景介、関野陽平、坂本直也、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥：転写超保存領域 Uc.160+の胃癌における発現・機能解析．第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 6-8 日、2016
 9. 内藤 寛、八代正和、清野 透、平川弘聖、勝田 毅、安井 弥、落谷孝広：スキルス胃癌微小環境における癌関連線維芽細胞由来細胞外小胞の機能解析．第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 6-8 日、2016
 10. Yasui W, Que N, Sentani K and Sakamoto N: The value and challenge of HER2 pathways in gastric cancer therapy. 12th International Gastric Cancer Congress, Symposium 2 “Systematic therapy towards personalization”, Beijin (China), April 20-23, 2017
 11. Que N: Novel Biomarkers of Gastric Cancer. 12th International Gastric Cancer Congress, LS10 “Biomarker”. (Moderator: Yasui W), Beijin (China), April 20-23, 2017
 12. Honma R, Goto K, Sekino Y, Sakamoto N, Sentani K, Que N and Yasui W: Uc.160+ expression and DNA methylation analysis in gastric cancer. 12th International Gastric Cancer Congress, Beijin (China), April 20-23, 2017
 13. Sekino Y, Sakamoto N, Goto K, Honma R, Shigematsu Y, Que N, Sentani K, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: Expression of the transcribed ultraconserved region Uc.63+ in prostate cancer. Annual meeting of American Association for Cancer Research 2017, Washington DC (USA), April 1-5, 2017
 14. Naito Y, Yashiro M, Hirakawa K, Kiyono T, Yasui W and Ochiya T: Functional roles of CaF-derived extracellular vesicles in scirrhous type gastric cancer. The 6th Annual Meeting of the International Society of Extracellular Vesicle 2017. Toronto (Canada), May 18-21, 2017
 15. Honma R, Goto K, Sakamoto N, Sekino Y, Sentani K, Que N, Yasui W: Biological Significance of Transcribed-ultraconserved Regions in Gastric Cancer. The 10th Kure International Medical Forum, Pathology Session., Kure, Hiroshima (Japan), July 13-15, 2017
 16. 安井 弥: Molecular pathology of gastric cancer in the past, present and future precision medicine. 第 89 回日本胃癌学会総会、会長講演 Presidential Lecture、3 月 8-10 日、広島、2017
 17. 本間りりの、後藤景介、関野陽平、坂本直也、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥：胃癌において Uc.160+はメチル化されている．第 89 回日本胃癌学会総会、広島、3 月 8-10 日、2017
 18. 安井 弥：がん分子病理の来し方・行く先 Molecular pathology of cancer in the past, present and future precision medicine．第 76 回日本癌学会学術総会、モーニングレクチャー、9 月 28-30 日、横浜、2017
 19. 関野陽平、坂本直也、後藤景介、本間り

- りの、重松慶紀、仙谷和弘、大上直秀、亭島 淳、松原昭郎、安井 弥：転写超保存領域Uc.63+はアンドロゲンレセプターを介してドセタキセル抵抗性に関与する。第76回日本癌学会学術総会、横浜、9月28-30日、2017
20. 本間りりの、坂本直也、石川 洸、深田佳穂、関野陽平、恵木浩之、大段秀樹、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥：大腸癌幹細胞特異的な転写超保存領域の同定。第76回日本癌学会学術総会、横浜、9月28-30日、2017
21. 深田佳穂、坂本直也、本間りりの、石川洸、関野陽平、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥：胃癌進展におけるUc.63+発現の生物学的、臨床病理学的重要性。第76回日本癌学会学術総会、横浜、9月28-30日、2017
22. 内藤 寛、山本雄介、吉岡祐亮、八代正和、清野 透、平川弘聖、柳原五吉、安井 弥、落谷孝広：スキルス胃癌微小環境における細胞外小胞の機能。第76回日本癌学会学術総会、横浜、9月28-30日、2017
23. 安井 弥：胃癌の病理 -現状と展望-。第55回日本癌治療学会学術集会、シンポジウム8「それぞれの癌：診断・治療の現状と展望-胃癌」、10月20-22日、横浜、2017
24. 本間りりの、坂本直也、石川 洸、深田佳穂、関野陽平、向井正一朗、仙谷和弘、大上直秀、恵木浩之、大段秀樹、安井 弥：大腸癌幹細胞におけるT-UCRの発現。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、熊本、11月17-18日、2017

〔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

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/byori1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 弥 (YASUI WATARU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授

研究者番号：40191118

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大上 直秀 (OUE NAOHIDE)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・准教授

研究者番号：60346484