

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16303

研究課題名(和文) 肝細胞癌と発生母地に着目したゲノムワイドなcircRNA探索

研究課題名(英文) Genome-wide identification and characterization of circular RNA in resected hepatocellular carcinoma and background liver tissue

研究代表者

高見 秀樹 (Takami, Hideki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40723028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はhigh-throughput sequencing (HTS)の手法を用い、肝細胞癌(HCC)で発現するバイオマーカーとして有望な7つのcircular RNA (circRNA)を抽出した。これらは非腫瘍部の肝組織と比較してHCCで発現が低下していた。233例のHCC症例においてPCRを用い、抽出した7つのRNAのうち、5つの発現がHCCで有意に低下していることを確認し、さらにそのうち3つの発現低下はHCCの予後と有意に関連していることが示された。背景の非腫瘍部においては肝炎ウイルスの種類や肝硬変の状況で抽出されたcircRNAの発現に有意差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Non-coding RNAの一種であるcircular RNA(circRNA)は、micro RNAを抑制的に制御したり、癌の発生に重要な役割を果たすさまざまな転写因子にも影響したりすることで、癌の発生進展に関わる。また、circRNAは直線状のlong non-coding RNA(lncRNA)と比較して安定した環状構造のため、血液中の癌関連バイオマーカーとしての応用が期待できる。本研究で抽出されたHCCにおいて有意な低下を示し、予後とも関連することが示されたcircRNAは根治術後のHCC患者の予後について有望なバイオマーカーとなり得る。

研究成果の概要(英文)：We found using high-throughput sequencing that seven candidate circular RNAs (circRNAs) were downregulated in HCC. The expression of these circRNA were examined by quantitative PCR in 233 sets of HCC and matched background normal liver tissues, and correlation between candidate circRNA expression and prognosis was evaluated. The results of quantitative PCR showed that expression of five circRNAs were significantly lower in HCC than background normal liver tissues. Kaplan-Meier analysis revealed that low expression of circRNAs hsa_circ_0001020, hsa_circ_0036683, and hsa_circ_0058087 was associated with poor recurrence free survival (RFS) and overall survival (OS) in HCC. Additionally, multivariate analysis revealed that low hsa_circ_0036683 expression was a significant independent prognostic factor for inferior RFS and OS. There was no significant association between the expression of these circRNAs and hepatitis B/C status or cirrhosis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 circular RNA non-coding RNA 予後因子 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの約 80%は RNA に転写されるものの、タンパク質に翻訳されるのはわずか 2%でしかなく、細胞内には翻訳されない RNA(non-coding RNA[ncRNA])が多数存在することがヒトゲノム解析で明らかとなった(1)。なかでも、近年非常に注目されている環状の circular RNA(circRNA)は、通常の本鎖 RNA と比較して安定した構造である。ncRNA のうち、20~25 塩基程度の micro RNA(miRNA)はその機能や多様な病態への関与が広く研究されている。一般的に、miRNA は標的となる遺伝子を不安定化させてタンパクの産生を抑制し、様々な遺伝子の転写後調節に関わる。circRNA はこの miRNA を吸着し(スポンジ効果)、その効果を抑制して遺伝子の転写後調節に関わると考えられている(2)。また、circRNA は他の ncRNA と同様に、転写因子や転写後調節因子として各種がんの発生や進展と関与することも報告されている(3)。しかしながら、HCC 発生における circRNA の機能や臨床的意義について検討した報告は極わずかである。

われわれは分子生物学的手法を用いた研究により、HCC 腫瘍部および背景肝から予後関連因子の抽出を行ってきた(4,5)。近年ではタンパク質をコードする遺伝子のみならず、non-coding RNA の一種である long non-coding RNA (lncRNA)の発現をマイクロアレイによる網羅的手法を用い、HCC の腫瘍部・非腫瘍部で比較することで、数種の lncRNA についても HCC の臨床病理学的特徴や、予後と関連していることを明らかとした(6)。

circRNA はこれまで研究がなされてきた miRNA を抑制的に制御し、さまざまな転写因子にも影響することが判明しつつあり、近年、非常に注目されている分野である。とはいえ、消化器癌発症における役割、臨床応用の可能性においては未知の部分が多い。本研究は、その重要性が認識されはじめた circRNA に着目し、high throughput sequencing による網羅的 circRNA 解析をもとに、HCC の臨床病理学的特徴に関連し、予後バイオマーカーとして有望な分子を抽出することを目的とした。

2. 研究の目的

circRNA は癌の発生に重要な役割を果たすさまざまな転写因子にも影響することが知られ、直線状の long non-coding RNA(lncRNA)と比較して安定した環状構造のため、血液中の癌関連バイオマーカーとしての応用も期待できる。また、HCC の特徴として、腫瘍そのものだけでなく発生母地の遺伝子異常の理解も重要であるため、本研究では HCC とその背景肝(非腫瘍部)における circRNA の発現、HCC の発症や進展との関連、予後への影響を検討し、バイオマーカーとして有望な circRNA を抽出することを目的とした。

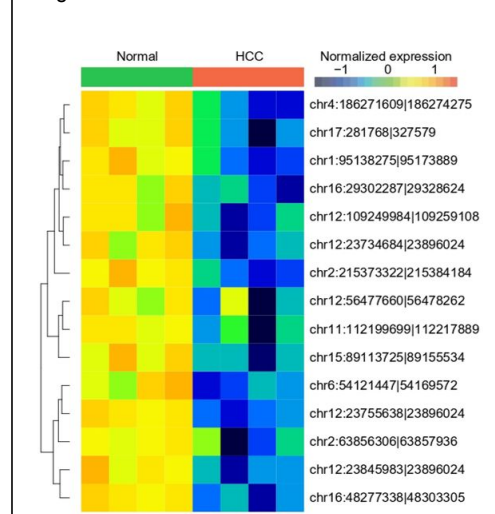
3. 研究の方法

- (1) HCC に対する手術治療を受けた 233 例の腫瘍部、非腫瘍部の新鮮凍結組織片を用いた。
- (2) High throughput sequencing を行うため、4 例の HCC 腫瘍部および非腫瘍部の 8 サンプルから total RNA を抽出した。サンプルのライブラリー調整を行った後、Illumina HiSeq X ten による網羅的 non-coding RNA 解析を行った。
- (3) CIRI を用い、circRNA の配列同定を行い、reference gene には hg38 を用いた。circBase に登録された配列に内包されるものは対応する circRNA ID を付与した。
- (4) HCC 腫瘍部・非腫瘍部における circRNA リード数を limma package (3.38.3) を用いて発現差異解析を行った。
- (5) high throughput sequencing の結果から得られた候補となる circRNA について、定量 PCR の手法を用いた検証を行った。
- (6) 臨床病理学的因子・予後と当該 circRNA の発現に関する解析を行った。
- (7) 統計学的解析には R version 3.5.3 (<http://www.r-project.org/>) を用い、 $P < 0.05$ (両側検定)を統計学的有意差の基準とした。

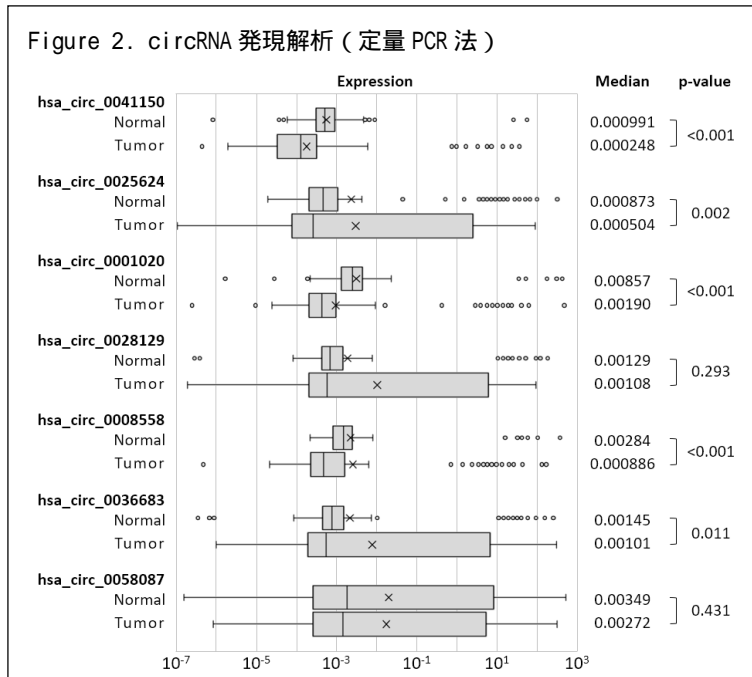
4. 研究成果

- (1) HTS の結果から 15 の circRNA が HCC の腫瘍部と非腫瘍部で異なる発現を示していた (Figure 1)。15 の circRNA のうち、8 circRNA が has_circ_ID をもち、さらに CircPrimer software を用いた定量 PCR 用のプライマー設計が可能であったものは以下の 7 つの circRNA であった：
hsa_circ_0041150、hsa_circ_0025624、hsa_circ_0001020、hsa_circ_0028129、hsa_circ_0008558、hsa_circ_0036683、hsa_circ_0058087。これらの発現は全て腫瘍部で非腫瘍部と比較して有意に低い発現量を示していた (absolute log₂ fold change > 2.0, $P < 0.05$, Student t-test)。

Figure 1. 網羅的 circRNA 発現解析

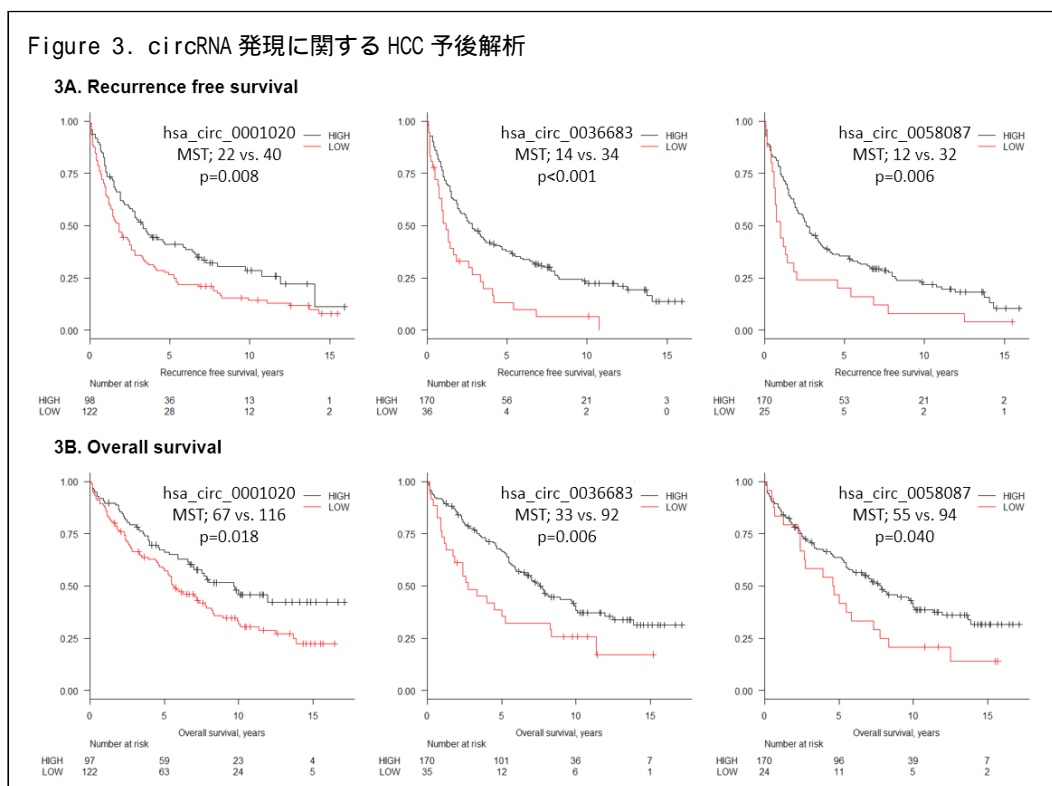


- (2) 233 例の腫瘍部・非腫瘍部について定量 PCR を用いた検証を行った (Figure 2)、7 つの circRNA のうち、hsa_circ_0041150、hsa_circ_0025624、hsa_circ_0001020、hsa_circ_0008558 および hsa_circ_0036683 は HTS の結果同様 HCC 腫瘍部で非腫瘍部と比較して有意に低い発現量を示した (それぞれ順に $p < 0.001$, $p = 0.002$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.011$)。
- (3) 背景肝のウイルスおよび肝硬変有無によって該当 circRNA の発現を比較したところ、



- hsa_circ_0025624 は HCV 肝炎で HBV 肝炎よりも低値を示した ($p = 0.047$)。また、hsa_circ_0008558 発現は HCV 肝炎で HBV あるいは HBV/HCV 非感染と比較して有意に低かった ($p = 0.012$, $p < 0.001$)。hsa_circ_0036683 は HCV 肝炎でウイルス非感染と比較して有意に低値を示した ($p = 0.042$)。HCC 腫瘍部の発現に関して hsa_circ_0041150 は HBV/HCV 非感染で HCV 肝炎より有意に低く ($p = 0.020$)、hsa_circ_0058087 は HBV/HCV 非感染で HBV/HCV 肝炎より有意に高かった ($p = 0.032$, $p = 0.017$)。HBV 肝炎では hsa_circ_0041150、hsa_circ_0001020 および、hsa_circ_0008558 は腫瘍部で非腫瘍部に対して有意に低い発現だった (全て $p < 0.001$)。一方、HCV 肝炎では hsa_circ_0041150、hsa_circ_0001020 および、hsa_circ_0008558 は腫瘍部で非腫瘍部よりも有意に低い発現を示した (全て $p < 0.001$)。HBV/HCV 非感染では hsa_circ_0041150、hsa_circ_0001020、hsa_circ_0008558 および、hsa_circ_0036683 が腫瘍部で非腫瘍部に比べて有意に低い発現を示した ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.010$)。
- (4) 肝硬変症例では非腫瘍部における hsa_circ_0001020、hsa_circ_0008558 および、hsa_circ_0036683 の発現が非肝硬変症例と比較して有意に低くなっていた ($p = 0.010$, $p < 0.001$, $p = 0.002$)。一方、HCC 腫瘍部における発現は肝硬変の有無と関連はなかった。肝硬変症例で hsa_circ_0041150、hsa_circ_0025624、hsa_circ_0001020 および、hsa_circ_0008558 は全て腫瘍部で非腫瘍部より有意に発現が低く (全て $p < 0.001$)、非肝硬変症例では hsa_circ_0041150、hsa_circ_0025624、hsa_circ_0001020、hsa_circ_0008558 および、hsa_circ_0036683 は腫瘍部で非腫瘍部と比較して有意に低い発現を示した ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.005$)。
- (5) 無再発生存 (RFS) および、全生存 (OS) に関する予後解析で、hsa_circ_0001020、hsa_circ_0036683 および、hsa_circ_0058087 の腫瘍部における低発現群の RFS は有意に不良だった (Figure 3; median survival time [MST] 22 vs. 40 months, $p = 0.008$; MST 14 vs. 34, $p < 0.001$; MST 12 vs. 32, $p = 0.006$)。さらに、hsa_circ_0001020、hsa_circ_0036683 および、hsa_circ_0058087 の腫瘍部における低発現群は有意に不良な OS を示した (Figure 3; MST 67 vs. 116; $p = 0.018$, MST 33 vs. 92; $p = 0.006$, MST 55 vs. 94; $p = 0.040$)。circRNA の発現で臨床病理学的因子を解析したところ、hsa_circ_0001020 は血清 alpha fetoprotein (AFP) 値 ($p = 0.003$)、hsa_circ_0036683 ($p = 0.006$) と hsa_circ_0001020 は腫瘍径 ($p = 0.004$)、hsa_circ_0001020 は門脈/静脈浸潤 ($p = 0.008$)、そして、hsa_circ_0001020 は病理学的ステージと有意に関連していることが示された ($p = 0.010$)。
- (6) 単変量による RFS の予後解析では、血清 albumin (< 3.5 g/dl)、ICG-R15 値 ($\geq 15\%$)、肝障害度 (B)、多発腫瘍 (multiple)、腫瘍径 (≥ 3.6 cm)、漿膜浸潤 (positive)、門脈/静脈浸潤 (positive)、病理学的ステージ (\geq III)、hsa_circ_0001020 発現 (low)、hsa_circ_0036683 発現 (low) および、hsa_circ_0058087 発現 (low) が不良な RFS の有意な予後因子であった。多変量解析では多発腫瘍、腫瘍径 (≥ 3.6 cm)、漿膜浸潤 (positive)、門脈/静脈浸潤 (positive)、病理学的ステージ (\geq III) および、hsa_circ_0036683 発現 (low) が独立した有意な RFS 予後因子として抽出された。
- (7) OS に関する多変量解析で、血清 albumin (< 3.5 g/dl)、ICG-R15 ($\geq 15\%$)、AFP (≥ 20 ng/dl)、肝障害度 (B)、多発腫瘍 (multiple)、腫瘍径 (≥ 3.6 cm)、腫瘍分化度 (poor)、増殖様式 (infiltrative)、腫瘍内隔壁形成 (negative)、漿膜浸潤 (positive)、門脈/静脈浸潤

(positive)、病理学的切除断端(positive)、病理学的ステージ(≥III)、hsa_circ_0001020 発現(low)、hsa_circ_0036683 発現(low)および、hsa_circ_0058087 発現(low)は全て有意な予後因子であった。多変量解析では腫瘍径(≥3.6cm)、漿膜浸潤(positive)、hsa_circ_0036683 発現(low)が独立した有意な予後因子として抽出された。



< 引用文献 >

1. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* (New York, NY). 2005;309(5740):1559-63. Epub 2005/09/06. doi: 10.1126/science.1112014. PubMed PMID: 16141072.
2. Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer research*. 2013;73(18):5609-12. Epub 2013/09/10. doi: 10.1158/0008-5472.can-13-1568. PubMed PMID: 24014594.
3. Zhao ZJ, Shen J. Circular RNA participates in the carcinogenesis and the malignant behavior of cancer. *RNA biology*. 2017;14(5):514-21. Epub 2015/12/10. doi: 10.1080/15476286.2015.1122162. PubMed PMID: 26649774; PubMed Central PMCID: PMC5449088.
4. Sonohara F, Nomoto S, Inokawa Y, Hishida M, Takano N, Kanda M, et al. High expression of Janus kinase 2 in background normal liver tissue of resected hepatocellular carcinoma is associated with worse prognosis. *Oncology reports*. 2015;33(2):767-73. Epub 2014/11/26. doi: 10.3892/or.2014.3621. PubMed PMID: 25420511.
5. Nomoto S, Hishida M, Inokawa Y, Takano N, Kanda M, Nishikawa Y, et al. Expression analysis of THOP1 in background liver, a prognostic predictive factor in hepatocellular carcinoma, extracted by multiarray analysis. *Annals of surgical oncology*. 2014;21 Suppl 3:S443-50. Epub 2014/03/08. doi: 10.1245/s10434-014-3581-1. PubMed PMID: 24604581.
6. Sonohara F, Inokawa Y, Hayashi M, Yamada S, Sugimoto H, Fujii T, et al. Prognostic Value of Long Non-Coding RNA HULC and MALAT1 Following the Curative Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Scientific reports*. 2017;7(1):16142. Epub 2017/11/25. doi: 10.1038/s41598-017-16260-1. PubMed PMID: 29170515; PubMed Central PMCID: PMC5700934.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山田 豪 (Yamada Suguru)		
研究協力者	砂川 祐輝 (Sunagawa Yuki)		
研究協力者	園原 史訓 (Sonohara Fuminori)		
研究協力者	小寺 泰弘 (Kodera Yasuhiro)		