

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03430

研究課題名(和文) 膵癌に高発現する新しい環状RNAの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of novel circular RNA in pancreatic cancer

研究代表者

大塚 基之(Otsuka, Motoyuki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90518945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：環状RNA(circRNA)は特定の条件下で発現するが、それらの包括的な発現状態の解析は限られていた。本研究では、環状RNAに特化したRNAシーケンシングを行い、ヒト膵腺癌(PDAC)組織で網羅的なcircRNA分析を行った。その結果、正常な膵臓組織と比較して、PDAC組織で発現が増えている40,000を超える新規の環状RNAを特定した。その中で、12番染色体上の非コードRNA遺伝子座に由来する新規環状RNAの全長配列を決定した。circPDAC-RNAという名前をつけたこの環状RNAは、正常なヒト細胞では発現していないものの、PDACを含む癌では高発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義としては、環状RNAに特化したシーケンスによって膵癌という病態時に発現する環状RNAを網羅的に同定できた点が挙げられる。さらにこの環状RNAの全長配列を同定し、非コードRNAエクソンがバックスプライシングで生成されることを明らかにした。さらにこの環状RNAの生物学的機能を解析した。これらの検討は、環状RNAの研究を進めるうえでの基本的な戦略を示したことになる。いっぽう社会的には、この環状RNAが膵癌の新規のバイオマーカーになる可能性があり、臨床的に役立つ可能性が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Circular RNAs (circRNAs) are single-stranded, covalently closed RNA molecules that are produced from pre-mRNAs. Although circRNAs are expressed under specific conditions, their comprehensive expression status is still unclear. Here, we performed a large-scale circRNA profiling analysis in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tissues. We identified more than 40,000 previously unknown circRNAs, some of which were upregulated in PDAC tissues, compared with normal pancreatic tissues. We determined the full-length sequence of a circRNA upregulated in PDAC, which was derived from two non-coding RNA loci on chromosome 12. The novel circRNA, named circPDAC RNA, was not expressed in normal human cells, but was expressed in PDAC and other carcinoma cells. The circPDAC RNA identified here might serve as a novel biomarker for cancers, including PDAC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵がん

1. 研究開始当初の背景

本邦では膵癌の罹患患者数が増加しており、化学療法や支持療法の進歩にも関わらず、現在も罹患患者数と死亡者数がほぼ同数で推移する難治癌の代表である。これは主に、早期発見が難しく、診断時にすでに高度進行状態で見つかることに起因する。このため、膵癌のハイリスク群の囲い込みと癌の早期発見を可能にする、高感度、かつ、低侵襲・低コストなバイオマーカーの同定が急務である。さらに、そのバイオマーカーが病態の発症機序と密接に関連しているものであれば、マーカーとして高い信頼性を持つだけでなく、その因子の生物学的な機能解析によって、疾患発症に介入する際の標的としても応用しうることが期待される。

本研究者は、膵癌およびその前癌病態で特異的かつ高発現している「HSATII (Human satellite II) と呼ばれるゲノムの反復領域から転写されるリピート RNA (反復配列 RNA) (HSATII RNA)」を、超高感度に確実に定量する方法を考案した。一般的に、現行のシーケンス手法では反復配列領域(リピート配列領域)はノイズとしてマスキングされ解析対象からはずされており注目されることは少ないが、反復配列 RNA、その中でも、HSATII RNA の発現は正常膵組織ではほとんど見られないのに対し、膵癌あるいは膵がん前癌病態では極めて高発現しており、特異性も極めて高い (Ting et al. Science 2015)。したがって、これを血中で検出することができれば、有力なバイオマーカーとなると想定された。しかしながら、反復配列 RNA の定量は、その反復性ゆえに従来の PCR 法による増幅が難しく簡便に定量することが困難であった。その点を克服するべく、本申請代表者らは HSATII RNA などの反復配列 RNA を超高感度に定量する独自の手法として TRAP 法 (Tandem Repeat Amplification by nuclease Protection 法) を開発し、droplet digital PCR (ddPCR) を組み合わせた絶対定量法によって、血液中を流れる癌由来の微量な HSATII RNA をも正確に検出できるようになり (Otsuka M et al. JCI Insight 2016)。現在 新規マーカーとしての有用性について多数検体で検証するに至っている。

さらに重要な点として、前癌病態から異常発現するこの反復配列 RNA が、DNA 修復に関わる細胞性因子である YB-1 蛋白との結合を介して、YB-1 蛋白の局在と機能を攪乱する結果、発現細胞内でのゲノム DNA 異常の蓄積およびミトコンドリア DNA 変異の蓄積を惹起することで細胞癌化のメカニズムの主原因になっている可能性も *in vitro* および *transgenic mouse* を用いた解析でみいだした (Otsuka M et al. Nat Commun. 2016)。このことは、前癌病態から異常発現している非コード RNA が、単に受動的に発現しているだけでなく、前癌病態の時点から内在性の変異原となっている可能性を示している。

このように、次世代シーケンスで得られたシーケンス情報を既存の汎用データベースにマッピングする現行のオーソドックスな手法では、上記の反復配列 RNA のような病態に特徴的で重要な現象を見逃してしまう可能性がある。そのようなもののもう一つの候補として、非コード RNA の一種である環状 RNA (circular RNA) が挙げられた。環状の RNA の存在自体は 1980 年代にすでに報告されているが、アーチファクトか異常な RNA スプライシングの名残、もしくは特殊な外来病原因子に限定されると考えられてきた (Jeck WR et al. Nat Biotech. 2014)。しかしながら、次世代シーケンスとパイオインフォマティクスの発展に伴って、従来想定されていたよりも遥かに多種多様な内因性の circular RNA が存在し、しかもそれらが機能を持っていることも明らかにされつつある (Hansen TB et al. Nature 2013)。

上記のような背景のもと、本研究では膵癌を対象として、「従来の解析手法では見過ごされていた膵癌特異的な環状 RNA が存在しないか?」「それらは機能的に癌化機構に関与していないか?」という点を大きな学術的な問いとして設定し検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景に関連して下記の具体的項目を段階的に検討し、癌特異的な新規 circular RNA の発現状態の解明と生物学的な機能の両者を新たに明らかにする。

- 1) 膵癌特異的に異常高発現している circular RNA の網羅的探索
- 2) Circular RNA の全長と発現様式の解明
- 3) 多数検体での発現状況の検討・マーカーとしての有用性
- 4) 異常高発現 circular RNA の生物学的機能の解明
- 5) Circular RNA に対する介入法の検討による 発癌予防法の検討

これらの検討を通じて、新規の発癌機構の解明とそこへの介入法の開発、および新規癌バイオマーカーの同定と有用性の検討、を行い、現状では難治である膵癌の予後改善に貢献することを目的とした。

本研究は 膵癌を対象に、従来の RNA シーケンスでは同定できなかった癌特異的な circular RNA を網羅的に同定したうえで、特に膵癌特異的に異常高発現しているものに関して全長構造と発現様式を明らかにし、その生物学的機能の解明と、マーカーとしての有用性を検討する。Circular RNA の存在は近年徐々に知られるようになり研究も進められて来ているが、多くは既知の circular RNA を定量 PCR や circular RNA 用アレイで発現量を検討するなど、既存

の情報を基にした研究にとどまっていることが多い。それに対して、本研究では、独自に circular RNA 特異的な次世代シーケンシングとデータベースマッピングからの環状化の推定によって、既知の circular RNA の探索にとどまらずに新規の網羅的な同定を進める。また、これまでに熟達してきた RNA 研究の手法を駆使して、新規に得られる circular RNA の全長配列、発現様式、発現機構、生物学的機能の同定も進めつつ、癌早期発見のためのバイオマーカーとしての有用性についてまでも明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 膵癌特異的に異常高発現している circular RNA の網羅的探索

ヒト膵癌組織由来 RNA と正常ヒト膵組織由来 RNA を用いて、直線状の RNA を特異的に分解し環状 RNA だけを残す RNase R 処理をした後に RNA シーケンシングに供する。さらに、これによって得られたシーケンス情報を reference genome シーケンスにマッピングする際にリードが交差してマッピングされるもののみを「環状」候補として同定し、そのうえで、膵癌組織由来と正常膵組織由来で発現差のあるものを抽出する。

(2) Circular RNA の全長と発現様式の解明

(1) で同定した膵癌組織で異常高発現している circular RNA 候補について、特に膵癌での発現が多いものについて、まず別組織由来 RNA を用いて発現差の再現性について検証する。検証のとれたもののうち発現差が大きく、かつ、正常組織には発現が無いものについて着目し全長の決定をする。

(3) 多数検体での発現状況・マーカーとして有用性

全長を決定し得た circular RNA について、junction 部分を含む Taqman probe を用いた droplet digital PCR により、各種癌細胞株、膵癌あるいは膵のう胞や膵炎といった各種患者血清での検出を試み、膵癌検出のための感度・特異度を検証する。この際、膵癌以外の細胞・組織についても発現様式を検討する。血清検体については既に倫理審査を通して検体収集中であり迅速に検討を進められる体制にある。環状 RNA は通常の RNA よりも安定であることから、この検討によって、特に血清からの検出によるバイオマーカーとしての有用性について確立する。また、junction 部分に probe を設計した RNA Scope を用いた高感度 in situ hybridization 法によって癌組織内での組織内局在・細胞内局在について検討する。

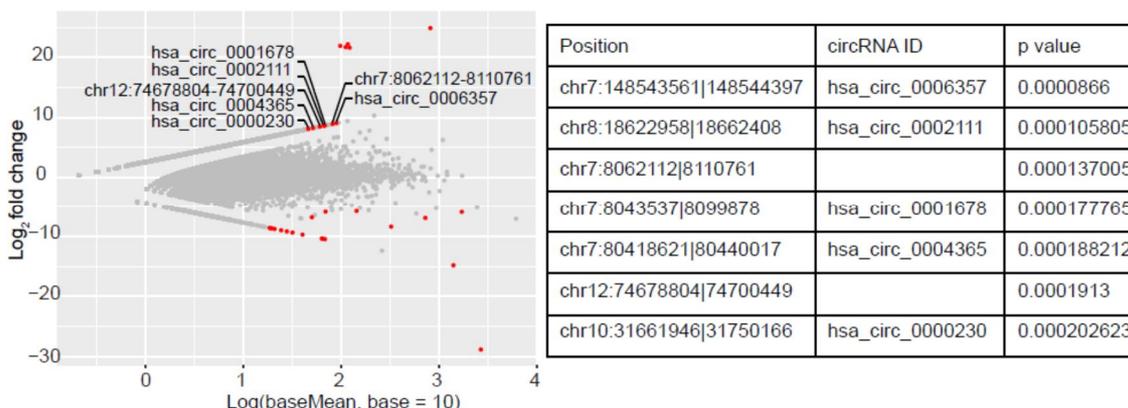
(4) 異常発現 circular RNA の生物学的機能の解明

Circular RNA 機能については、研究が先行している環状 RNA である cirs7 (CDR1-AS) が、microRNA-7 を吸着し decoy として働くことが生物学的機能として報告されている (Hansen TB et al. Nature 2013)。また、ある種の circular RNA については、そこからの翻訳によって機能性の peptide あるいは蛋白が rolling circle 増幅機構で産生されると報告されている (Panmudurti NR et al. Mo Cell. 2017)。そこで、本研究で同定する新規の circular RNA についても、他の非コードあるいはコード RNA, あるいは DNA との interaction がないか、蛋白翻訳の鋳型になるか、あるいは、他の細胞内蛋白との interaction がないか、RNA-IP (RIP) 法による counterpart の同定あるいは in vitro translation による蛋白産生を検討する。それぞれの結果をもとに、interaction の相手の機能を攪乱し、発癌に関与していないかについて検討する。

4. 研究成果

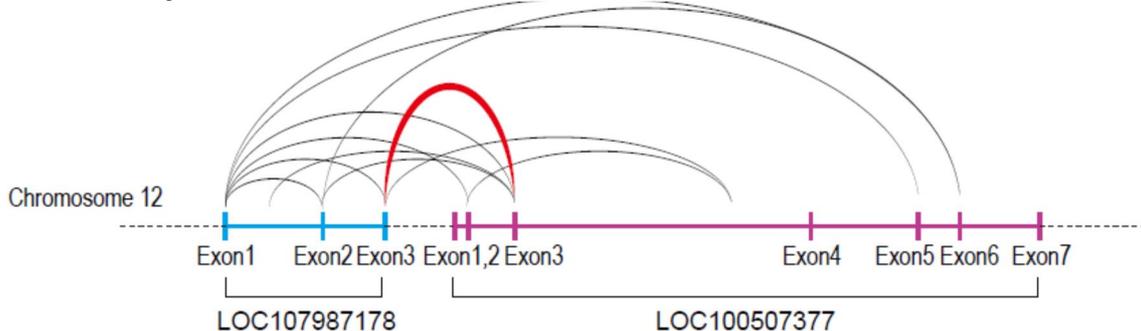
(1) 膵癌特異的に異常高発現している circular RNA の網羅的探索

正常膵 5 例と膵癌 5 例の組織由来の RNA を RNase R 処理した後の RNA 配列を平均で 70Mb 読み取った検討から、既存の circular RNA database (circBase) には無い 320 種の新規 circular RNA 候補を既に同定した (下図)。この中から正常組織では発現がなく、膵癌組織で発現が多いものについて着目し、全長決定へと進めていった。



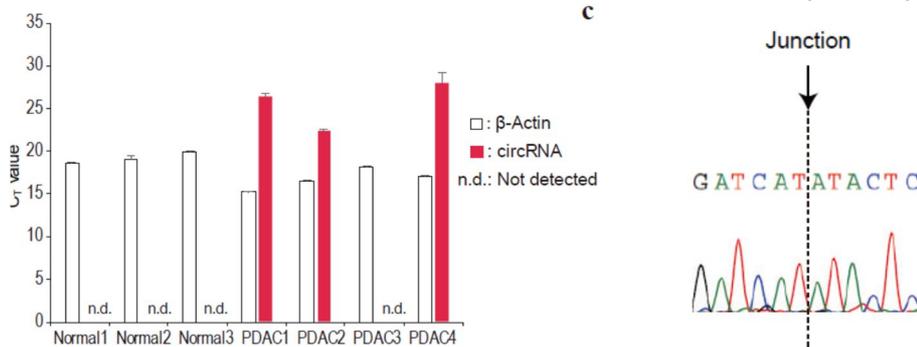
(2) Circular RNA の全長と発現様式の解明

膵癌組織で発現量の多い環状 RNA について、primer walking の手法を用いて全長の塩基配列を決定し、その結果に基づいて 発現様式を解明した。その結果、下記の図のように、染色体 12 番の non-coding RNA をコードする領域から環状 RNA が形成されることをみいだした。



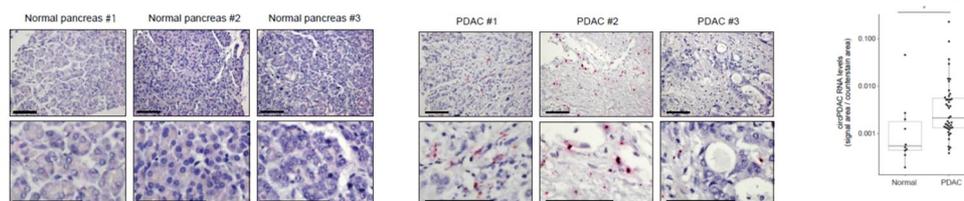
環状 RNA のジャンクション部分の配列を確認し、上記のような形成機構になっていることをついで確認した（下右図）。

さらに、新たな正常膵組織および膵癌組織由来の RNA を用いて、その発現量を検討したところ、この環状 RNA は膵癌組織に特異的に多く発現していることが確認された（下左図）。



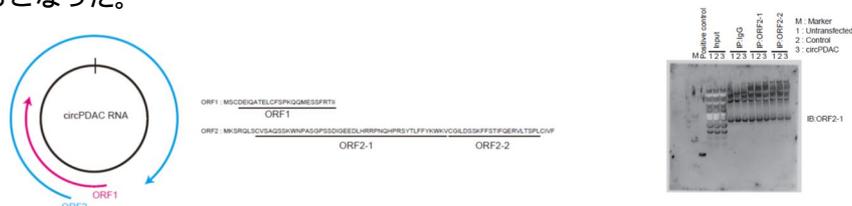
(3) 多数検体での発現状況・マーカーとして有用性

マーカーとしての有用性を検証するために、膵癌組織を用いた in situ hybridization を行った結果、下図のように、有意差をもって膵癌組織で多く発現を検出することが出来た。



(4) 異常発現 circular RNA の生物学的機能の解明

引き続き、この環状 RNA にある IRES 配列からペプチドが産生されないかどうか、機能的な解析をおこなった。



発現が想定されるペプチド配列を決定し 抗体を作成して、それを用いた blotting をおこなったが、該当するペプチドを検出することは出来ず、発現量が少なかったためかともペプチドの産生が無いのかは確定的なことは言えないものの少なくとも明確にペプチドが発現しているという証拠は得られなかった。

これらの検討の結果、膵癌組織で特異的に発現している環状 RNA は染色体 12 番にある long non-coding RNA の exon 同士が backsplicing によって形成され、膵癌の特異的なマーカーになることが示唆された。機能的な意義を持つかどうかはまだ不明であるが、少なくとも検出できる感度でのペプチドの産生は認められなかった。今後、新たな膵癌マーカーとして用いることができるかどうか、血中からの検出などを試みていく価値があるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Seimiya Takahiro, Otsuka Motoyuki, Iwata Takuma, Shibata Chikako, Tanaka Eri, Suzuki Tatsunori, Koike Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Emerging Roles of Exosomal Circular RNAs in Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 568366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.568366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Seimiya Takahiro, Otsuka Motoyuki, Iwata Takuma, Tanaka Eri, Sekiba Kazuma, Shibata Chikako, Moriyama Masaru, Nakagawa Ryo, Maruyama Reo, Koike Kazuhiko	4. 巻 66
2. 論文標題 Aberrant expression of a novel circular RNA in pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 181 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-020-00826-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishibashi Rei, Yoshida Shuntaro, Odawara Nariaki, Kishikawa Takahiro, Kondo Ryo, Nakada Ayako, Hakuta Ryunosuke, Takahara Naminatsu, Tanaka Eri, Sekiba Kazuma, Seimiya Takahiro, Ohnaga Takashi, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Detection of circulating colorectal cancer cells by a custom microfluid system before and after endoscopic metallic stent placement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 6397-6404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.11047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Eri, Miyakawa Yu, Kishikawa Takahiro, Seimiya Takahiro, Iwata Takuma, Funato Kazuyoshi, Odawara Nariaki, Sekiba Kazuma, Yamagami Mari, Suzuki Tatsunori, Ishibashi Rei, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Expression of circular RNA CDR1AS in colon cancer cells increases cell surface PD?L1 protein levels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1459-1466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2019.7244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Abberant expression of novel circular RNA in pancreatic cancer	発明者 Seimiya T, Otsuka M, Koiek K.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、40411141	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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 分 担 者	丸山 玲緒 (Maruyama Reo) (60607985)	公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんエピゲノムプロジェクト・プロジェクトリーダー (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------