

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510184

研究課題名（和文） オミックス解析によるマイクロRNAのがんにおける役割の解明

研究課題名（英文） OMICS ANALYSIS TO INVESTIGATE ROLES OF MICRORNAS IN CANCER

研究代表者

福岡 豊（FUKUOKA YUTAKA）

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学研究所・准教授

研究者番号：30242217

研究成果の概要（和文）：本補助事業では、マイクロRNA（miRNA）が近傍遺伝子の発現・転写制御にかかわっている可能性が高いと考え、原発性の肝細胞がんと周囲の非がん部において、miRNA 近傍の遺伝子の発現量を調べ、がん部と非がん部で miRNA 近傍の遺伝子の発現状態が異なることを見出した。さらに、両者の違いは距離が近いほど顕著であり、miRNA と近傍遺伝子の発現の相関係数が有意に異なることを示した。

研究成果の概要（英文）：To investigate the local effect of miRNA in cancer, we analyzed gene and miRNA expressions in hepatocellular carcinoma (HCC) and surrounding non-tumor tissues. We calculated the Pearson correlation coefficients between miRNAs neighboring genes and compared the coefficients in the tumor and non-tumor tissues. This analysis was repeated for intronic and intergenic miRNAs. Finally, the correlation coefficients between miRNAs and their target genes were compared in the tumor and non-tumor tissues. The results suggested that in HCC, more miRNAs correlated with neighboring genes positively and that the correlation coefficients between the intronic miRNAs and their host genes were higher in HCC. The correlation analysis between miRNAs and their targets suggested that there was no significant difference between the correlation coefficients in the tumor and non-tumor tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生体生命情報学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：システムゲノム、がん、マイクロRNA、遺伝子、発現、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロRNA（miRNA）は22塩基程度の non-coding RNA の一種であり、発生、分化、細胞増殖、アポトーシス、代謝パスウェイおよびシグナル伝達に関与していることが示唆されていた。一方、さまざまな生物種

において染色体上で近くにある遺伝子同士の発現パターンが類似していることが報告され、申請者らも多くの真核生物においてそのような現象が見られることを示した。この現象には、クロマチンリモデリング等が関与していると考えられるが、クロマチンリモ

リングと miRNA の関係も報告され始めていた。そこで、申請者らは線虫において miRNA の近傍の遺伝子の発現量を調べた結果、生殖細胞では miRNA 近傍の遺伝子の発現量が平均に比べて顕著に低くなっていることを見出した。これらの発現量の低い遺伝子の多くは miRNA のシードと相補な配列を含んでいることから、この現象はこれらの遺伝子が miRNA のターゲットになっていることにより説明できるものと考えられる。マウスにおいても同様な現象が確認された。

(2) 一方、がんにおける miRNA の役割が注目を集め、研究がさかんに行われるようになっていた。そのような中で、HeLa 細胞で 90 の miRNA をノックダウンすると細胞増殖とアポトーシスに影響が生じる、がんで異常な発現を示す miRNA が多く、50%以上の miRNA ががんに関連する部位近傍にある、乳がん・甲状腺がん・メラノーマにおいて 41 の miRNA がコピー数異常を示すことが報告されていた。しかし、miRNA と遺伝子の両方の発現を比較することにより、がんにおける miRNA の役割を考察した研究は存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞がんにおける遺伝子発現・臨床情報などのオミックス情報と miRNA の発現データを統合的に解析し、がん細胞において、miRNA が近傍の遺伝子の発現に与える影響を明らかにすることである。本研究では原発性肝細胞がん焦点を絞るが、肝細胞がんは早期診断が難しいこと、有効な腫瘍マーカーが少ないとの理由による。

3. 研究の方法

(1) 研究の初期段階では、研究分担者である田中と水島が構築している網羅的疾患分子病態データベースから、肝細胞がんにおける遺伝子発現データを取得し、周囲の非がん細胞と比較して miRNA 近傍の遺伝子発現が大きく変化しているサンプルを探索した。さらに原発性の肝細胞がんと周囲の非がん部において、miRNA 近傍の遺伝子の発現量を調べた。データは悪性度の異なる 12 人分であり、がん部周囲の非がん部は肝硬変または慢性肝炎の状態であった。解析では、それぞれの miRNA を中心に 10 kbp ~ 400 Mbp の幅のウィンドウを設定し、ウィンドウに含まれる遺伝子の平均発現レベルを計算した。その後、全ての miRNA についての結果を平均した。

(2) 次の段階では、検体数を 8 人分増やして 20 人分とするとともに、(1)で得られた現象

(がん部では miRNA 近傍の遺伝子の発現レベルがゲノム全体と異なるが、非がん部では全体と変わらない)の原因について考察した。具体的には、miRNA の発現変化と近傍の遺伝子の発現変化に相関があるのかどうかを検討した。また、遺伝子のイントロンに存在する intronic miRNA と遺伝子間の非コード領域に存在する intergenic miRNA に分けて、miRNA と近傍遺伝子の発現の相関係数を比較した。さらに miRNA とターゲット遺伝子の発現の相関をがん部と非がん部で比較した。その際、ターゲット予測プログラム miRanda を利用した。

4. 研究成果

(1) ウィンドウを用いた解析の結果、がん部と非がん部では miRNA 近傍の遺伝子の発現状態が顕著に異なることを見出された。がん部では、miRNA 近傍の遺伝子の発現レベルがゲノム全体と異なった。一方、非がん部では、miRNA 近傍の遺伝子の発現レベルとゲノム全体の発現レベルに大きな差はなかった(図 1)。この図において、横軸はウィンドウ幅(右にいくほど大きい)、縦軸は平均発現量で正規化した遺伝子発現レベルである。

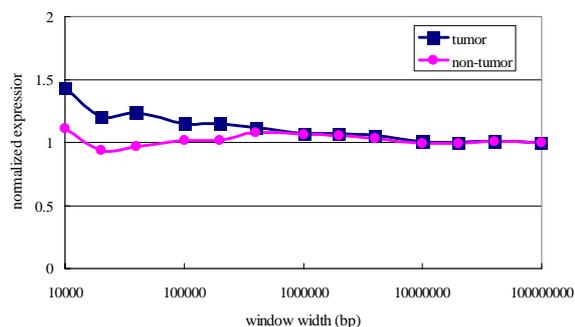


図 1 miRNA を中心としたウィンドウ内での遺伝子発現量

(2) 20 人分のサンプルで miRNA と遺伝子の発現を調べ、miRNA と近傍遺伝子の発現の相関を調べたところ、がん部と非がん部で有意に異なることを見出した。解析結果を表 1 に示す。がん部と非がん部の差はウィンドウ幅が小さくなるほど顕著になり、ウィンドウ幅が 20 Mbp 以下の場合、がん部で miRNA と近傍の遺伝子の発現が正の相関を示すケースが有意に多くなった。また、相関係数の差は intronic miRNA で顕著であることがわかった。また、miRNA のターゲット予測プログラムである miRanda によって予測されたターゲット遺伝子のうち、最もスコアの高いもの 1 つと miRNA の発現の相関係数を計算したところ、がん部と非がん部で有意な差があるとはいえなかった。これらの結果から、がん部においては、miRNA とターゲット遺

伝子との関係には変化がなく、intronic miRNA の発現に異常が生じている可能性が強く示唆された。

表 1 miRNA とウインドウ内遺伝子の発現量の相関係数

ウインドウ幅 (bp)	がん部相関係数	非がん部相関係数	p 値
10 k	-0.064	0.233	< 0.01
20 k	-0.037	0.185	< 0.01
40 k	-0.033	0.226	< 0.01
100 k	-0.010	0.160	< 0.01
200 k	0.015	0.178	< 0.01
400 k	0.023	0.174	< 0.01
1 M	0.021	0.171	< 0.01
2 M	0.008	0.146	< 0.01
4 M	0.008	0.110	< 0.01
10 M	-0.006	0.104	< 0.01
20 M	0.008	0.114	< 0.01
40 M	0.019	0.093	N.S.
100 M	0.013	0.066	N.S.
200 M	0.019	0.058	N.S.
400 M	0.017	0.050	N.S.

現在、がんと miRNA に関する研究が国内外で盛んに行われているが、多くはがん組織のみについて遺伝子や miRNA の発現解析を行っている。本研究では、全ての患者において、がん部と非がん部の両方について遺伝子と miRNA の網羅的な発現解析を同時に行い、詳細に比較した。その結果、intronic miRNA とその miRNA を含むイントロンを持つホスト遺伝子の発現の相関に変化が生じていることを見出した。本研究の最大の特色である、がん部と非がん部の比較によってはじめて得られる成果である。

これまで intronic miRNA はホスト遺伝子とともに発現すると考えられていた。しかし、近年、intronic miRNA の独自プロモーターが発見されるなど、その転写制御メカニズムが明らかになりつつある。本研究の成果は、このメカニズムに関する新たな事実を明らかにしたものである。

今後は、本研究の成果を肝細胞がんの診断や予後の予測に発展させるとともに、他のがんでも同様な現象が起きるのかを検討する。また、intronic miRNA とホスト遺伝子の発現の相関に変化が生じるメカニズムの解明を目指す。

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 15 件)

(1) 田中 博、福岡 豊 : 次世代オミックス

医学への展開、計測と制御、査読なし、49、537-542、2010 .

- (2) 高井貴子、福岡 豊、田中 博 : 臨床データの公的利用とトランスレーショナル研究、計測と制御、査読なし、49、553-557、2010 .
- (3) Shimokawa K, Mogushi K, Shoji S, Hiraishi A, Mizushima H, Tanaka H: iCOD : an integrated clinical omics database based on the systems-pathology view of disease, BMC Genomics, 査読有 ,11, Sup4, S19, 2010.
- (4) Nakahara I, Miyamoto M, Shibata T, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Mogushi K, Oda K, Ueno M, Takakura N, Mizushima H, Tanaka H, Ohta T: Up-regulation of PSF1 promotes the growth of breast cancer cells, Genes Cells, 査読有 , 15, 1015-1024, 2010.
- (5) Yoshida T, Kobayashi T, Itoda M, Muto T, Miyaguchi K, Mogushi K, Shoji S, Shimokawa K, Iida S, Uetake H, Ishikawa T, Sugihara K, Mizushima H, Tanaka H: Clinical omics analysis of colorectal cancer incorporating copy number aberrations and gene expression data, Cancer Inform, 査読有 , 29, 147-161, 2010.
- (6) Matsuyama T, Ishikawa T, Mogushi K, Yoshida T, Iida S, Uetake H, Mizushima H, Tanaka H, Sugihara K: MUC12 mRNA expression is an independent marker of prognosis in stage II and stage III colorectal cancer, Int J Cancer, 査読有 , 127, 2292-2299, 2010.
- (7) Brookes AJ, Lehtvaslaiho H, Muilu J, Shigemoto Y, Oroguchi T, Tomiki T, Mukaiyama A, Konagaya A, Kojima T, Inoue I, Kuroda M, Mizushima H, Thorisson GA, Dash D, Rajeevan H, Darlison MW, Woon M, Fredman D, Smith AV, Senger M, Naito K, Sugawara H: The phenotype and genotype experiment object model (PaGE-OM): a robust data structure for information related to DNA variation, Hum Mutat, 査読有 ,30, 968-977, 2009.
- (8) Yasen M, Mizushima H, Mogushi K, Obulhasim G, Miyaguchi K, Inoue K, Nakahara I, Ohta T, Aihara A, Tanaka S, Arii S, Tanaka H: Expression of Aurora B and alternative variant forms in hepatocellular carcinoma and adjacent tissue, Cancer Sci, 査読有 , 100, 472-480, 2009.

- (9) 小林こず恵、岸亜由美、田中真澄、稲岡秀検、根武谷吾、福岡豊、小林弘祐、野城真理：シリコン膜ひずみと膜接着細胞のひずみとの比較、生体医工学、査読有、47、464-469、2009。

〔学会発表〕(計 30 件)

- (1) 福岡豊：生命情報の統合的解析 ME と生命情報の架け橋をめざして、第 25 回生体・生理工学シンポジウム、岡山、2010。
- (2) 福岡豊、岩村泰輔、根本翔太、宮口 健、飯村 諭、内山孝憲、稲岡秀検、Mahmut Y、水島 洋、田中真二、有井滋樹、野城真理、田中博、Kohane IS：肝細胞がんにおける microRNA 発現量と近傍遺伝子発現量の相関解析、BMB2010、神戸、2010。
- (3) Fukuoka Y, Inaoka H, Noshiro M: Adaptive Threshold for detecting differentially expressed genes in microarray data - a simulation study to investigate its performance, The 32nd International IEEE EMBS Conference, Buenos Aires, 2010.
- (4) Inaoka H, Fukuoka Y, Noshiro M: Genome-wide DNA methylation analysis in tumor and normal tissues from lung squamous cell carcinoma and serous cystadenocarcinoma, IEEE International Conference on Bioinformatics & Biomedicine, Hong Kong, 2010.
- (5) Suzuki S, Takai-Igarashi T, Fukuoka Y, Tanaka H, Fusaro V, Pivovarov R, Tonellato PJ: Clinical gene network analysis on inflammatory bowel disease, International Omics Symposium, Yokoyama, 2010.
- (6) 岩村泰輔、福岡豊、内山孝憲、稲岡秀検、Mahmut Y、水島 洋、田中真二、有井滋樹、野城真理、田中博、Kohane IS：肝細胞がんにおける microRNA 発現量と近傍遺伝子発現量の関係、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009。
- (7) 稲岡秀検、福岡豊、野城真理：大規模がん発現データにおける共発現解析、第 48 回日本生体医工学会大会、東京、2009。
- (8) Kobayashi K, Tanaka M, Inaoka H, Nebuya S, Fukuoka Y, Kobayashi H, Noshiro M: Cytokine productions and gene expressions caused by mechanical stretching of normal human pulmonary artery endothelial cells, The 20th International Conference on Genome Informatics, Yokohama, 2009.

- (9) 福岡豊、稲岡秀検、岩村泰輔、Mahmut Y、水島 洋、田中真二、有井滋樹、内山孝憲、野城真理、田中博、Kohane IS：肝細胞がんにおける microRNA と近傍の遺伝子の発現の関係、BMB2008、神戸、2008。

- (10) 稲岡秀検、福岡豊、野城真理：適応閾値による遺伝子発現解析、第 23 回生体・生理工学シンポジウム、名古屋、2008。

- (11) Fukuoka Y, Inaoka H, Noshiro M: Adaptive threshold to detect biologically meaningful changes in microarray data, 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 5708-5711, Vancouver, 2008.

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 田中 博：創薬に向けた生命情報の統合、遺伝子医学 MOOK14 次世代創薬テクノロジー実践：インシリコ創薬の最前線、第 3 章、2009。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福岡 豊 (FUKUOKA YUTAKA)

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学
研究部・准教授

研究者番号：30242217

(2) 研究分担者

水島 洋 (MIZUSHIMA HIROSHI)

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学
研究部・特任教授

研究者番号：50219630

田中 博 (TANAKA HIROSHI)

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学
研究部・教授

研究者番号：60155158

(3) 連携研究者

稲岡 秀検 (INAOKA HIDENORI)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：30282768