

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659163

研究課題名(和文) ncRNAをコードする超保存領域T-UCRを標的とする消化管癌の診断・治療展開

研究課題名(英文) analysis of non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions in digestive tract cancer and its diagnostic and therapeutic application

研究代表者

安井 弥 (Yasui, Wataru)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：40191118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：非翻訳RNA(ncRNA)をコードする超保存領域(transcribed-ultraconserved regions: T-UCRs)の消化管癌における解析の結果、胃癌ではUCR416+A, 420+Aの発現が亢進し、118+A, 158+Aなど多くのUCRの発現は低下していた。発現低下はメチル化によることを確認した。また、胃癌ではmiR-148aおよびmiR-143/-145が、癌の浸潤と形態形成に関与し、予後因子となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Transcribed ultraconserved region (T-UCR) transcripts are a novel class of long non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions (UCRs). The expression analysis of T-UCR in digestive tract cancers demonstrated that, in gastric cancer, most of T-UCRs including UCR118+A and 158+A were down-regulated by methylation, whereas UCR416+A and 420+A were overexpressed. Down-regulation of miR-148 and miR-143/-145 participated in cancer invasion and morphogenesis with interaction with stromal cells and served as prognostic factor of gastric cancer patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：ncRNA 超保存領域(T-UCR) 消化管癌 診断・治療展開 発現制御 メチル化

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムには少なくとも 481 個の ncRNA をコードする超保存領域 (transcribed-ultraconserved regions: T-UCRs) が存在し, uc. 159, uc. 73 等の特定の T-UCR の発現異常がいくつかの癌で見出され, 新しい診断・治療標的の可能性として注目されているが, 研究は創成期にある。発現におけるエピジェネティクスや micorRNA(miRNA) の関与が指摘されているが, 現在までの知見は限局的であり, 食道癌, 胃癌では全く検討されておらず, 治療への応用を目指した研究は国内外で全くない。

特定の T-UCR は miRNA の直接の相互作用により転写が調節され, また, メチル化によってもサイレンシングを受けることが見出された。断片的であるが, 大腸癌細胞株では uc. 73A のノックダウンにより増殖の抑制, アポトーシスの誘導が見られたことから, ある種の T-UCR は癌遺伝子として働くことが想定されている。一方, 癌における miRNA の発現異常や癌・間質相互作用, 増殖・浸潤, EMT, 癌幹細胞における役割については精力的な研究が広くなされており, 多くの知見が蓄積されてきている。さらに, exosomal miRNA や Ago2 結合型非小胞性 miRNA (いわゆる分泌型 miRNA) があたかもパラクリン増殖因子/サイトカインのように機能し, 血清診断や治療の標的ともなり得ることからその実践応用が注目を集めている。

2. 研究の目的

本研究では, 日本, 中国, 韓国等の東アジアに高頻度に発生する食道扁平上皮癌と胃癌において, T-UCR の発現を網羅的に解析し, 特徴的な発現を示す T-UCR については生物学的機能解析を行なうとともに, シークエンスによる変異解析を行なう。同時に miRNA の発現解析と T-UCR との相関から制御に関わる miRNA を同定し, 転写活性に及ぼす影響を明らかにする。同定された特徴的な T-UCR, miRNA については, 臨床病理学的事項との関連, 診断系の確立, siRNA 等による治療実験を行なう。これらにより, 食道癌, 胃癌の発生・進展における T-UCRs の役割を明らかにし, T-UCRs という全く新しい切り口の診断・治療への展開を図ることが目的である。当該癌に留まらず, 癌の広い領域における T-UCRs の理解にも大いに役立ち, 波及効果は大きい。

3. 研究の方法

消化管癌における T-UCRs の発現解析と特徴的 T-UCR の同定: 胃癌および食道扁平上皮癌と食道, 胃の正常粘膜の新鮮凍結組織ならびに胃癌細胞株・食道癌細胞株を用いる。T-UCRs は T-UCR real time PCR アッセイにて発現を定量的に解析する。癌組織, 癌細胞株および正常粘膜組織から得られた T-UCRs プロファイルを比較し, 胃癌, 食道癌のそれぞれに特徴的な発現を示す T-UCR を抽出する。

これらに関して, 改めて定量的 PCR にて多数の臨床症例 (100 例程度を目安) における発現を検証する。同様のサンプルについて miRNA マイクロアレイで網羅的に解析し, T-UCR の発現と関連する miRNA を同定する。

特徴的 T-UCR についての生物学的機能解析: 特徴的な発現を示す T-UCR について, 分子細胞生物学的な機能解析を行ない癌細胞の特性を規定するものかどうかを検討する。上記の胃癌・食道癌細胞株を対象として, 強制発現系あるいは RNA 干渉系を用い, 機能解析としては, MTT アッセイ, invasion アッセイ, migration アッセイを行なう。

特徴的 T-UCR, miRNA と臨床病理学的事項との関連解析: ここまでで同定された特徴的 T-UCR および miRNA に関しては, in situ hybridization で食道癌, 胃癌組織における発現と局在を検討する。組織アレイによって多数の臨床検体における発現を解析し, 癌の臨床病理学的事項や予後等との関連を検討する。

上記を総合して, T-UCRs の発現プロファイルあるいは特定の T-UCR による悪性度診断, 治療効果予測診断の可能性を検証する。発現減弱している T-UCR は癌抑制因子の可能性があり, その発現を制御する miRNA を胃癌患者, 食道癌患者血液サンプルで測定し, miRNA 血清診断の可能性を検討する。

4. 研究成果

1) 消化管癌における T-UCR の発現とメチル化による制御

ヒトゲノムに少なくとも 481 個存在する T-UCR の内, 脱メチル化剤によって発現の回復が知られている UCR160, UCR283, UCR346 に注目した。9 株の胃癌細胞株と正常胃粘膜組織において T-UCR の発現を定量的 RT-PCR で検討したところ, 特に, UCR346 の発現が, 6 株 (67%) において正常組織に比べて発現が明瞭に低下していることが分かった。組織型との関連はなかった。中でも著しく発現の低下していた TMK-1 細胞では, 脱メチル化剤 5-Aza-dC 処理においてある濃度で発現の亢進が認められた。

さらに, 代表的な 28 種類 (UCR1, 73, 118+A, 158+A, 181+A, 184, 234+A, 241+A, 244, 249, 252+A, 261, 282, 291+1, 317, 327, 345, 346, 349, 359, 366, 385, 389, 390, 416+A, 420+A, 427+A, 454+A) の UCR について, 胃癌細胞株 (MKN-45, MKN-74, HSC-57) と正常胃粘膜組織における発現を定量的 RT-PCR で検討した。胃癌では 416+A, 420+A の発現が亢進し, 118+A, 158+A など多くの UCR の発現は低下していた。416+A の発現上昇は, 胃癌臨床検体でも確認された。一方, 胃癌細胞株を 5-Aza-dC で処理したところ, 118+A, 158+A, 251, 291+1 の 4 つの領域で, 濃度依存性の発現回復を認めた。158+A の上流に CG リッチな領域が存在していることが確認できたので, バイサルファイトシークエンスによる詳細

なメチル化解析を行った結果、胃癌細胞では高率にメチル化されており、正常胃組織ではメチル化頻度は低かった。胃癌組織における158+Aの発現を同一症例の腫瘍部と非腫瘍部で比較したところ、多くの症例で腫瘍部で発現が低かった。これらUCRの発現と臨床病理学的事項や治療効果の情報との比較解析から、T-UCRsの発現プロファイルによる悪性度診断、治療効果予測診断の可能性が示唆された。

2) 消化管癌に特徴的な microRNA の発現と機能解析

microRNA マイクロアレイ解析から抽出した胃癌で発現低下している miR-148a は、転写・翻訳の両面で MMP7 の発現を制御し、癌の浸潤、悪性度と関わることを示した。低分化腺癌組織で発現が亢進している miR-143/-145 は、主に間質線維芽細胞から産生され、癌の浸潤と形態形成に関与し、予後因子となることを明らかにした。

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 16 件)

下記論文はすべて査読有

1. Oue N, Naito Y, Hayashi T, Takigahira M, Kawano-Nagatsuma A, Sentani K, Sakamoto N, Oo HZ, Uraoka N, Yanagihara K, Ochiai A, Sasaki H and Yasui W: Signal peptidase complex 18, encoded by SEC11A, contributes to progression via TGF- α secretion in gastric cancer. *Oncogene* (in press)
2. Sentani K, Matsuda M, Oue N, Uraoka N, Naito Y, Sakamoto N and Yasui W: Clinicopathological significance of MMP-7, laminin γ 2 and EGFR at the invasive front of gastric carcinoma. *Gastric Cancer* (in press)
3. Oue N, Anami K, Schetter AJ, Moehler M, Okayama H, Khan MA, Bowman ED, Mueller A, Schad A, Shimomura M, Hinoi T, Aoyagi K, Sasaki H, Okajima M, Ohdan H, Galle PR, Yasui W and Harris CC: High miR-21 expression from FFPE tissues is associated with poor survival and response to adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Int J Cancer* 134:1926-1934, 2014
4. Naito Y, Sakamoto N, Oue N, Yashiro M, Sentani K, Yanagihara K, Hirakawa K and Yasui W: MicroRNA-143 regulates collagen type III expression in stromal fibroblasts of scirrhous type gastric cancer. *Cancer Sci* 105:228-235, 2014
5. Sakamoto N, Naito Y, Oue N, Sentani K, Uraoka N, Oo HZ, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W: MiR-148a is down-regulated in gastric cancer, targets MMP7 and indicates tumor invasiveness and poor prognosis. *Cancer Sci* 105:236-243, 2014
6. Uraoka N, Oue N, Sakamoto N, Sentani K, Oo HZ, Naito Y, Noguchi T and Yasui W: NR1, which encodes nardilysin protein, promotes esophageal cancer cell invasion through induction of MMP2 and MMP3 expression. *Cancer Sci* 105:134-140, 2014
7. Oo HZ, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oshima T, Yanagihara K, Oue N and Yasui W: Identification of novel transmembrane proteins in scirrhous type gastric cancer by Escherichia coli ampicillin trap (CAST) method: TM9SF3 participates in tumor invasion and serves as a prognostic factor. *Pathobiology* 81:138-148, 2014
8. Onoyama M, Kitadai Y, Tanaka Y, Yuge R, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: Combining molecular targeted drugs to inhibit both cancer cells and activated stromal cells in gastric cancer. *Neoplasia* 15:1391-1399, 2013
9. Taga M, Eguchi H, Shinohara T, Takahashi K, Ito R, Yasui W, Nakachi K, Kusunoki Y and Hamatani K: Improved PCR amplification for molecular analysis using DNA from long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded lung cancer tissue specimens. *Int J Clin Exp Pathol* 6:76-79, 2013
10. Mori R, Yoshida K, Tanahashi T, Yawata K, Kato J, Okumura N, Tsutani Y, Okada M, Oue N and Yasui W: Decreased FANCD1 caused by 5FU contributes to the increased sensitivity to oxaliplatin in gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 16:345-354, 2013
11. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Onoyama M, Ohnishi M, Ohara E, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: Stroma-directed imatinib therapy impairs the tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an orthotopic transplantation model of colon cancer. *Int J Cancer* 132:813-823, 2013
12. Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, Yamazaki Y, Watanabe S, Suzuki K, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Rakugi H, Isaka Y and Tsukita S: Deficiency of claudin-18 causes paracellular H⁺ leakage, up-regulation of

- interleukin-1beta, and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology* 142:292-304, 2012
13. Sentani K, Oue N, Naito Y, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Uraoka N, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W: Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with the intestinal mucin phenotype: Reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis* 33:1081-1088, 2012
 14. Oue N, Noguchi T, Anami K, Kitano S, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Aoyagi K, Yoshida T, Sasaki H and Yasui W: Cytokeratin 7 is a predictive marker for survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 19:1902-1910, 2012
 15. Sakamoto N, Oue N, Sentani K, Anami K, Uraoka N, Oo HZ, Naito Y, Hinoi T, Ohdan H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W: Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer. *Cancer Sci* 103:1744-1750, 2012
 16. Naito Y, Oue N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki H and Yasui W: Reg IV is a direct target of intestinal transcription factor CDX2 in gastric cancer. *PLoS One* 2012;7(11):e47545

[学会発表] (計 16 件)

1. Yasui W, Oue N, Anami K, Oo HZ and Sentani K: Novel biomarkers and therapeutic targets of gastric cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Gastric Cancer Research "From Basic Science to Therapeutics". Urayasu, Chiba (Japan), December 16-18, 2013
2. Sakamoto N, Naito Y, Oue N, Sentani K, Uraoka N, Oo HZ, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W: miR-148a, down-regulated in gastric cancer, targets MMP7 and participates in tumor invasion and poor prognosis. 10th International Gastric Cancer Congress, Verona (Italy), June 19-22, 2013
3. Yasui W: HP and carcinogenesis -Pathogenesis and novel diagnostic and therapeutic targets. 10th International Gastric Cancer Congress, **Symposium 2** "HP and Carcinogenesis", Verona (Italy), June 19-22, 2013
4. Yasui W: Novel Biomarkers and therapeutic targets of scirrhus type stomach cancer. Commemorative Symposium for the 2nd anniversary of SNUCH (Seoul National University Cancer Hospital), **Special Lecture**, Seoul (Korea), April 12-13, 2013
5. 内藤 寛, 坂本直也, 浦岡直礼, 仙谷和弘, 大上直秀, 八代正和, 平川弘聖, 安井 弥: スキルス胃癌形態形成における miR-143 の役割と腫瘍マーカーとしての有用性. 第 72 回日本癌学会学術総会, 10 月 3-5 日, 横浜, 2013
6. 内藤 寛, 坂本直也, 安野恭平, 浦岡直礼, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: microRNA-143 のスキルス胃癌における機能と腫瘍マーカーとしての有用性. 第 102 回日本病理学会総会, 6 月 6-8 日, 札幌, 2013
7. 安井 弥: 胃癌の分子・遺伝子を標的とした診断. 第 85 回日本胃癌学会総会, 2 月 27 日-3 月 1 日, 大阪, 2013
8. 安井 弥, Htoo Zarni Oo, 坂本直也, 大上直秀: スキルス胃癌の病態と臨床応用-bench to bedside- : スキルス胃癌の分子病理と治療標的. 第 85 回日本胃癌学会総会, シンポジウム 2, 2 月 27 日-3 月 1 日, 大阪, 2013
9. Yasui W: Molecular targets for diagnosis and therapeutics of gastric cancer - Present and future. The 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Busan (Korea), November 30-December 1, 2012
10. Oue N, Sakamoto N, Naito Y, Sentani K, Harris CC and Yasui W: Alteration of microRNA expression in gastrointestinal cancer. The 22nd Hiroshima Cancer Seminar and the 4th Japanese Association for RNA interference Joint International Symposium "MicroRNAs in cancer", Hiroshima (Japan), August 30, 2012
11. Yasui W: Molecular pathology of gastric cancer - microRNA and novel diagnostic & therapeutic targets. The 96th Annual Meeting of the German Society of Pathology, English Session, Lecture, Berlin (Germany), May 31-June 3, 2012
12. 内藤 寛, 坂本直也, 浦岡直礼, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: スキルス胃癌における microRNA-143 の機能の解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 12 月 11-14 日, 福岡, 2012
13. 坂本直也, 内藤 寛, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: 胃癌で発現が低下している miR-148a は MMP7 を標的とし, 浸潤に関与する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 9 月 19-21 日, 札幌, 2012
14. 安井 弥: 胃癌研究のマイルストーンと今後の展望 Milestone and future of

gastric cancer research. 第71回日本
癌学会学術総会, 9月19-21日, 札幌,
2012

15. 安井 弥: 消化管がんの新規診断・治療
開発に向けた分子病理学的アプローチ.
第21回日本がん転移学会学術集会・総
会, 7月12-13日, 広島, 2012
16. 安井 弥, 仙谷和弘, 坂本直也, 大上直
秀: 統括病理学の現状と展望: 消化管が
んの発生と制御・形態の理解における統
括病理学. 第101回日本病理学会総会,
4月26-28日, 東京, 2012

[図書] (計 1 件)

Yasui W, Oue N, Sentani K and Tan DF:
Chapter 29: Molecular diagnostics of
esophageal and gastric cancers. In:
Principle of molecular diagnostics and
personalized cancer medicine, ed. By
Dongfeng Tan and Henry Lynch, Lippincott
Williams & Wilkins, Philadelphia,
pp356-367, 2013

[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/byoril/>

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院・教
授
研究者番号: 40191118

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(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院・准
教授
研究者番号: 60346484