

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680092

研究課題名(和文)大腸癌の発癌や進展に深く関与しうる長鎖ncRNAの量的・質的な異常の探索

研究課題名(英文)Identification of long non-coding RNAs critically involved in colon cancer

研究代表者

丸山 玲緒 (Maruyama, Reo)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60607985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は内視鏡によって得られる臨床検体を分子レベルで統合的・包括的に解析することにより、大腸癌において重要な役割を果たす長鎖ncRNAの量的・質的な異常を同定することを目的とした。これまでに20検体以上のヒストン修飾に関するChIPSeqデータを収集し、さらに公共データベースが提供するオミックスデータを用いて統合解析を行い、大腸癌において普遍的にDNAメチル化により不活性化している長鎖ncRNAや、癌で高発現しており発癌に関与しうる長鎖ncRNAを同定できた。また多数の臨床検体でのメチル化や発現状態の確認、さらに癌細胞株を用いた実験により、それら長鎖ncRNAが細胞に及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：There is growing evidence that long non-coding RNAs (lncRNAs) play important roles in a wide repertoire of biological processes. It is very likely that lncRNAs also play critical roles in colorectal cancer (CRC). However, few studies have reported the involvement of lncRNAs in CRC. In this study, we aimed to comprehensively identify novel lncRNAs involved in CRC. To search for novel lncRNAs, we used ChIP-seq technology to obtain histone methylation profiles in endoscopic biopsy specimens. We characterized global histone modification profiles in more than 20 normal tissues and cancers. We then examined histone status around putative lncRNAs and generated a list of candidate lncRNAs. In order to narrow the list down, we also utilized publicly available DNA methylation data as well as RNA-seq to perform integrated analysis. Finally we identified ~10 lncRNAs silenced by DNA methylation and also identified ~10 lncRNAs that are abnormally overexpressed in CRC.

研究分野：分子生物学

キーワード：lncRNA

1. 研究開始当初の背景

mRNA と類似の構造を取りながらも、タンパク質に翻訳されることのない長鎖 non-coding RNA (ncRNA) が細胞・生命活動において重要な役割を担っている可能性があることが、ここ数年で明らかになってきた。長鎖 ncRNA の一つである HOTAIR の過剰発現は乳癌における明らかな独立した予後不良因子であることが報告されたが (Gupta, Nature, 2010)、その HOTAIR が複数のクロマチン調節蛋白と結合し、あたかも転写調節因子のように標的となる遺伝子領域をエピジェネティックに制御していることが明らかとなった (Tsai, Science, 2010)。マウス ES 細胞における機能的スクリーニングにおいても同様の機能を持つ長鎖 ncRNA が多数同定され、これらは Nanog や Sox2 等の転写因子と同程度に重要な役割を担っていることが示された (Guttman, Nature, 2011)。

これらの知見を総合すると、癌においても長鎖 ncRNA の一部は古典的 mRNA と同等かそれ以上に重要な病的意義を持つ可能性があると考えられるが、実際ヒト癌における長鎖 ncRNA の病的意義に関しては、上述の乳癌の HOTAIR の例を除きほとんど分かっていない。他の癌種においてもこれまで同定されてきた癌遺伝子や癌抑制遺伝子と同程度に重要な病的意義をもつ長鎖 ncRNA が存在する可能性が高い。それらの量的な異常や質的な異常が、発癌において第一義的な原因・ドライバー因子となっている可能性が十分にある。

2. 研究の目的

本研究では、大腸癌臨床例において、長鎖 ncRNA の量的・質的な異常を一義的な原因とする一群が存在するか、という点に関して明らかにしたい。そのための手段として、本研究では大腸内視鏡検体の次世代シーケンサーによる解析とバイオインフォマティクスを最大限に活用し、次の3段階の中間達成目標を設定し研究を遂行する。

① 微量の大腸内視鏡検体を用いて ChIP-Seq 法を行うためのワークフローを確立する。② 一部の大腸癌症例において量的・質的異常を示しうる長鎖 ncRNA 候補を系統的に同定する。③ 同定された長鎖 ncRNA に関し、多数の臨床検体において量的・質的異常の有無を検証する。

3. 研究の方法

1) 大腸内視鏡の生検検体を用いたヒストン H3K4me3, H3K27me3 に対する ChIPSeq 実験

札幌医科大学第一内科にて大腸内視鏡検査を施行した患者から、十分な説明と同意のもと、生検検体を収集した。さらに腺管分離法により直接上皮細胞成分のみを分離した。分離した細胞を直ちにホルマリン固定し、抗ヒストン抗体を用いてクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を施行。ChIP-DNA のクオリティ (シ

グナル・ノイズ比) を qPCR にて確認後、ChIPSeq ライブラリを作成した。プロトコールは微量検体用に改変したもの (Maruyama, Plos Genetics, 2011) を使用し、次世代シーケンサー (SOLiD4) により解析した。

2) バイオインフォマティクスによるデータの解析と新規長鎖 ncRNA の同定

Broad Institute で公開された lincRNA のデータベース (Cabili, Genes Dev, 2011) を利用し、約 1 万カ所の長鎖 ncRNA の転写開始点の K4me3 を各サンプル間で比較した。その他、ES 細胞における長鎖 ncRNA のデータ、TCGA、ENCODE、NIH Roadmap Epigenomics Project 等の既存のデータベースで公開されている ChIPSeq データや RNASeq データをダウンロードし、統合解析を行った。

3) DNA メチル化解析

臨床検体や癌細胞株から DNA を抽出し、bisulfite 処理を行った後に、MSP 法ならびに pyro-sequencing 法により解析を行った。

4) 遺伝子発現解析

臨床検体や癌細胞株から RNA を抽出し、cDNA を合成後、SYBR Select 試薬を用いて、realtime PCR 法にて発現解析を行った。

4. 研究成果

1) 大腸内視鏡検体を用いたヒストン修飾の網羅的解析

まず初めに微量の臨床検体から質の高い再現性のある結果を得るべく、検体からの細胞分離の方法並びに次世代シーケンサー (SOLiD4) を用いた ChIPSeq 法のプロトコールの各段階を詳細に検討し、最適化を行った。この改良したプロトコールを用いることで、 1×10^5 個の細胞、1ng 程度の ChIP-DNA から ChIPSeq 法の施行が可能であることを確認した。次に実際に大腸内視鏡検体を用いてヒストン修飾 (H3K4me3, K27me3) に対する ChIPSeq 実験を施行した。均一なデータを得るため腺管分離法により直接上皮細胞成分のみを分離し解析対象とした。これまでに 27 検体で ChIPSeq 実験を施行し、そのうち 21 検体で質の高い ChIPSeq データを得ることができた。

2) 一部の大腸癌で特異的に高発現している長鎖 ncRNA の同定

これらの臨床検体と癌細胞株の ChIPSeq データを用い、長鎖 ncRNA 近傍の K4me3 を対象とし、サンプル間での比較解析を試みた。K4me3 を認める長鎖 ncRNA の 7~9 割はサンプル間で共通していたが、一部検体特異的に K4me3 を認める長鎖 ncRNA があり、これらは何らかの病的意義があると考えられた。最終的に大腸癌検体でのみ活性化されている長鎖 ncRNA を 10 種類同定したが、そのうちのある長鎖 ncRNA に関しては、Roadmap

Epigenomics の 88 個の ChIPSeq-K4me3 データと比較したところ、正常の骨格筋の細胞でのみ活性 (K4me3) を認めた。また正常の大腸組織では H3K27me3 により抑制されていることも確認され、これらの長鎖 ncRNA は何らかの理由で大腸組織に異所性に発現し、それが癌の発生や進展に寄与している可能性が示唆された。細胞株を用いた機能解析を施行中である。

3) 大腸癌で発現が低下している長鎖 ncRNA の同定

また DNA メチル化により H3K4me3 が消失する特性 (Suzuki, Cancer Res, 2011) を利用し、大腸癌検体で DNA メチル化により抑制されている長鎖 ncRNA を 20 種類同定することができた。それらに関して多数の臨床検体でメチル化や発現状態の確認を行った。公共データベースによる解析では、そのうちの一つの長鎖 ncRNA に関して、大腸癌のみならず胃癌や食道癌、子宮頸癌、肺扁平上皮癌等でも高頻度にメチル化されていることが確認された。一方では正常組織ではほとんど DNA メチル化は検出されず、このことは癌の早期診断マーカーに非常に有用と考えられた。実際に大腸洗浄液を用いた癌の早期診断マーカーとして、この長鎖 ncRNA のプロモーター領域を用い、その有用性が確認された。

4) 大腸癌で点突然変異を認める長鎖 ncRNA の同定

長鎖 ncRNA の質的異常のスクリーニングとして、新学術領域「ゲノム支援」事業の支援を得て、長鎖 ncRNA を含む全エキソンシーケンスを 50 検体で施行した。データ解析により、癌患者において変異を認める長鎖 ncRNA のリストを作成した。それらの候補に関して第 3 世代シーケンサー (IonPGM) を活用して多サンプルの多領域を同時に検証することを試み、いくつかの候補に関しては、ある一定の頻度で変異を認めることを確認した。現在、癌細胞株を用いた機能的解析を行う準備をしている。

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 35 件)

- ① Mitsuhashi K, Noshō K, Sukawa Y, Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, Kanno S, Igarashi H, Naito T, Adachi Y, Tachibana M, Tanuma T, Maguchi H, Shinohara T, Hasegawa T, Imamura M, Kimura Y, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. *Oncotarget*. 2015; 6:

7209-20 査読有

- ② Ito M, Kanno S, Noshō K, Sukawa Y, Mitsuhashi K, Kurihara H, Igarashi H, Takahashi T, Tachibana M, Takahashi H, Yoshii S, Takenouchi T, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium nucleatum with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int J Cancer*. 2015 (Epub ahead of print). doi: 10.1002/ijc.29488. 査読有
- ③ Noshō K, Igarashi H, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yoshii S, Mikami M, Takahashi H, Kusumi T, Hosokawa M, Sukawa Y, Adachi Y, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Clinicopathological and molecular characteristics of serrated lesions in Japanese elderly patients. *Digestion*. 2015; 91: 57-63. doi: 10.1159/000368820. 査読有
- ④ 丸山玲緒. がんエピゲノムと non-coding RNA の接点 *実験医学* 2014; 32: 3043-48 査読無
- ⑤ 鈴木拓, 丸山玲緒, 山本英一郎, 甲斐正広. がんの methylator phenotype: ゲノムとエピゲノムの接点 CpG island methylation phenotype: crosstalk between cancer genome and epigenome. *実験医学* 2014; 32: 95-100 査読無
- ⑥ Harada T, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H. Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014; 7:1002-10. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0162. 査読有
- ⑦ Ito M, Mitsuhashi K, Igarashi H, Noshō K, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Fujita M, Sukawa Y, Yamamoto E, Takahashi T, Adachi Y, Nojima M, Sasaki Y, Tokino T, Baba Y, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. *Int J Cancer*. 2014; 1;135:2507-15. doi: 10.1002/ijc.28920. 査読有
- ⑧ Idogawa M, Ohashi T, Sasaki Y, Maruyama R, Kashima L, Suzuki H, Tokino T. Identification and analysis of large intergenic non-coding RNAs regulated by p53 family members through a

- genome-wide analysis of p53-binding sites. *Hum Mol Genet.* 2014; 23: 2847-57. doi: 10.1093/hmg/ddt673. 査読有
- ⑨ Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano H, Sugai T, An B, Shureiqi I, Toyota M, Kondo Y, Estécio MR, Issa JP. Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 2014; 1;74: 1311-8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1865. 査読有
- ⑩ Noshō K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis.* 2014; 35: 776-83. doi: 10.1093/carcin/bgt374. 査読有
- ⑪ Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano H, Sugai T, Kondo Y, Toyota M, Issa JP, Estécio MR. CIMP-positive but not CIMP-negative colorectal carcinomas show frequent somatic mutation of chromatin regulator genes. *Gastroenterology.* 2014; 146:530-38. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.060. 査読有
- ⑫ Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. *Front Genet.* 2013;4:258;1-8. doi:10.3389/fgene.2013.00258. 査読有
- ⑬ Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013; 52(2):140-9. doi: 10.1002/gcc.22013. 査読有
- ⑭ 山本英一郎, 丸山玲緒, 木村友昭, 山野泰穂, 菅井有, 篠村恭久, 鈴木拓. 【SSA/Pの本態を探る】遺伝子研究の立場からみた SSA/P の病態. *Intestine* 2012;16: 549-554. 査読無
- ⑮ 山本英一郎, 鈴木拓, 丸山玲緒, 篠村恭久. 新しい臨床検査技術の開発 エピゲノム解析法の発展と臨床応用. *臨床病理* 2012; 60: 637-643. 査読無
- ⑯ 鈴木拓, 丸山玲緒, 山本英一郎. 大腸癌の分子生物学 大腸癌におけるマイクロRNA とエピジェネティクス異常. *大腸癌 frontier* 2012;5(3):261-265. 査読無
- ⑰ Maruyama R, Suzuki H. Long noncoding RNA involvement in cancer. *BMB Rep.* 2012; 45(11):604-11. 査読有
- ⑱ Maruyama R, Suzuki H, Yamamoto E, Imai K, Shinomura Y. Emerging links between epigenetic alterations and dysregulation of noncoding RNAs in cancer. *Tumour Biol.* 2012; 33(2):277-85. doi: 10.1007/s13277-011-0308-9. 査読有
- ⑲ Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol Oncol.* 2012;6:567-78. doi:10.1016/j.molonc.2012.07.007. 査読有
- ⑳ Yamamoto E, Suzuki H, Yamano H, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y, Toyota M. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. *Am J Pathol.* 2012; 181(5):1847-61. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.007. 査読有
- 21 Kimura T, Yamamoto E, Yamano H, Suzuki H, Kamimae S, Nojima M, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Takagi R, Kato R, Harada T, Suzuki R, Maruyama R, Kai M, Imai K, Shinomura Y, Sugai T, Toyota M. A novel pit pattern identifies the precursor of colorectal cancer derived from sessile serrated adenoma. *Am J Gastroenterol* 2012;107(3):460-9. doi:10.1038/ajg.2011.457. 査読有
- [学会発表] (計25件)
- ① Maruyama R, Kitajima H, Yamamoto E, Niinuma T, Yorozu A, Kumegawa K, Nishiyama K, Tsuyada A, Suzuki R, Kai M, Tokino T, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs involved in gastritis and gastric tumorigenesis. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ② Maruyama R, Kitajima H, Yamamoto E, Niinuma T, Yorozu A, Kumegawa K, Tsuyada A, Suzuki R, Kai M, Tokino T, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs involved in gastritis and gastric tumorigenesis. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ③ Igarashi T, Kumegawa K, Maruyama R,

- Yamamoto E, Tsuyada A, Suzuki R, Niinuma T, Kai M, Yamano H, Sugai T, Tokino T, Shinomura Y, Suzuki H. Genome-wide identification of lincRNAs epigenetically silenced by DNA methylation in colon cancer. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
- ④ Maruyama R, Kitajima H, Yamamoto E, Niinuma T, Kumegawa K, Yorozu A, Tsuyada A, Suzuki R, Kai M, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs involved in gastric tumorigenesis. 第8回日本エピジェネティクス研究会年会、2014年5月25日、伊藤国際学術研究センター（東京都・文京区）
- ⑤ Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Tsuyada A, Niinuma T, Suzuki R, Shinomura Y, Tokino T, Suzuki H. Genome-wide identification of novel long noncoding RNAs epigenetically silenced by DNA methylation in colon cancer. Keystone Symposia “Cancer Epigenetics” 2014年2月4日、Santa Fe (USA)
- ⑥ Maruyama R, Yamamoto E, Tsuyada A, Kumegawa K, Suzuki R, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Kai M, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs potentially involved in gastric carcinogenesis. Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program 2013. 2013年10月20日、ロイトン札幌（北海道・札幌市）
- ⑦ Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Tsuyada A, Hatahira T, Niinuma T, Suzuki R, Sugai T, Yamano H, Kai M, Sato A, Shinomura Y, Suzuki H. Genome-wide identification of novel long noncoding RNAs epigenetically silenced by DNA methylation in colorectal cancer. Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program 2013. 2013年10月20日、ロイトン札幌（北海道・札幌市）
- ⑧ Maruyama R, Yamamoto E, Kumegawa K, Tsuyada A, Suzuki R, Ashida M, Kai M, Sato A, Niinuma T, Yamano H, Sugai T, Shinomura Y, Tokino T, Suzuki H. Qualitative and quantitative analysis of long non-coding RNAs in gastrointestinal cancer. 第33回日本分子腫瘍マーカー研究会、2013年10月2日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
- ⑨ Maruyama R, Yamamoto E, Kumegawa K, Tsuyada A, Ashida M, Suzuki R, Tokino T, Shinomura Y, Suzuki H. Integrated analysis of clinical ChIPSeq data and public databases identified candidate long non-coding RNAs critically

involved in gastrointestinal cancer. 104th Annual Meeting, American Association for Cancer Research. 2013年4月6日、Washington, D.C. (USA)

- ⑩ Maruyama R, Yamamoto E, Tsuyada A, Suzuki R, Ashida M, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs potentially involved in chronic inflammation associated with Helicobacter pylori infection. The 4th Symposium of A3 Foresight Program Recent progress of cancer epigenomics. 2013年3月9日、Jeju (Korea)
- ⑪ Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Sawada T, Harada T, Nojima M, Tsuyada A, Aoki Y, Sato A, Kai M, Sugai T, Yamano H, Suzuki H. Global Identification of novel large intergenic non-coding RNAs silenced by DNA methylation in colorectal cancer. Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program 2012. 2012年9月1日、ホテルライフオーソ札幌（北海道・札幌市）

[図書] (計 0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

なし

○取得状況 (計 0件)

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 玲緒 (MARUYAMA, Reo)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60607985

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし