

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860412

研究課題名(和文)胃癌における細胞外non-coding RNAの包括的解析と治療応用への展開

研究課題名(英文)Comprehensive analysis and therapeutic application of non-coding RNA in gastric cancer.

研究代表者

小西 博貴(Konishi, Hirotaka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00448739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌患者の血中遊離non-coding RNAに着目し、胃癌細胞株と培養液中の遊離核酸を用いて、細胞外RNAによる胃癌細胞の制御機構の解明を目標として研究した。胃癌患者の術前に血漿中で上昇が確認されたmiR-451, miR-486は、術後に減少し、再発時には再度上昇することが確認された。しかし、再発のない症例でも上昇を認める事があり、さらなる精度改善や他因子の排除が必要であった。

研究過程で同定したlnc RNAのH19に関して、胃癌患者でバイオマーカーとして有用である事を報告した。また食道癌におけるHOTAIR、肝細胞癌におけるMALAT1に関しても同様に解析・報告予定である。

研究成果の概要(英文)：We focused on circulating non-coding RNA in plasma of gastric cancer patients, and attempted to confirm the regulation of cancer cells by cell free RNA. The amounts of plasma miR-451 and miR-486 were higher in pre-operative gastric cancer patients than in healthy volunteers, and were reduced post-operatively and increased again at the time of recurrence. However, the amounts of these miRNAs were sometimes increased in the patients without recurrence, and it was necessary for further improvement of accuracy and the exclusion of other factors affecting the amounts of miRNAs.

We reported that lnc RNA H19, which was detected in this research, was helpful for the biomarker in gastric cancer patients. In a similar way, HOTAIR in esophageal cancer patients and MALAT1 in hepatocellular cancer patients were attempted to be analyzed and reported.

研究分野：消化器外科

キーワード：non-coding RNA micro RNA 血漿 胃癌 食道癌 肝癌

1. 研究開始当初の背景

癌を含む様々な疾患において micro RNA(miRNA, miR) や long non-coding RNA(lncRNA)などの non-coding RNA が、その病態形成や調節に大きく関与し、細胞内のみならず細胞外にも安定な形で存在する事が知られてきた。我々は、胃癌患者血漿中の miR-451, -486 が癌の存在や病態評価の biomarker として有用である事、また血漿中のこれら両 miRNA の増加が胃癌組織以外の正常組織に由来する可能性が高い事を示しており、各種の癌において細胞外の遊離 non-coding RNA はバイオマーカーとしてのみでなく、様々な機能を有しているものと考えられる。

2. 研究の目的

細胞外 lncRNA の存在を miRNA と同様の手法で証明し、さらに細胞外 RNA 群の由来・役割や癌細胞に及ぼす影響を解明するとともに、癌抑制的な RNA 群の治療応用を目指した。

3. 研究の方法

胃癌患者血漿、胃癌細胞株の培養液中の lncRNA の存在の確認。

各種癌細胞中・培養液中の miRNA(miR-451,-486)、lncRNA 量の変化の解析。

患者血漿中、細胞株培養液中の miRNA, lncRNA のエクソソーム分画やタンパク分画への分布と他の細胞への効果の確認。

4. 研究成果

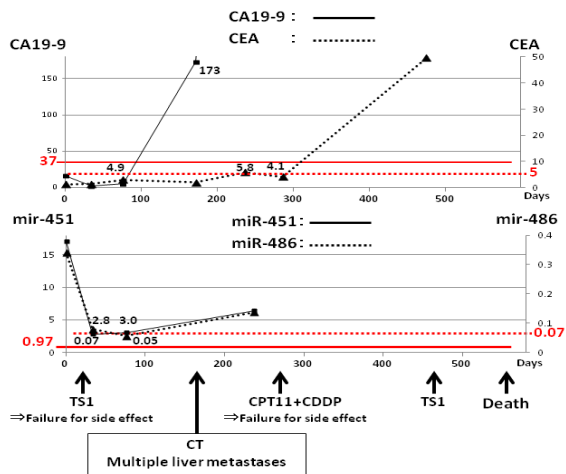
胃癌細胞株とその培養液、あるいは胃癌患者の血漿を用いて、遊離 non-coding RNA の網羅的な検出を行った。培養液中・血漿中の遊離あるいはエクソソーム内の non-coding RNA は安定に抽出・定量が可能であり、その中からいくつかの解析候補の抽出を行い以下の結果が得られた。

また、正常細胞との関連に関しても共培養などの手法を用いて検討中であるが、これに関しては誤差や細胞の状態による差が大きく、現段階ではまとまった見解には至っておらず、引き続き細胞株の変更などを行いながら検討予定である。

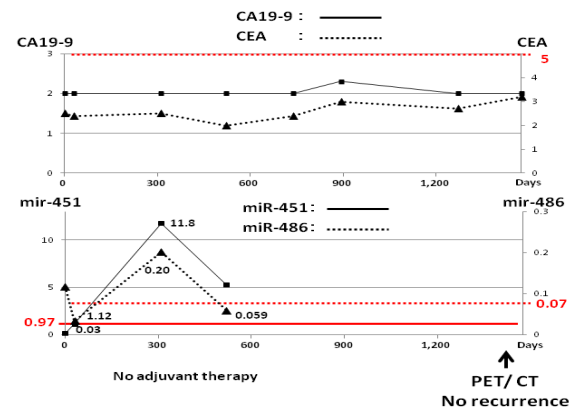
当初、胃癌において検討を開始したが、文献上は他の癌種においても報告されている non-coding RNA が多く候補として抽出されたため、食道癌・肝癌・大腸がんなどに関しても同様の検討を進め、食道癌・肝癌において以下に示す結果が得られた。

胃癌術後患者の術後フォローにおいて、血漿中 miR-451, -486 の測定を行い、術前高値であった両 miR レベルが、術後に減少する事が再確認された。また再発時には徐々に上昇を認め、既存の腫瘍マーカーである CEA,

CA19-9 などに比べて反応が早いことが確認された。

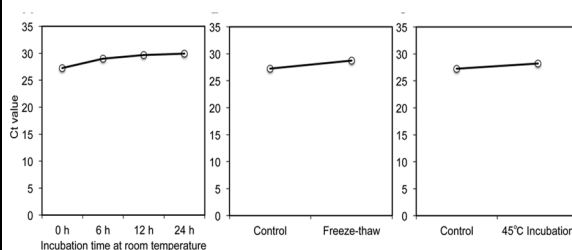


しかしながら、無再発患者においても、高値を示すことがあり、サンプル回収や保存、腫瘍以外の病態の影響も危惧された。



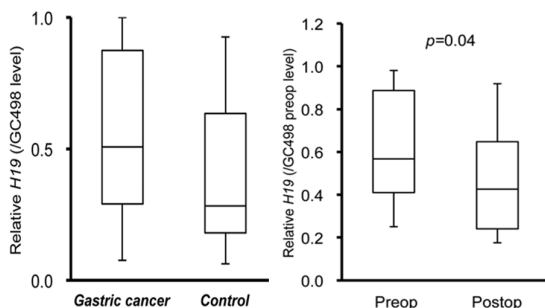
このため、現在胃癌に関して stage II, III 症例の血漿を prospective に集積中であり、今後これらの検体に関して術後経過との関連を解析し、結果を発表予定である。

胃癌患者血漿中の long non-coding RNA の検索において、遊離 lncRNA の定量が可能であり、比較的安定に存在する事を確認した。



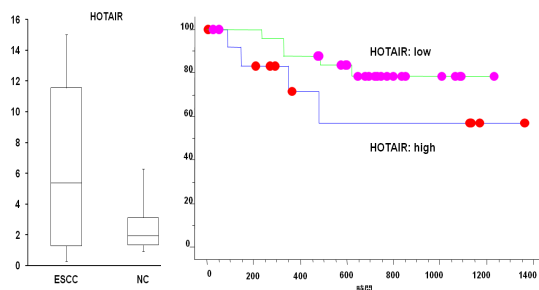
この中で、lncRNA の H19 に着目し、マイクロ RNA で用いたのと同様の手法を用い、胃癌患者と健常コントロール、術前と術後の比較を施行した。その結果、健常コントロールと比較して胃癌患者血漿中で有意に高く、術後には有意に減少することが確認され、胃癌のバイオマーカーとして lncRNA がマイクロ RNA

同様に有用である事を示し報告した。



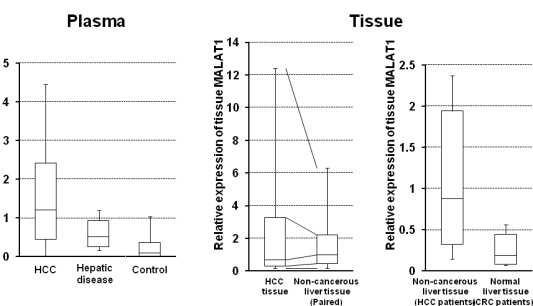
胃癌における検索で候補として抽出した lncRNA の他癌種における有用性の検討を合わせて行った。

a)食道癌患者の血漿において lncRNA の 1 種である HOTAIR レベルは、健常コントロールに比較して有意に上昇し、また血漿での低値群ほど全生存率・無再発生存率ともに良好である事が確認された。



HOTAIR に関しては、食道癌組織における分子機構と予後との関連が知られており、さらに血漿中 HOTAIR の癌細胞株に対する作用について解析中である。

b)肝癌患者の血漿中で lncRNA の 1 種である MALAT1 レベルが、健常コントロール・肝炎患者・肝癌患者と段階的に上昇しており、また組織においては肝癌と周辺の肝組織に発現の差を認めないものの、肝癌患者と大腸癌肝転移患者の正常肝組織での発現に有意差を認めた。これらの事から、血漿中 MALAT1 レベルは肝障害や肝癌発生の指標になる可能性が示唆され、ここまでの内容に関して論文投稿中である。



また MALAT1 の著名な上昇が、肝癌発生の原因となっているのか、結果であるのかに関しては、さらに機能解析を進行中である。

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 1 件)

Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Shoda K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* 2013; 33(8): 3185-93. (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

2013.10.12、JDDW (東京都) 胃癌診療における血漿中マイクロ RNA-451, -486 測定の意義の検討。小西 博貴

2013.10.5、癌学会 (横浜市)、The significance of the detection of plasma miR-451 and -486 for the monitoring of gastric cancer patients. Konishi H.

2013.10.5、癌学会(横浜市) Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. Arita T.

2014.9.25、癌学会 (横浜市)、Significance of Plasma MALAT1 for the Patients with Hepatocellular Carcinoma. Konishi H.

2014.9.26、癌学会(横浜市) Involvement of Exogenous Tumor Exosome in Peritoneal metastasis of Gastric Cancer. Ichikawa D

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小西 博貴 (Konishi Hirotaka)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00448739

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：