

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670175

研究課題名(和文)エクソソーム内T-UCRコード非翻訳RNAの胃癌・前立腺癌の診断治療における意義

研究課題名(英文)Role of Non-coding RNA of T-UCR in exosome in diagnosis and therapy of gastric and prostatic cancer

研究代表者

安井 弥 (YASUI, WATARU)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：40191118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：超保存領域(transcribed-ultraconserved regions: T-UCRs)コード非翻訳RNAの胃癌・前立腺癌における解析の結果、癌において発現の変動するいくつかのT-UCRを見いだした。特に、発現亢進を示すUc.416+AはmiR-153によって制御を受けており、IGFBP6, HOXB5/B6を介して増殖に関わることを明らかにした。さらに、Uc.416+Aは細胞外に分泌され、癌患者血清ではレベルの高い傾向にあった。Liquid biopsy系への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：By the analysis of Transcribed ultraconserved region (T-UCR) transcripts, the levels of many T-UCRs are found to be altered in cancers. Among those, Uc.416+A, up-regulated in cancer, was negatively regulated by miR-153 and participated in cell growth through IGFBP6 and HOXB5/B6. Uc.416+A was secreted from cancer cells and high levels were detected in the sera of cancer patients. Application to liquid biopsy system is expected.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エクソソーム ncRNA 超保存領域(T-UCR) 胃癌 前立腺癌 診断・治療展開

1. 研究開始当初の背景

Exosomeは分泌型miRNAの輸送による新しい情報伝達機構として注目されており、微小環境における癌細胞の適応やパラクリン的な細胞間相互作用に関して、中心的な役割を担う可能性が示唆されている。Exosomeが内包するのは、miRNAのみならず、種々のmRNAやDNA断片、機能性タンパク質であり、免疫制御、薬剤耐性、浸潤・転移、血管新生にも関わっている。これを標的とした診断・治療戦略が考えられつつある。一方、ヒトゲノムにはT-UCRが500個程度存在しており、名のとおりマウス、ラットでも100%保存されている。T-UCRがコードするncRNAは、遺伝子あるいはncRNA自身の発現を制御することが示されているが、生物学的機能に関しては不明な点が多い。近年、種々のT-UCR-ncRNAの発現異常がいくつかの癌で見出され、新しい診断マーカーとして注目される。

しかし、胃癌、前立腺癌はもちろんのこと、他の癌においてもExosomeを介して分泌されるT-UCR-ncRNAに関する研究は全くなされていない。Exosomeが様々な生物現象を仲介すること、T-UCR-ncRNAががん抑制的とがん促進的の2面性をもつことから、これまで全く知られていないがんの発生・進展のメカニズムを明らかにする斬新なアイデアであり、画期的な診断・治療展開が拓ける可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、胃癌・前立腺癌におけるエクソソーム内に存在するT-UCR-ncRNAの発現とその機能を明らかにした上で、T-UCR-ncRNAを標的とした診断・治療への展開を目的とする。胃癌・前立腺癌において、癌細胞内およびそこから分泌されるT-UCR-ncRNAの発現を解析し、特徴的な発現態度を示す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-ncRNA、miRNAについては、臨床病理学的事項との関連、Liquid biopsy系への応用、siRNA等による治療実験を行なう。これらにより、胃癌・前立腺癌の発生・進展におけるT-UCR-ncRNAの役割が明らかになるとともに、全く新しい切り口の診断・治療展開が広がる。当該癌に留まらず、癌の広い領域における分泌型T-UCR-ncRNA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

胃癌細胞株、前立腺癌細胞株および臨床検体(胃癌、前立腺癌、非癌部)新鮮凍結組織を用いる。T-UCR-ncRNAプロファイルを比較し、胃癌、前立腺癌のそれぞれに特徴的な発現を示すT-UCR-ncRNAを抽出する。Exosomeの抽出は超遠心法によって行う。Exosomeの確認は、CD9およびCD63にて行う。回収した

Exosomeからtotal RNAを準備し、RNA Integrity numberが6.0以上を使用する。

特徴的な発現を示すT-UCR-ncRNAについて、分子細胞生物学的な機能解析を行なう。胃癌・前立腺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、anchorage-independent growth、細胞増殖、MTTアッセイ、invasionアッセイ、migrationアッセイを行なう。治療感受性(抗癌剤および放射線)への影響についても検討する。

T-UCR-ncRNAとmiRNAの発現相関解析とその制御に関わるmiRNAの同定ならびに転写活性への影響を検討する。miRNAの標的は、miRBase Target prediction algorithmで検索する。同定された直接相互作用する可能性のあるT-UCR:miRNAの組合せについては、癌細胞株におけるmiRNAの強制発現およびノックダウンによってT-UCR-ncRNAの発現への影響を確認する。さらに、転写活性への影響はluciferaseアッセイで検討する。

特徴的T-UCR-ncRNAおよびmiRNAに関しては、in situ hybridizationで胃癌および前立腺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とともに、胃癌では抗癌剤治療、前立腺癌では去勢抵抗性との関連について検討する。

以上を総合して、T-UCR-ncRNAの発現プロファイルあるいは特定のT-UCR-ncRNA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。ここでは、組織をサンプルとしたいわゆるSolid biopsy診断への応用に加えて、液体サンプル(血清、尿、体腔液、胃癌患者腹水等)を用いたLiquid biopsyへの応用を検討する。

4. 研究成果

1) 胃癌・前立腺癌におけるエクソソームの調整:胃癌細胞株について、超遠心法によりエクソソームを準備した。エクソソームの確認は、CD63にて行なった。さらに、エクソソーム膜に存在するtetraspanin 8のsiRNAノックダウンによっても確認した。

2) 特徴的T-UCR-ncRNAの発現解析と機能解析:胃癌および前立腺癌におけるT-UCRの発現とメチル化による制御、癌に特徴的に発現亢進を示すT-UCRの同定とその発現制御並びに下流遺伝子の探索を行なった。代表的T-UCRの発現を胃癌細胞株・前立腺癌細胞株およびそれぞれの正常組織とで比較したところ、胃癌・前立腺癌ともに癌で発現低下を示すT-UCR(Uc.118+A, Uc.158+A, Uc.241+A, Uc.244+, Uc.249+, 等)の多いことが分かった。その内、Uc.158+Aでは転写調節領域が癌において高頻度にメチル化されており、ルシフェラーゼアッセイによってメチル化による転写活性低下が確認された。一方、癌で発現亢進していた3種のT-UCRの内、Uc.416+A

では臨床検体においても癌における発現亢進が確認された。生物学的機能解析では、siRNAによるノックダウンにより細胞増殖能が有意に抑制された。

3) 胃癌・前立腺癌に特徴的 T-UCR-ncRNA の microRNA による発現制御: これまでの研究結果から、特に胃癌で発現亢進し、細胞増殖に関わることが見いだされた Uc. 416+A に注目して研究を進めた。オンラインデータベース (UCbase, miRbase) 検索で、miR-153 と miR-4641 が相補的配列を有することを見いだした。miR-153 の強制発現で Uc. 416+A の発現は抑制され、ルシフェラーゼアッセイにおいて転写活性の抑制が確認された。胃癌臨床検体においても、U. 416+A と miR-153 の発現は有意な逆相関を示した。前立腺癌細胞株でも同様の結果が得られた。

4) 特徴的 T-UCR-ncRNA, Uc. 416+A の下流標的遺伝子の探索: 下流標的遺伝子の探索のため、胃癌細胞株において Uc. 416+A を siRNA でノックダウンし、発現変動を示す遺伝子を GeneChip で網羅的に検索した。その結果、IGFBP1, IGFBP6 の発現上昇、ADH1C, HOXB5, HOXB6 の発現低下が認められ、定量的 RT-PCR でも確認された。臨床検体においては、胃癌組織での IGFBP6 の発現低下、HOXB5, HOXB6 の発現上昇を認めた。

5) 特徴的 T-UCR-ncRNA, Uc. 416+A の細胞外分泌とがん患者血清における検出: 特徴的 T-UCR-ncRNA, Uc. 416+A の細胞外分泌と癌患者血清における検出: 培養上清あるいは血清から Total RNA を抽出、RT-PCR 法にて T-UCR を検出した。胃癌細胞株 MKN-1、MKN-45、MKN-74、前立腺癌細胞株 DU145 の培養上清から Uc. 416+A の分泌を確認した。血清でも Uc. 416+A の検出は可能であり、前立腺癌患者で高い傾向にあった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Goto K, Honma R, Sakamoto N, Sentani K, Que N, Teishima J, Matsubara A, Yasui W: Transcribed Ultra-conserved Regions in prostate and gastric cancer: DNA hypermethylation and microRNA-associated regulation. *Oncogene*, in press. doi: 10.1038/onc.2015.445. 2015 Dec 7. [Epub ahead of print], 査読有
2. Anami K, Que N, Noguchi T, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Naito Y, Oo HZ, Yasui W: Tetraspanin 8, identified by the *Escherichia coli* ampicillin secretion trap, is associated with cell growth and invasion in gastric cancer. *Gastric Cancer* 19: 370-380, 2016, 査読有 doi: 10.1007/s10120-015-0478-z.
3. Naito Y, Que N, Pham TTB, Yamamoto M,

Fujiwara M, Ishida T, Hida E, Mukai S, Sentani K, Sakamoto N, Sasaki H, Yasui W: Characteristic miR-24 expression in gastric cancer of atomic-bomb survivors. *Pathobiology* 82: 68-75, 2015, 査読有 doi: 10.1159/000398809.

4. Hibino Y, Sakamoto N, Naito Y, Goto K, Oo HZ, Sentani K, Hinoi T, Ohdan H, Que N, Yasui W: Significance of miR-148a in colorectal neoplasia: Down-regulation of miR148a contributes to carcinogenesis and cell invasion of colorectal cancer. *Pathobiology* 82: 233-241, 2015, 査読有 doi: 10.1159/000438826.
5. Que 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, 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, 査読有 doi: 10.1002/ijc.28522.
6. Sakamoto N, Naito Y, Que N, Sentani K, Uraoka N, Oo HZ, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W: MicroRNA-148a is down-regulated in gastric cancer, targets MMP7 and indicates tumor invasiveness and poor prognosis. *Cancer Science* 105: 236-243, 2014, 査読有 doi: 10.1111/cas.12330.
7. Naito Y, Sakamoto N, Que N, Yashiro M, Sentani K, Yanagihara K, Hirakawa K, Yasui W: MicroRNA-143 regulates collagen type III expression in stromal fibroblasts of scirrhous type gastric cancer. *Cancer Science* 105: 228-235, 2014, 査読有 doi: 10.1111/cas.12329.
8. Naito Y, Yasuno K, Tagawa H, Sakamoto N, Que N, Yashiro M, Sentani K, Goto K, Shinmei S, Oo HZ, Yanagihara K, Hirakawa K, Yasui W: miR-145 is a potential prognostic factor of scirrhous type gastric cancer. *Oncology Reports* 32: 1720-1726, 2014, 査読有 doi: 10.3892/or.2014.3333.

[学会発表] (計 19 件)

1. 内藤 寛, 安井 弥: スキルス胃がん微小環境における細胞外小胞の機能. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会合同大会, 2015年12月1-4日,

- 神戸
2. Yasui W: Molecular pathology of gastric cancer. The 2nd International Forum for Japan and Korea Medical Exchange, October 17, 2015, Kure, Japan
 3. 内藤 寛, 安井 弥: スキルス胃癌微小環境における細胞外小胞の機能解析. 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月8-10日, 名古屋
 4. 後藤景介, 安井 弥: 転写超保存領域 T-UCR の胃癌・前立腺癌における発現制御機構. 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月8-10日, 名古屋
 5. 内藤 寛, 安井 弥: スキルス胃癌微小環境における分泌型 microRNA の機能解析. 第7回日本 RNAi 研究会, 2015年8月26-28日, 広島
 6. Yasui W: Molecular pathology of gastric cancer. JP Kim Memorial International Gastric Cancer Symposium, July 31, 2015, Seoul, Korea
 7. Yasui W: Endoscopic management of early gastric cancer: Molecular analysis in endoscopic specimen. The 11th International Gastric Cancer Congress, June 4-6, 2015, Sao Paulo, Brazil
 8. 関野陽平, 安井 弥: 前立腺癌における転写超保存領域 T-UCR の発現調節機構. 第104回日本病理学会総会, 2015年4月30日-5月2日, 名古屋
 9. 後藤景介, 安井 弥: 非翻訳領域をコードする転写超保存領域 T-UCR の胃癌における発現、機能解析. 第104回日本病理学会総会, 2015年4月30日-5月2日, 名古屋
 10. Naito Y, Yasui W: Functional analysis of extracellular vesicles as a novel regulatory agent of scirrhous type gastric cancer microenvironment. International Society for Extracellular Vesicles 2015. Washington D. C. (USA), April 23-26, 2015
 11. Yasui W: Molecular pathology of cancer cell growth and progression in gastrointestinal cancer. International Symposium on Tissue Microenvironmental Modulators, March 14, 2015, Tokyo, Japan
 12. Yasui W: Novel biomarkers and therapeutic targets of gastrointestinal cancer identified through transcriptome dissection. The 2nd International Symposium of Hiroshima Research Center for Healthy Ageing, March 13, 2015, Hiroshima, Japan
 13. 安井 弥: 世界の胃癌診療における日本の病理の役割: 過去・現在・未来. 第87回日本胃癌学会総会, 2015年3月4-6日, 広島
 14. 安井 弥: トランスクリプトームダイセクションによって同定した胃癌の新規診断・治療標的. 第73回日本癌学会学術集会, 2014年9月25-27日, 横浜
 15. 後藤景介, 安井 弥: 非翻訳 RNA コードする超保存領域の胃癌における発現解析. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25-27日, 横浜
 16. 服部拓也, 安井 弥: 胃癌における細胞表面蛋白質 TSPAN8 の発現とその意義. 第103回日本病理学会総会, 2014年4月24-26日, 広島
 17. 田川寛子, 安井 弥: スキルス胃癌間質の線維芽細胞における microRNA-145 の機能. 第103回日本病理学会総会, 2014年4月24-26日, 広島
 18. 後藤景介, 安井 弥: 転写超保存領域 T-UCR の前立腺癌における発現解析. 第103回日本病理学会総会, 2014年4月24-26日, 広島
 19. 石川 聖, 安井 弥: 胃癌における非翻訳領域をコードする転写超保存領域の発現調節機構. 第103回日本病理学会総会, 2014年4月24-26日, 広島
- [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
 - (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