

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670610

研究課題名(和文)胆管癌特異的長鎖ノンコーディングRNAの同定と革新的治療法開発への挑戦

研究課題名(英文)Identification of biliary duct cancer-associated long non-coding RNAs and their diagnostic and therapeutic application

研究代表者

瀧澤 俊広 (TAKIZAWA, Toshihiro)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90271220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA) は内因性で組織特異的に微量の発現量で機能しているため、従来では解析が困難であった。また、lncRNAは、短鎖ノンコーディングRNA (microRNA: miRNA) およびmRNAと相互作用して遺伝子の発現量を調節しており、今回、先端次世代シーケンサーを用いた3者 (lncRNA、miRNA、mRNA) のRNAシーケンス解析研究により、胆道癌、特に胆嚢癌のlncRNAの発現プロファイルを明らかにした。新たな発癌・浸潤機構の解明につながる先駆け研究となった。

研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNAs (lncRNAs; more than 200 nucleotides in length) are endogenous RNAs that do not code for functional proteins. Identifying tissue-specific lncRNAs is the first step toward understanding their biological functions and applying them to diagnostic and therapeutic tools. Using next-generation sequencing technologies (Illumina MiSeq and HiSeq), we performed RNA profiling of biliary duct cancer cells and their cell lines to elucidate the characteristics of the lncRNAs expressed in biliary duct cancer.

研究分野：分子腫瘍学(肝胆道系腫瘍)、分子病理解剖学、胎盤学

キーワード：癌 胆道外科学 胆管癌 胆嚢癌 ノンコーディングRNA

### 1. 研究開始当初の背景

胆管癌は胆管上皮由来の悪性腫瘍であり、癌死亡数の第6位(胆道癌)を占めている。外科的切除が根治的治療法であるが、胆管癌は周囲に浸潤しやすく、予後不良の悪性腫瘍である。そのため、早期の診断法の開発、外科的切除と化学療法に加え、新たな分子標的治療の開発が求められている。

我々は、これまでに胆管癌の蛋白質をコードしていないノンコーディングRNA(non-coding RNA: ncRNA)の一種であり、短鎖(22塩基程)のncRNAであるmicroRNA(miRNA)研究を行ってきた。近年、miRNAの癌における分子病態への関与、バイオマーカーとしての開発研究が急速な伸びを示しているが、miRNAはncRNAの氷山の一角でしかない。

ゲノムDNAからmRNAに転写される領域は全体のわずか2%であり、残り98%はncRNAとして転写されており(ENCODE Project Consortium. *Nature* 447: 799-816, 2007)数百から数千塩基より成る長鎖ncRNA(long ncRNA: lncRNA)の役割解明と医学応用については未開拓の分野であり、胆管癌でのlncRNA研究は報告されていない。lncRNA研究は医学に新たな研究展開をもたらす可能性を秘めている。わずかなlncRNAを除いて、機能的lncRNAの発現や機能は不明のままである。そこで、これまでの胆管癌のmiRNA研究、更には肝胆道系における癌研究の実績を活かし、挑戦的研究を行いたいと着想に至った。

我々は、2005年より世界に先駆け、肝内胆管癌におけるmiRNA研究を行ってきた。胆管上皮細胞特異的miRNA(miR-376cなど; Kawahigashi et al. *J Nippon Med Sch* 76: 188-197, 2009)を見出した。さらに、胆汁からのmiRNA検出に世界ではじめて成功し、胆汁中のmiR-9が胆道癌のバイオマーカーとなり得ることを明らかにした(Shigehara et al. *PLoS One* 6: e23584, 2011)。さらに、胆管上皮特異的miR-376cのGRB $\alpha$ (アダプター蛋白質)を標的とした浸潤能を増強する新規の胆管癌浸潤機構(Iwaki et al. *PLoS One* 8: e69496, 2013)や、胆管上皮細胞の上皮間葉転換(EMT)を誘導するSPRR2aがEMTを制御する転写抑制因子ZEB1を修飾し、miR-200c/miR-141を負に制御する新規の胆管癌発癌分子機構を明らかにした(Mizuguchi et al. *Hepatology* 59: 1130-1143, 2014)。胆管癌のmiRNAを介した発癌・浸潤機構の解明、新規診断治療法開発につながる画期的な成果を示した。

これらに加え、次世代シーケンサーによる肝臓癌、生殖臓器における網羅的miRNA解析を行い、ギガベース単位の塩基配列データを決定した(Mizuguchi et al. *PLoS One* 6: e15304, 2011; Mase et al. *Reprod Sci* 19: 1030-1040, 2012; Ishibashi et al. *Hypertension* 59: 265-273, 2012)。

さらに、我々は早くからRNA干渉技術と

分子生物学的機能解析法を取り入れ、肝炎、肝硬変、肝癌などの肝胆道系疾患において遺伝子治療実験、miRNAの機能解析に成功している(Mizuguchi et al. *Gastroenterology* 129: 1654-1662, 2005; Mizuguchi et al. *PLoS One* 7: e32449, 2012; Mizuguchi et al. *BMC Mol Biol* 13: 20, 2012)。

このような実績を活かし、今まで細胞内発現が低発現なため十分な解析ができなかったlncRNAを、先端次世代シーケンサーにより解析し、さらに、バイオインフォマティクス解析を取り入れた機能解析を行うことにより、胆道癌(胆管癌、胆嚢癌)の診断・治療に直結する胆管癌・胆嚢癌細胞の増殖・浸潤に関わるlncRNAを明らかにしたいと考え、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

(1) 先端次世代シーケンサーによるプロファイル解析により、胆道癌(胆管癌、胆嚢癌)に発現しているlncRNAの発現プロファイルの世界に先駆けて明らかにする。

(2) 明らかにしたlncRNAプロファイルから胆道癌増殖および浸潤に関与するlncRNAの同定を行う。

(3) 血液、胆汁での胆道癌特異的lncRNAの検出(バイオマーカーとしての可能性)を行う。

(4) (1)に加えて、胆道癌において、新しい概念である競合内在性RNA(competing endogenous RNA: ceRNA; Tay et al. *Nature* 505:344-352, 2014)から観た発現プロファイルと遺伝子制御ネットワークの解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 胆道癌(胆管癌・胆嚢癌)増殖・浸潤に関与するlncRNAの同定: 先端次世代シーケンサーによる発現プロファイル解析により、胆道癌に発現しているlncRNAの発現プロファイルを行った。さらに、lncRNAプロファイルから、バイオインフォマティクス解析を取り入れた機能解析から、胆管癌増殖および浸潤・転移に関与するlncRNAの検索を試みた。

先端次世代シーケンサーによる胆道癌のlncRNA発現プロファイル解析: 胆道癌組織(肝内胆管癌、胆嚢癌; 対照として正常部位)肝細胞癌組織を採取し、RNAを抽出した。また、胆管癌細胞株、正常胆管上皮細胞株、胆嚢癌細胞株、肝細胞癌細胞株よりRNAを抽出した。

MiSeqおよびHiSeqシーケンサー(Illumina社)を用いて、サンプルあたり5,000万リードを目標にシーケンス解析を行った。正常部位と比較し、胆道癌で特異的に有意に上昇しているlncRNA抽出するために、次世代シーケンス解析用システム(CLCバイオジャパン社 CLC Genomics Workbench)を用いてデータ解

析(リード数の正規化、マッピング、lncRNAの同定と発現差などを解析)を進めた。さらに、IPA(インジェヌイティープラスウェイアナリシス)ソフトウェアを用いてバイオインフォマティクス解析を進めた。

機能解析による胆道癌増殖および浸潤・転移に關与するlncRNAの同定:機能的lncRNAを同定するための予備解析として、lncRNAであるH19遺伝子をモデルに、loss-of-function解析を行った。

lncRNAに対して特異的なsiRNAを作製した。デザインされたsiRNAのreal-time PCRにて抑制効果を検証した。

組織化学による胆道癌特異的lncRNAのin vivo発現プロファイル解析:胆道癌病理標本を用いて発現様式を解析するための予備解析として、H19遺伝子をモデルに、in situ hybridization (ISH)解析を行った。H19に対するISHプローブ(RNAプローブ)を作製し、ホルマリン固定パラフィン包埋標本切片を用いてISHを行った。lncRNAの発現を示す反応産物の強度を形態学的に測定し、定量化を試みた。

(2)胆道癌の新規バイオマーカーの開発:lncRNAを用いた早期診断および分子標的治療薬開発にむけて、血液、胆汁中のlncRNA検出のために、良性および悪性閉塞性黄疸患者からの血液、胆汁サンプル採取を検討した。

(3)胆道癌におけるceRNAプロファイリングと遺伝子制御ネットワークの解明:胆道癌増殖・浸潤を制御していると考えられているlncRNAの役割解明のためには、lncRNAは単独で機能しているわけではなく、lncRNA、miRNA、mRNA同士が相互作用(競合)して遺伝子の発現量が調節される。個々のRNAを別々に解析しても、lncRNAの機能や、分子病態への関与は解明することは困難であり、これらの相互作用するRNAを競合内在性RNA(ceRNA)と捉え、lncRNA、miRNA、mRNAの3者間の遺伝子制御ネットワークおよびその相互作用の解析を行うことによりlncRNAがどのように遺伝子発現のネットワークを制御しているのか明らかにしたいと考えた。そのために、RNA-Seq解析を行い、lncRNAだけでなくmiRNA、mRNAの発現プロファイルを追加解析することによりceRNA解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1)胆道癌(胆管癌・胆嚢癌)増殖・浸潤に關与するlncRNAの同定:

先端次世代シーケンサーによる胆道癌のlncRNA発現プロファイル解析:胆管癌組織(n=3)、胆嚢癌組織(n=5)、肝細胞癌組織(n=3)のサンプルを採取し、サンプル調製を行った。胆嚢癌細胞株(G-415、

OCUG1、TYGBK-1、NOZ)、肝内胆管癌細胞株(HuCCT-1、HuH28、IHGGK)、正常胆管上皮細胞株(HIBEpIC)、肝細胞癌株(HepG2)を採取し、サンプル調製を行った。また、胆道癌(癌細胞)の浸潤と比較するために、浸潤が制御されている絨毛外栄養膜細胞および絨毛外栄養膜細胞株(HTR8/SVneo cells、HChEpC1b)を採取し、サンプル調製を行った。

シーケンス解析前のクオリティチェックを行ったところ、胆管癌症例のRNA品質がよくなく、シーケンス解析にすることができなかった。それ以外のサンプルをMiSeqまたはHiSeqでシーケンス解析を行い、塩基配列データを取得することに成功した。引き続き、CLC bio社CLC Genomics Workbenchを用いたデータ解析とIPAによるバイオインフォマティクス解析を進めている(投稿準備中)。

解析途中であるが、絨毛外栄養膜細胞を例にとると、約1,700万リードのマッピング可能な塩基配列データが取得され、そのうち約3%がlncRNAの配列データであり、約800種類のlncRNAの検出に成功した。絨毛外栄養膜細胞に分化する前の栄養膜細胞と比較して、lncRNAの発現プロファイルが大きく変動していることを見出した(投稿準備中)。

見出したlncRNAに関してIPA解析を行うと、lncRNAが關与する分子間ネットワークをlncRNAのみのデータで構築することは困難であった。このことは、ほとんどのlncRNAについて既存の機能が不明であること(報告がなされていないこと)が示唆された。

ハイスループット機能解析による胆道癌増殖および浸潤・転移に關与するlncRNAの同定:lncRNAであるH19に対して特異的なsiRNAを作製し、そのH19への発現抑制効果はreal-time PCRにて検証することができた。

組織化学による胆道癌特異的lncRNAのin vivo発現プロファイル解析:ホルマリン固定パラフィン包埋したマウス胎盤におけるH19のISH解析により、特定の細胞(迷路部層の単核栄養膜細胞、胎児血管細胞など)にH19が発現していることを明らかにした(投稿準備中)。

(2)胆道癌の新規バイオマーカーの開発:閉塞性黄疸患者の症例が少なく、体液(血液、胆汁など)によるlncRNA解析は今後の課題として残された。

(3)胆道癌におけるceRNAプロファイリングと遺伝子制御ネットワークの解明:次世代シーケンサーによるRNA-Seq解析を行い、ceRNAの発現プロファイル解析(lncRNA、miRNA、mRNA)を行った。lncRNAと同様にMiSeqまたはHiSeqでシーケンス解析を行

い、塩基配列データを取得することに成功した。引き続き、CLC Genomics Workbench を用いたデータ解析と IPA によるバイオインフォマティクス解析を進めている（投稿準備中）。

乳癌において、breast tumor kinase (BRK) は、受容体型チロシンキナーゼを介して細胞の増殖と生存を促進しているが、胆管癌における BRK の発現と機能は不明であった。我々は、ヒト胆管癌組織の組織化学的解析と、肝内胆管癌細胞株を用いた生化学的解析を行い、胆管癌は BRK を高発現しており、BRK は受容体型チロシンキナーゼなどを介してリン酸化され、癌細胞増殖が促進されることを明らかにした ( Mizuguchi et al. J Hepatol 63: 399-407, 2015 )。BRK シグナル経路が胆管癌の新たな分子標的治療の対象となり得るという新知見を新たな視点として、胆道癌における ceRNA プロファイリングと遺伝子制御ネットワークの解析も継続して行っている。

LncRNA は内因性で組織特異的に微量の発現量で機能しているため、従来では解析が困難であったが、今回の研究により、胆道癌、特に胆嚢癌の lncRNA の詳細な発現プロファイルが可能となり、新たな発癌・浸潤機構の解明につながる先駆け研究となった。

#### 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6件)

Mizuguchi Y, Takizawa T, Yoshida H, Uchida E. Dysregulated microRNAs in progression of hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Hepatol Res* 46: 391-406, 2016. doi: 10.1111/hepr.12606. 査読：有

Takizawa T, Powell RD, Hainfeld JF, Robinson JM. FluoroNanogold: an important probe for correlative microscopy. *J Chem Biol* 8: 129-142, 2015. doi: 10.1007/s12154-015-0145-1. 査読：有

Mizuguchi Y, Specht S, Isse K, Sasatomi E, Lunz JG 3rd, Takizawa T, Demetris AJ. Breast tumor kinase/protein tyrosine kinase 6 (Brk/PTK6) activity in normal and neoplastic biliary epithelia. *J Hepatol* 63: 399-407, 2015. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.047. 査読：有

Mizuguchi Y, Takizawa T, Uchida E. Host cellular microRNA involvement in the control of hepatitis B virus gene expression and replication. *World J Hepatol* 7: 696-702, 2015. doi: 10.4254/wjh.v7.i4.696. 査読：有

Mizuguchi Y, Isse K, Specht S, Iii JG,

Corbitt N, Takizawa T, Demetris AJ. Small Proline Rich Protein 2a in Benign and Malignant Liver Disease. *Hepatology* 59: 1130-1143, 2014. doi: 10.1111/jog.12217. 査読：有

Takahashi T, Zenno S, Ishibashi O, Takizawa T, Saigo K, Ui-Tei K. Interactions between the non-seed region of siRNA and RNA-binding RLC/RISC proteins, Ago and TRBP, in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 42: 5256-5269, 2014. doi: 10.1093/nar/gku153. 査読：有

#### [学会発表](計6件)

瀧澤俊広, 高橋宏典, 桑田知之, 大口昭英, 松原茂樹. 絨毛外栄養膜細胞に発現している長鎖 non-coding RNA の次世代シーケンス解析. 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2016 年 4 月 23 日. 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

Banyar Than Naing, 宋暁輝, 瀧澤俊広. Expression analysis of H19 non-coding RNA in the mouse placenta by in situ hybridization. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016 年 3 月 30 日. ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市)

Banyar Than Naing, 宋暁輝, 瀧澤俊広. マウス胎盤における H19 遺伝子の発現解析(第二報). 第 23 回日本胎盤学会学術集会・第 33 回日本絨毛性疾患研究会. 2015 年 11 月 5 日. JA 共済ビル・カンファレンスホール(東京都・千代田区)

水口義昭, 真々田裕宏, 清水哲也, 神田知洋, 中村慶春, 谷合信彦, 吉岡正人, 松下晃, 勝野暁, 高田英志, 住吉宏樹, 内田英二. 胆道癌における胆道癌における Breast Tumor Kinase/Protein Tyrosine Kinase 6 の発現形式と Tyrosine kinase receptor を介した増殖メカニズム. 第 13 回日本消化器外科学会大会. 2015 年 10 月 10 日. グランドプリンスホテル新高輪(東京都・品川区)

Banyar Than Naing, 趙東威, 瀧澤俊広. H19 遺伝子から転写されるノンコーディング RNA のマウス胎盤における発現様式解析. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2015 年 3 月 22 日. 神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

Banyar Than Naing, 趙東威, 瀧澤俊広. マウス胎盤における H19 遺伝子の発現解析: リアルタイム PCR 解析. 第 22 回日本胎盤学会学術集会. 2014 年 10 月 3 日. 京都大学芝蘭会館(京都府・京都市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

瀧澤 俊広 (TAKIZAWA Toshihiro)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90271220

### (2)研究分担者

吉田 寛 (YOSHIDA Hiroshi)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60246999

谷合 信彦 (TANIAI Nobuhiko)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20287725

水口 義昭 (MIZUGUCHI Yoshiaki)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70409217