

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461994

研究課題名(和文) histone mRNA/microRNA経路を標的とした癌治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of regulating system in histone mRNA and microRNA expression in upper digestive tract cancer

研究代表者

岩谷 岳 (Iwaya, Takeshi)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：70405801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：上部消化管癌(食道癌・胃癌)において進行癌では多数のhistone mRNAが発現上昇し、これを同時に制御するmicroRNA 760 (miR-760) を含む数個のmicroRNAが存在することを示した。しかしmiR-760単独およびmiR-1276, miR-4766-5pとの併用した遺伝子強制発現では、胃癌細胞の細胞機能変化やhistone mRNA発現変化は生じなかった。Circular RNAがmicroRNAをスポンジすることでmicroRNA発現を抑制し、histone mRNAの発現が上昇する機構が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Upregulation of multiple histone mRNA and downregulation of several microRNA (miR-760, miR-1276, and miR-4766-5p) which were targeting 3' untranslated regions of histone mRNAs were observed in gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. However, overexpression of these microRNAs could not change the cellular function of histone mRNA expression in cancer cells. Therefore, another mechanism is thought to be involved in regulating histone mRNA and microRNAs except for direct binding of these RNAs. In this study, we proposed a new mechanism that circular RNA might act as microRNA sponges and downregulated histone mRNAs in gastric cancer cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：ヒストンmRNA microRNA 胃癌 食道癌

1. 研究開始当初の背景

乳癌や大腸癌では血中遊離癌細胞 (Circulating tumor cell: CTC)の数が多く予後不良である。一方、胃癌患者の末梢血および骨髄中細胞での上皮系マーカー、腫瘍マーカーを用いた qRT-PCR による遊離癌細胞検索では、早期癌においても高頻度に遊離癌細胞陽性であり、胃癌の転移・浸潤には遊離癌細胞以外の因子が強く関与していると思われた (Mimori K et al, Clin Cancer Res, 2008)。癌の浸潤・転移には癌細胞以外に、骨髄に由来する癌関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblast: CAF)、腫瘍関連マクロファージなどさまざまな癌関連宿主細胞が関与している。われわれは進行胃癌患者の原発巣・骨髄にて数十個のヒストン遺伝子の発現が上昇しており、これらのヒストン遺伝子はその 3' UTR に数個の共通した microRNA との結合部位を有していた。microRNA 760 (*miR-760*)の発現は、進行胃癌患者ではが早期癌患者に比べて有意に低下し、*miR-760* 低発現群は予後不良であった。胃癌患者ではその進行度により Histone mRNA /*miR-760* が対照的な発現パターンを示した。以上より、histone mRNA を microRNA が制御するという新しい代謝経路を見出し、この制御機構の異常すなわち (histone mRNA 上昇/*miR760* 減少) が胃癌の浸潤・転移に関与することを明らかにした。 (Iwaya T et al, Clin Cancer Res, 2013)

2. 研究の目的

本研究では、先行研究の結果を踏まえ、以下の点に焦点をあて histone mRNA/microRNA 機構を標的とした新規癌治療法の可能性を検討する。

1) 他癌腫による検討

悪性腫瘍における histone 遺伝子群の発現上昇は、骨肉腫、髄膜腫再発巣の網羅的遺伝子解析でも報告されている。histone mRNA/microRNA 機構の異常が他の癌腫でも生じている可能性を検討するため、本検討では胃癌に加え食道扁平上皮癌についても検討する。

2) 癌関連宿主細胞の影響

原発巣では腫瘍細胞が大部分を占めると思われるが、骨髄中では癌細胞は僅かである。にもかかわらず原発巣・骨髄とも histone mRNA/*miR-760* の発現パターンが類似していた。これは癌細胞のみでなく宿主細胞もこれらの発現状態に同様に寄与していると考えられる。本研究では癌関連非腫瘍細胞 (特に線維芽細胞) における histone mRNA/microRNA 機構についても検討を加える。

3) 複数の microRNA による histone 制御

胃癌培養細胞における *miR-760* による histone mRNA/タンパクの制御は、20-30%程度で持続時間は短かったことから、他の

microRNA による代償機構の存在が示唆される。本研究では *miR-760* 以外の histone 制御が予測される microRNA との併用効果について検討する。

4) histone mRNA の構造と microRNA

Histone mRNA は通常の RNA と異なり poly(A) tail を持たず、3' UTR は stem loop 構造を呈している。この stem loop に stem loop binding protein (SLBP) が結合することで、histone mRNA の代謝が行われる。microRNA 結合部位はこの stem loop 内に存在しており、この状態では microRNA は histone mRNA に結合しにくいものと思われる。ところが、癌の一部の状態では poly(A) histone mRNA が形成されることが知られている。本研究では histone mRNA の構造変化と microRNA の関係についても検討する。

3. 研究の方法

1) 食道扁平上皮癌における histone クラスター遺伝子群の mRNA 発現について RNA sequence を用いて解析を行った。microRNA 結合予測アルゴリズムを用いて、食道癌で発現変動を示す microRNA の検索を行い、候補 microRNA について qRT-PCR を用い食道癌症例での発現検討を行った。

2) 胃癌において発現上昇を認める histone mRNA と結合が予測される *miR-760* 以外の microRNA (*miR-1276*, *miR4766-5p*, *miR-1291*, *miR-4521*) の発現状態や導入効果および、複数の microRNA 併用による効果について検討した。

3) 骨髄由来線維芽細胞 (UE6E7T-12) を用い、胃癌細胞株との共培養を行い、histone mRNA/microRNA の発現変化を検証した。

4) histone mRNA の構造変化と microRNA の発現変化について circular RNA との関連を検討した。

4. 研究成果

食道扁平上皮癌における histone mRNA/microRNA 760 発現

食道癌 3 症例における RNA seq 解析では、胃癌での検討と同様に食道癌組織では正常組織に比べ 36 個の histone 遺伝子の発現上昇が見られた。mRNA-microRNA の結合予測アルゴリズム (TargetScan 7.0) を用いた解析では、microRNA-mRNA の結合部となる seed 配列との相補塩基数、種間での保存状態により結合予測の確度が求められるが、食道癌で発現上昇が見られた 36 個の histone 遺伝子のうち 20 個は *miR-760* との結合が予測された (表 1)。食道癌組織における qRT-PCR による *miR-760* 発現解析では、胃癌と同様進行がん症例で発現上昇が見られた。これにより胃癌における *miR-760* による複数の histone mRNA の制御機構が他癌腫でも生じている可能性が示唆された。

Histone mRNA	Normal (n = 3)	Tumor (n = 3)	Tumor/Normal	microRNA (Conceived)
HIST1H3G	0.03	3.61	135.25	NF
HIST1H3C	0.03	0.73	27.50	miR-760
HIST1H2BL	0.03	0.71	26.75	miR-760
HIST1H2BF	0.16	2.14	13.35	miR-6807-3p
HIST1H3I	0.07	0.77	11.50	miR-760
HIST1H2BI	0.03	0.31	10.33	miR-760
HIST1H2AL	0.11	1.08	9.56	miR-760
HIST1H2BM	0.14	1.36	9.47	miR-760
HIST1H2AH	0.12	1.13	9.44	miR-760
HIST1H2AI	0.08	0.70	8.40	miR-9-5p
HIST1H3F	0.07	0.56	8.40	miR-760
HIST1H4B	0.13	1.00	7.87	NF
HIST1H1B	0.13	1.01	7.60	miR-760
HIST1H2BH	1.28	8.11	6.32	miR-182-5p
HIST1H3H	0.80	4.68	5.85	miR-760
HIST1H2AM	0.37	2.10	5.74	miR-760
HIST1H2AE	3.43	19.41	5.66	miR-9-5
HIST1H4I	0.48	2.13	4.41	NF
HIST1H2AJ	0.17	0.69	4.04	miR-760
HIST1H2AG	0.34	1.34	3.94	NF
HIST2H2AC	0.80	3.14	3.92	NF
HIST1H3J	0.24	0.92	3.82	miR-760
HIST1H1D	0.60	2.18	3.61	miR-760
HIST1H4E	0.78	2.66	3.40	NF
HIST1H4D	0.67	2.28	3.40	miR-328-3p
HIST2H2BF	1.37	4.39	3.21	miR-760
HIST1H1C	31.90	101.71	3.19	miR-760
HIST2H2AB	0.06	0.18	3.12	NF
HIST1H2BN	0.21	0.64	3.05	miR-760
HIST1H4H	1.32	4.02	3.04	miR-9-5p
HIST1H2BD	15.54	42.47	2.73	miR-194-5p
HIST1H2BK	17.47	47.68	2.73	NF
HIST1H2AK	0.26	0.62	2.40	miR-760
HIST3H2A	3.31	7.92	2.39	miR-760
HIST1H2AB	0.23	0.50	2.19	miR-760
HIST1H2BJ	1.94	4.00	2.06	NF

表 1. 食道癌組織における histone mRNA 発現と結合 micro RNA

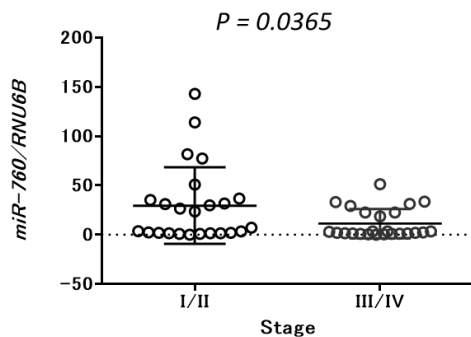


図 1. 食道癌原発巣組織における miR-760 発現状態

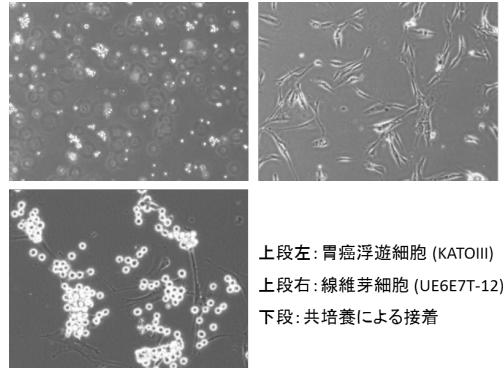
Histone mRNA に結合する複数の microRNA の導入効果

胃癌細胞に PremiR-760 を導入し miR-760 の過剰発現をさせると、他の histone mRNA 結合 microRNA である miR-1276, miR-4766 の発現低下が確認された。Histone mRNA の調節には複数の microRNA が関与し、それぞれによる代償機構が存在するものと思われた。したがって単独の microRNA の補充のみでは、癌の抑制にはつながらない可能性が考えられた。

胃癌細胞と骨髄由来線維芽細胞の共培養時の histone mRNA/miR-760 発現

浮遊胃癌細胞 KATOIII と骨髄由来線維芽細胞 UE6E7T-12 を共培養すると浮遊胃癌細胞はすべて線維芽細胞に付着する興味深い現象

が確認された(図2)。腹膜播種や転移に関するメカニズムとの関連が示唆されるが、microRNA の強制発現や knockdown では形態学的変化は観察されなかった。



上段左: 胃癌浮遊細胞 (KATOIII)
上段右: 線維芽細胞 (UE6E7T-12)
下段: 共培養による接着

図 2. 浮遊胃癌細胞と骨髄由来線維芽細胞の共培養実験

histone mRNA の構造変化と microRNA の発現変化

histone mRNA の 3' 末端には複数の microRNA 結合部位が存在する。通常は stem loop を形成するが、癌では poly A 型の histone mRNA が生成される。microRNA の発現低下が histone mRNA の発現上昇を引き起こす。

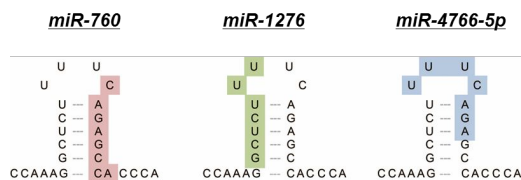


図 3. Histone mRNA の 3' UTR の塩基配列と microRNA 結合部位

複数の microRNA が同時に制御される機構として、近年注目される circular RNA (環状 RNA) について考察した。circRNA は mRNA が成熟される過程で通常と逆方向で行われる back splicing により形成される環状の RNA である。circRNA は microRNA スポンジとして機能することが知られている。Histone mRNA 部位に存在する circRNA もデータベース上複数予測されているが、胃癌細胞を用いた PCR 検証実験でも数百 bp の circRNA の存在が示唆された(図4)。

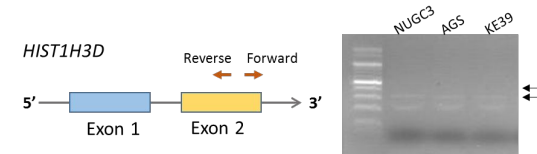


図 4. Circular histone mRNA の検索。HIST1H3D 上で逆方向に Primer をデザイン。胃癌細胞株の RNA で RT-PCR 増幅

これまでの検討で、少数の microRNA が数十個の histone 遺伝子の 3'UTR に結合部位を持ち、癌の進行に伴い histone mRNA の発現上昇、microRNA の発現低下を起こしていることが明らかにしたが、histone mRNA を標的とする microRNA を単一あるいは複数同時に導入しても、細胞機能変化や histone mRNA の大きな発現変化を示せなかった。Histone mRNA と microRNA の発現調節機構に circular RNA が介在すること、すなわち circRNA による複数の histone 結合 microRNA (miR-760, miR-1276, miR-4766-5p など) のスポンジによる microRNA 発現の低下から多数の histone mRNA の発現上昇が誘導されるシステムについて検証中である (図 5)。

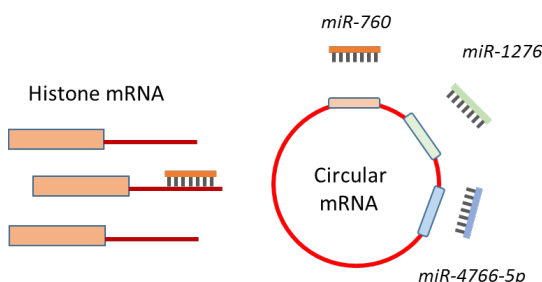


図 5. Histone mRNA/microRNA 発現調節における Circular RNA のスポンジ機能による介在

circRNA の発現量は通常の mRNA の発現量の 2-4%と予測されている。将来的には原発巣および骨髄、血液での微量 microRNA の変化や circRNA の定量による、癌の進行度や予後診断を検討している。近年、腫瘍細胞から遊離した血中の癌細胞 (CTC) や血漿中遊離 DNA や RNA を用いた Liquid biopsy が注目されている。これまで血漿・末梢血単核球の分離に広く用いられてきた遠心分離採血管 (Vacutainer 採血管、BD 社) は、採血後 2 時間以内に遠心分離を行い血漿を分離する必要があった。これは保存中に採血管内で末梢血単核球の破壊が起こり、細胞中の DNA や RNA が血漿中に混入してくるためであり、採血直後の約 1 時間の遠心分離操作は研究および臨床応用に向けて大きな時間的制約であった。今回われわれは、保存血中の細胞膜を安定に保ち、長期間保存後も血漿中の DNA、RNA 量の検索を可能とした新規採血管 Cell free DNA BCT 採血管 (BCT, Streck 社) の保存許容期間についても検討した。7 人の健康人より血液を 96mL 採取し、Vacutainer 採血管、BCT 採血管 6 本ずつ計 12 本に分注し保存。Day 0, 3, 6, 9, 12, 14 の 6 点で 1 組ずつ血漿分離を行い血漿中 DNA 量を比較した。Vacutainer 採血管では 3 日目より有意な血漿中 DNA の増加を認めた (図 6)。また、BCT 採血管では 14 日目のみ採血直後と比較して血漿中 DNA

量の増加が見られたが、6 日目以降から血漿 DNA の持続的な増加が見られており、採血後血漿分離までの保存期間は 5 日以内が望ましいものと思われた。

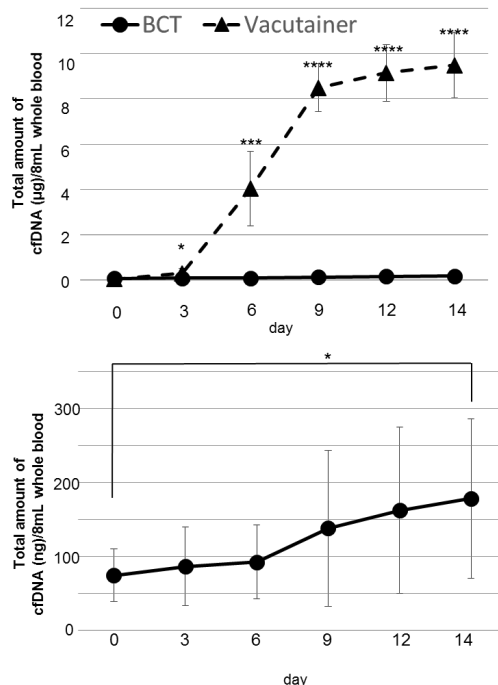


図 6. 血漿分離採血管別の血漿中 DNA 量の経時変化。(上) Vacutainer 採血管と BCT 採血管における血漿 DNA 量の比較 (下) BCT 採血管における血漿 DNA 量の推移

Streck 社より血漿中 RNA を同様に安定に長期間保存可能な採血管 Cell free BCT RNA 採血管も開発、販売され、今後目的とする癌患者の血漿中 microRNA、circular RNA の解析を予定している。

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 14 件)

1. Ishida K, Ito C, Ohmori Y, Kume K, Sato KA, Koizumi Y, Konta A, Iwaya T, Nukatsuka M, Kobunai T, Takechi T, Nishizuka SS. Inhibition of PI3K suppresses propagation of drug-tolerant cancer cell subpopulations enriched by 5-fluorouracil. *Sci Rep*. 2017 May 23;7(1):2262. doi: 10.1038/s41598-017-02548-9. PMID: 28536445
2. Akiyama Y, Iwaya T, Endo F, Shioi Y, Chiba T, Takahara T, Otsuka K, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Kimura Y, Sasaki A. Stability of cervical esophagogastronomy via hand-sewn anastomosis after esophagectomy for esophageal cancer. *Dis Esophagus*. 2017 May 1;30(5):1-7. doi: 10.1093/dote/dow007. PMID: 28375439.

3. Konosu M, Iwaya T, Kimura Y, Akiyama Y, Shioi Y, Endo F, Nitta H, Otsuka K, Koeda K, Sasaki A. Peripheral vein infusions of amino acids facilitate recovery after esophagectomy for esophageal cancer: Retrospective cohort analysis. *Ann Med Surg (Lond)*. 2017 Jan 16;14:29-35. doi: 10.1016/j.amsu.2017.01.016. eCollection 2017 Feb. PMID: 28138387
4. Iwaya T, Sawada G, Amano S, Kume K, Ito C, Endo F, Konosu M, Shioi Y, Akiyama Y, Takahara T, Otsuka K, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Nishizuka S, Sasaki A, Mimori K. Downregulation of ST6GALNAC1 is associated with esophageal squamous cell carcinoma development. *Int J Oncol*. 2017 Feb;50(2):441-447. PMID: 28035351.
5. Kume K, Ikeda M, Miura S, Ito K, Sato KA, Ohmori Y, Endo F, Katagiri H, Ishida K, Ito C, Iwaya T, Nishizuka SS. α -Amanitin Restrains Cancer Relapse from Drug-Tolerant Cell Subpopulations via TAF15. *Sci Rep*. 2016 May 16;6:25895. doi: 10.1038/srep25895. PMID: 27181033
6. Shioi Y, Sasaki A, Nitta H, Umemura A, Baba S, Iwaya T, Kimura Y, Otsuka K, Koeda K, Mizuno M, Kumagai K, Kamada T, Mukaida M, Okabayashi H. Two-stage surgery to repair a dissecting abdominal aortic aneurysm in a severely obese patient: Open bifurcated graft replacement after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Asian J Endosc Surg*. 2016 May;9(2):149-51. doi: 10.1111/ases.12260. PubMed PMID: 27117966.
7. Akiyama Y, Iwaya T, Shioi Y, Endo F, Ishida K, Kashiwaba M, Otsuka K, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Kimura Y, Sasaki A. Successfully treated advanced esophageal cancer with left axillary lymph node metastasis and synchronous right breast cancer: a case report. *Surg Case Rep*. 2015 Dec;1(1):94. doi:10.1186/s40792-015-0102-9. PMID: 26943418
8. Uchi R, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Hirata H, Sugimachi K, Sawada G, Iwaya T, Kurashige J, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Chiba K, Shiraishi Y, Nagae G, Yoshida K, Nagata Y, Haeno H, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Iinuma H, Sasaki S, Nagayama S, Yamada K, Yachida S, Kato M, Shibata T, Oki E, Saeki H, Shirabe K, Oda Y, Maehara Y, Komune S, Mori M, Suzuki Y, Yamamoto K, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mimori K. Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. *PLoS Genet*. 2016 Feb 18;12(2):e1005778. doi:10.1371/journal.pgen.1005778. PubMed PMID: 26890883; PubMed Central PMCID:PMC4758664.
9. Koeda K, Chiba T, Noda H, Nishinari Y, Segawa T, Akiyama Y, Iwaya T, Nishizuka S, Nitta H, Otsuka K, Sasaki A. Intracorporeal reconstruction after laparoscopic pylorus-preserving gastrectomy for middle-third early gastric cancer: a hybrid technique using linear stapler and manual suturing. *Langenbecks Arch Surg*. 2016 May;401(3):397-402. doi: 10.1007/s00423-016-1378-3. PubMed PMID: 26883539.
10. Sawada G, Niida A, Uchi R, Hirata H, Shimamura T, Suzuki Y, Shiraishi Y, Chiba K, Imoto S, Takahashi Y, Iwaya T, Sudo T, Hayashi T, Takai H, Kawasaki Y, Matsukawa T, Eguchi H, Sugimachi K, Tanaka F, Suzuki H, Yamamoto K, Ishii H, Shimizu M, Yamazaki H, Yamazaki M, Tachimori Y, Kajiyama Y, Natsugoe S, Fujita H, Mafune K, Tanaka Y, Kellsell DP, Scott CA, Tsuji S, Yachida S, Shibata T, Sugano S, Doki Y, Akiyama T, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mori M, Mimori K. Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Japanese Population. *Gastroenterology*. 2016 May;150(5):1171-82. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.035. PubMed PMID: 26873401.
11. Sato KA, Hachiya T, Iwaya T, Kume K, Matsuo T, Kawasaki K, Abiko Y, Akasaka R, Matsumoto T, Otsuka K, Nishizuka SS. Individualized Mutation Detection in Circulating Tumor DNA for Monitoring Colorectal Tumor Burden Using Cancer-Associated Gene Sequencing Panel. *PLoS One*. 2016 Jan 4;11(1):e0146275. doi: 10.1371/journal.pone.0146275. PubMed PMID: 26727500; PubMed Central PMCID:PMC4699643.
12. Akiyama Y, Iwaya T, Shioi Y, Endo F, Chiba T, Otsuka K, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Uesugi N, Kimura Y, Sasaki A. Effectiveness of neoadjuvant chemotherapy with cisplatin and irinotecan followed by surgery on small-cell carcinoma of the esophagus: A case report. *Int J Surg Case Rep*. 2015;17:121-5. doi:10.1016/j.ijscr.2015.11.005. PubMed PMID: 26615446; PubMed Central PMCID:PMC4701824.
13. Akiyama Y, Iwaya T, Konosu M, Shioi Y, Endo F, Katagiri H, Nitta H, Kimura T, Otsuka K, Koeda K, Kashiwaba M, Mizuno M, Kimura Y, Sasaki A. Curative two-stage resection for synchronous triple cancers of the esophagus, colon, and liver: Report of a case. *Int J Surg Case Rep*. 2015;13:1-4. doi:10.1016/j.ijscr.2015.05.032. PubMed PMID: 26074482; PubMed Central PMCID:PMC4529638.
14. Yokobori T, Suzuki S, Miyazaki T, Sohda M, Sakai M, Tanaka N, Ozawa D, Hara K, Honjo H, Altan B, Fukuchi M, Ishii H, Iwatsuki M, Sugimachi K, Sudo T, Iwaya T, Nishida N, Mimori K, Kuwano H, Mori M. Intestinal epithelial culture under an air-liquid interface: a tool for studying

human and mouse esophagi. *Dis Esophagus*.
2016 Oct;29(7):843-847. doi:
10.1111/dote.12346. PubMed
PMID:25809505.

〔学会発表〕(計 5件)

1. 第 117 回日本外科学会 2017/04/27 - 2017/04/29. 横浜. Target sequence による食道癌変異遺伝子同定効率に関する検討. 岩谷 岳, 遠藤 史隆, 西塚 哲, 秋山 有史, 塩井 義祐, 高原 武志, 大塚 幸喜, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章
2. 第 50 回制癌剤適応研究会 2017/03/17. 徳島. 食道癌パネルを用いた食道扁平上皮癌症例の遺伝子変異解析. 岩谷 岳, 遠藤 史隆, 西塚 哲, 八重樫 瑞典, 千葉 丈広, 川岸 涼子, 有末 篤弘, 秋山 有史, 高原 武志, 大塚 幸喜, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章
3. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. Washington, D.C. Mutation detection by target sequence analyses using tissue-specific panels in esophageal squamous cell carcinoma. Takeshi Iwaya, Fumitaka Endo, Kohei Kume, Yasushi Sasaki, Takashi Tokino, Satoshi Nishizuka
4. 75 回日本癌学会 2016/10/06 - 2016/10/08. 横浜. Mutation detection by target sequence analyses using cancer-related gene panel in esophageal squamous cell carcinoma. Iwaya T, Fumitaka Endo, Kohei Kume, Yasushi Sasaki, Takashi Tokino, Genta Sawada, Atsushi Niida, Koshi Mimori, Satoshi Nishizuka
5. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016. New Orleans, Louisiana. Multiple genes on chromosome 17q25 were involved in sporadic esophageal squamous cell carcinoma development. Iwaya T, Suburu Amano, Fumitaka Endo, Yuji Akiyama, Yoshihiro Shioi, Kohei Kume, Satoshi Nishizuka, Chie Ito, Akira Sasaki, Koshi Mimori

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩谷 岳 (Iwaya Takeshi)
岩手医科大学・医学部・外科・講師

研究者番号 : 70405801

(2) 研究分担者

西塚 哲 (Nishizuka Satoshi)
岩手医科大学・医歯薬総合研究所・
教授

研究者番号 : 50453311