

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号	12102
研究種目	挑戦的萌芽研究
研究期間	2011～2012
課題番号	23650611
研究課題名（和文）	アンチセンス RNA による肝臓に対する新規診断法の開発とテーラーメイド治療への応用
研究課題名（英文）	New method of differential diagnosis and tailor-made treatment for hepatocellular carcinoma by antisense RNA
研究代表者	
	大河内 信弘 (OHKOHCHI NOBUHIRO)
	筑波大学・医学医療系・教授
	研究者番号：40213673

研究成果の概要（和文）：肝細胞癌の遺伝子異常に関しては未だコンセンサスを得られていない。本研究ではアンチセンス RNA に注目し、肝細胞癌でのセンス／アンチセンス RNA の網羅的解析を行い、癌部非癌部の比較で発現変化に有意差のあるアンチセンス RNA を同定した。さらに、C 型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌を対象に詳細な分析を進め、アンチセンス RNA の発現に癌部・非癌部の比較で発現変化に有意差のあること、及び組織型毎の比較でも発現に有意差のあることを確認した。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma (HCC) initiation remain unclear. Recent reports have demonstrated that natural antisense transcripts with complementary sequences to messenger RNA have important functions such as the stabilization and silencing of mRNA. We investigated the regulation of natural antisense transcripts (NATs) in human HCC for their possible involvement in HCC development. We identified as up- and down-regulated in HCC tissues, compared to non-cancerous liver tissue. We also focused on HCV-associated HCCs and evaluated. Differential expression of antisense transcripts was observed between HCC and non-cancerous tissue. The sense and antisense expression profiles were analyzed with regard to histological findings of HCC. We clarified different expression of NATs among the histological findings of HCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：バイオマーカー、アンチセンス RNA、肝臓、スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、癌とエピジェネティクスの関連が徐々に明らかになり、国内外で多くの研究がなされている。大腸癌においては、MLH1 遺伝子がプロモーターのメチル化により不活性化されていることなど、発癌経路の解明が進んでいる。一方で、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA が、高次クロマチン構造制御や遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることも明らかとなった。また、網羅的なトランスクリプトーム解析の結果、予想を上回るゲノム領域において、既知の転写単位と相補的な配列を有し、ノンコーディング RNA の一種であるアンチセンス RNA が細胞内で転写されていることが示された。このアンチセンス RNA がセンス鎖遺伝子の発現制御になんらかの役割を果たしていること (Yu W, *Nature*, 2008) (Okada Y, *Hum.Mol.Genet.*, 2008)、p53 にも内在性のアンチセンス RNA が存在しその調節をしていること (Nancy R, *Sci.Signal.*, 2009) などが報告され、従来考えられていたよりも幅広く、重要な役割を果たしていると推測される。しかし未だアンチセンス RNA の働きは不明である。肝癌は東アジア地域での罹患率、並びに国内の死亡率の年次推移ともに依然として高く、早期発見法と根本的治療が強く求められている。一方で、特有の症状は少なく、診断時には進行していることが多い。これまで肝癌の診断は超音波検査、CT による画像診断、血液検査が主体であり、ゲノム DNA や RNA による、発生メカニズムの解析やテーラーメイド治療、予後予測に結びつく癌の層別化は行われていないのが現状である。また、肝癌の発症や進行に関与するアンチセンス RNA の研究報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究では肝癌の癌組織及び、患者血液中のアンチセンス RNA の発現変化を解析し、その層別化を行い、発癌過程に関与するアンチセンス RNA の機能解明や、予後予測に結びつく因子の発見を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組織中のセンス/アンチセンス RNA のカスタムマイクロアレイによる網羅的解析

筑波大学附属病院で行われる肝癌の手術症例の内、同意を得た症例に限り切除検体から癌部と非癌部を採取し、RNA を抽出した。抽出した RNA を我々が独自に設計した 22,000 対のセンス/アンチセンス RNA 検出プローブを搭載したカスタムマイクロアレイで用いて

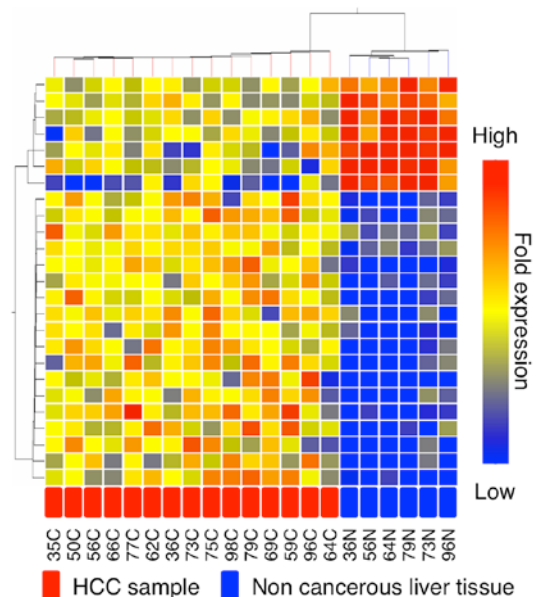
網羅的に解析し、癌特異的に発現が変化するセンス/アンチセンス RNA を同定した。さらに、癌部において組織型毎に RNA の発現が異なることを確認した。解析は GeneSpringGX を用いて行った。

(2) 末梢血中のセンス/アンチセンス RNA のカスタムマイクロアレイによる網羅的解析

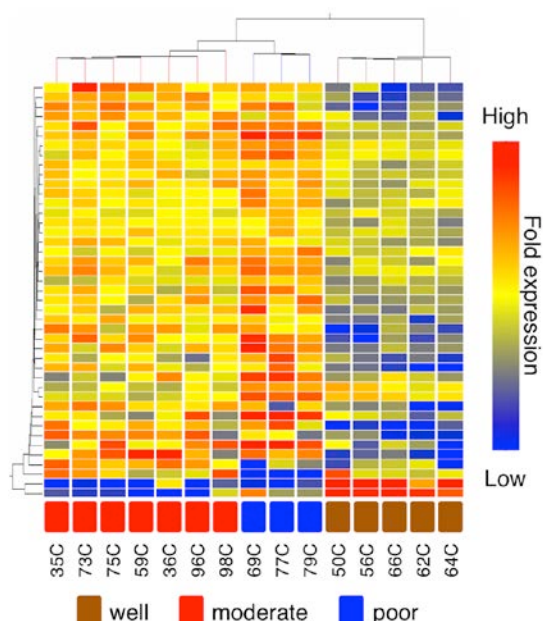
筑波大学附属病院で行われる肝癌手術の患者 (術前) 及び健康人から同意を得た上で末梢血を採取し、RNA を抽出した。抽出した RNA から組織と同様の手技を用い、癌患者に特異的に発現変化が見られるセンス/アンチセンス RNA 検出を同定した。

4. 研究成果

(1) 肝癌症例の癌部と非癌部の組織中のセンス/アンチセンス RNA のカスタムマイクロアレイによる網羅的解析を行うことができた。その結果、癌特異的に発現が変化するセンス/アンチセンス RNA を同定した。さらに肝癌の中でも C 型肝炎ウイルス陽性症例に症例をしばり、検討を行った。対象は C 型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌であり、癌部 15 例、非癌部 6 例で検討を行った。その結果、癌特異的な発現変化を認めるセンス/アンチセンス RNA を同定した。これらのアンチセンス RNA についてクラスター解析を行ったところ、癌部と非癌部の明確な分類が可能であった (図 1)。



さらに癌部において組織型による遺伝子発現に有意差のある遺伝子を同定した。これらのアンチセンス RNA についてもクラスター解析を行い、組織型による層別化が可能であった (図 2)。



組織における遺伝子解析により、肝細胞癌における癌部と非癌部の相違や、組織型の相違を反映する特徴的な発現パターンが存在することが明らかとなり、アンチセンス RNA の発現プロファイル解析による腫瘍診断の可能性が示唆された。

(2) 末梢血におけるアンチセンス RNA の発現解析については症例を集積中であるが、途中経過として担癌患者、非癌患者の比較で有意差のある、アンチセンス RNA の発現変化を認めている。今後より多くの症例を集積し、より精度の高い検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Nagai K, Kohno K, Chiba M, Pak S, Murata S, Fukunaga K, Kobayashi A, Yasue H, Ohkohchi N. Differential expression profiles of sense and antisense transcripts between HCV-associated hepatocellular carcinoma and corresponding non-cancerous liver tissue, *International Journal of oncology*, 40(6),1813-1820. 2012. doi: 10.3892/ijo.2012.1382. 査読有
- (2) Saito R, Kohno K, Okada Y, Osada Y, Numata K, Kohama C, Watanabe K, Nakaoka H, Yamamoto N, Kanai A, Yasue H, Murata S, Abe K, Tomita M, Ohkohchi N, Kiyosawa H. Comprehensive expressional analyses of antisense transcripts in colon cancer

tissues using artificial antisense probes. *BMC Med Genomics*. 16;4:42,2011. doi: 10.1186/1755-8794-4-42. 査読有

- (3) Chiba M, Murata S, Myronovych A, Kohno K, Hiraiwa N, Nishibori M, Yasue H, Ohkohchi N. Elevation and characteristics of Rab30 and S100a8/S100a9 expression in an early phase of liver regeneration in the mouse. *Int J Mol Med*. 27(4):567-74.2011. doi: 10.3892/ijmm.2011.614. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- (1) Nagai K, Pak S, Kohno K, Chiba M, Murata S, Yasue H, Ohkohchi N. Natural antisense transcripts analysis is effective for diagnosis and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver(EASL). 2011年4月2日. ICC Berlin, Berlin(Germany)
- (2) 永井健太郎、高野恵輔、千葉 満、朴 秀吉、村田聡一郎、安江 博、大河内信弘. 肝細胞癌におけるカスタムマイクロアレイを用いた癌関連ナチュラルアンチセンス転写産物の発現解析、第 47 回日本肝臓学会総会、2011年6月2日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：肝臓癌か否かの判定方法および肝臓癌の分化度の判定方法
 発明者：大河内信弘 他 5 名
 権利者：筑波大学
 種類：特許権
 番号：特願 2010-199297
 出願年月日：2010年9月6日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 信弘 (OHKOHCHI NOBUHIRO)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40213673

(2) 研究分担者

福永 潔 (FUKUNAGA KIYOSHI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20361339