

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：若手研究（B）	
研究期間：2011～2012	
課題番号：23701081	
研究課題名（和文）	アンチセンスRNAによる大腸癌の新規診断法の開発とサイレンシング治療への応用
研究課題名（英文）	Development of new diagnostic method using antisense RNA of the peripheral blood
研究代表者	
	小林 昭彦（KOBAYASHI AKIHIKO）
	筑波大学・医学医療系・講師
	研究者番号：10446552

研究成果の概要（和文）：本研究では大腸癌患者の末梢血中のRNAを抽出して網羅的解析を行い、アンチセンスRNAによる新しい診断法の開発を目的とする。大腸癌患者28例と健常者6例を対象として、アンチセンスRNAの網羅的解析を行った。大腸癌患者の血液中で健常人と変化しているアンチセンスRNAを20種同定した。これらのRNAは大腸癌患者と健常人を明確に区別することが可能であった。末梢血液中のアンチセンスRNAの測定が大腸癌の診断に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to develop a new diagnostic method by analyzing blood antisense RNA. Blood samples of 28 colon cancer patients and 6 healthy volunteers were collected and custom made microarray of blood RNA was performed. 20 sets of antisense RNAs were distinguished between colon cancer and healthy persons. By detecting antisense RNA of peripheral blood RNA is a useful tool for diagnosing colon cancer.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

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：アンチセンス RNA、癌、スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は年々増加の一途をたどっており、本邦での罹患数は第2位、死亡数は第3位である一方で、早期に発見できれば治癒可能な疾患である。現在行われている大腸癌のスクリーニング検査である便潜血検査は感度が約70%と低く、スクリーニング検査としては十分とは言えないため、新たな大腸癌スクリーニング法の開発は社会的急務である。

近年、DNAからメッセンジャーRNAの転写が起きる際約70%の遺伝子においてその相補的なRNAであるアンチセンスRNAが同時に転写されていることが明らかになってきた。さらにアンチセンスRNAが一部の癌抑制遺伝子を制御して蛋白質の発現を抑制していることが報告された(Yu W et al, Nature 2008)。このように癌の研究においてアンチセンスRNAが重要性を帯びてきたが、現在までのところ、

ヒトの癌に関してアンチセンスRNA の網羅的解析の報告は皆無である。近年臨床応用の観点から、血液中のRNA に関する研究が盛んに行われ、末梢血中には臓器に発現している遺伝子の80%以上が存在していることが報告された (Liew CC et al, J Lab Clin Med, 2006)。それらの遺伝子の中には疾患特異的に発現する遺伝子が含まれており、これら遺伝子発現の検査を、末梢血で行うことができれば、他の検査法に比べてより簡便に疾患の早期発見につなげることができると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では大腸癌におけるアンチセンスRNA の関与を明らかにし、健常人及び大腸癌患者の末梢血中の RNA を抽出して網羅的解析を行い、血液検査による大腸癌の新しいハイスループットスクリーニング法を開発することを目的とする。また申請時はアンチセンス RNA を用いた細胞株に対するサイレンシング療法の開発も目的として掲げた。

3. 研究の方法

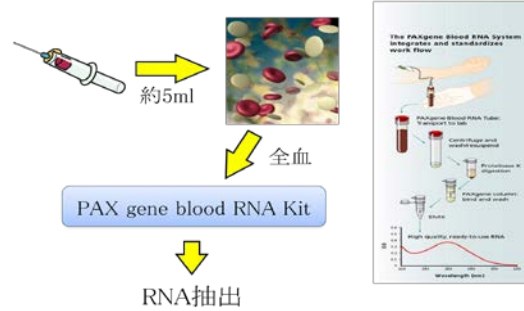
末梢血中のセンス/アンチセンスRNA のカスタムマイクロアレイによる網羅的解析

筑波大学附属病院で行われる大腸癌手術症例 (術前・術後) 及び健常人から、同意を得た上で末梢血を採取し、RNAを抽出する。我々が設計した22,000対のセンス/アンチセンスRNA検出プローブ (in situ hybridizationと共通のプローブ領域を使用) を搭載したカスタムマイクロアレイでセンス/アンチセンスRNA の発現を網羅的に解析し、癌特異的に発現が変化するセンス/アンチセンスRNAを同定する。

4. 研究成果

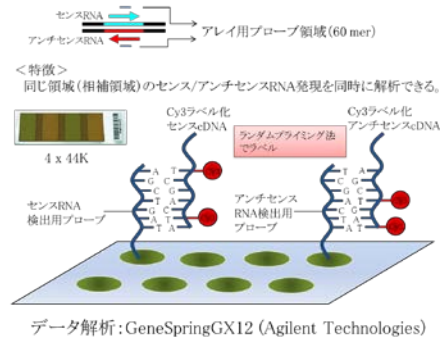
大腸癌術前患者24例と健常人6例を対象として、末梢血液中からPAX gene blood RNA kit を用いてtotal RNAを抽出した。

ヒト末梢血液中のRNA抽出法



ランダムプライミング法によってラベリングを行い、カスタムマイクロアレイを用いてセンス/アンチセンスRNA の網羅的解析を行った。発現解析にはGene Spring GX10を用いた。

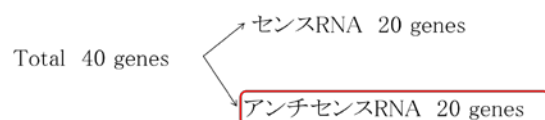
カスタムマイクロアレイ



また、大腸癌症例6例で術後1週間と3ヶ月の血液中のセンス/アンチセンスRNA を同様の方法で測定し、術前との比較を行った。大腸癌患者の血液中で健常人の血液中より転写量が有意水準で変化しているセンスRNAを20種、アンチセンスRNAを20種同定した (図1)。

図1 T-test 大腸癌患者(n=28) vs. 健常人(n=6)

❖ $P < 0.05$, Fold change > 2.0



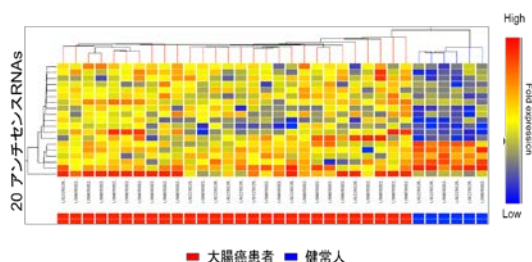
Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1(HDHD1)という遺伝子のアンチセンス RNA が健常人と癌患者で最も発現に差が認められた(図2)。

図2 Top 10 アンチセンスRNAs 大腸癌患者 vs. 健常人

Accession Number	Gene Symbol	Gene Name	Fold change
NM012080	HDHD1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1	5.68
NM005824	LRRC17	Leucine rich repeat containing 17	4.38
NM016630	SPG21	Spastic paraplegia 21	2.71
NM175611	GRIK1	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1	2.54
NM003290	TPM4	Tropomyosin 4	2.40
NM006516	SLC2A1	Solute carrier family 2, member 1	2.39
NM015317	PUM2	Pumilio homolog 2	2.36
NM024494	WNT2B	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B	-2.35
NM025140	CCDC92	Coiled-coil domain containing 92	2.31
NM001037738	NPM1	Nucleophosmin 1	2.31

階層的クラスター解析(hierarchical clustering analysis)を行うと、これらの20種のアンチセンスRNAは大腸癌患者と健常人を明確に区別することが可能であった(図3)。

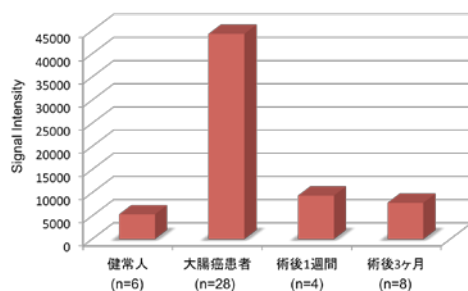
図3 クラスター解析 大腸癌患者(n=28) vs. 健常人(n=6)



また、術前と術後のHDHD1アンチセンスRNAの発現量を比較すると、術後は健常人と同程度まで低下することが明らかになった。

比較でも、これらのセンス/アンチセンスRNAに有意な発現変化を認めた(図4)。

図4 HDHD1アンチセンスRNAの術前後での発現変化



まとめ

末梢血液中のセンス/アンチセンスRNAの測定が大腸癌の診断に有用である可能性が示唆された。今後、症例数を増やしてさらなる検討を進めることで、血液を用いた大腸癌の新規診断法の開発が期待できる。アンチセンスRNAの機能解析およびサイレンシング医療への応用は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] 計4件

- ① [Kobayashi A](#), Oda T, Fukunaga K, Sasaki R, Ohkohchi N: Invasion of the hepatic artery is a crucial predictor of poor outcomes in gallbladder carcinoma. World J Surg 36: 645-650. 2012 査読有り
- ② 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. Int J Oncol 40: 1813-1820, 2012 査読有り
- ③ Ohara Y, Oda T, Yamada K, Hashimoto S, Akashi Y, Miyamoto R, [Kobayashi A](#), Fukunaga K, Sasaki R, Ohkohchi N: Effective delivery of chemotherapeutic nanoparticles by depleting host kupffer cells. Int J Cancer 131:2402-2410, 2012 査読有り
- ④ Nowatari T, [Kobayashi A](#), Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Ohkohchi N: Recognition of other organ involvement might assist in the differential diagnosis of IgG 4-associated sclerosing cholangitis

without apparent pancreatic
involvement: report of two cases. Surg
Today 42: 1111-1115, 2012 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

- ① 高野恵輔、朴秀吉、永井健太郎、千葉 満、
村田聡一郎、久倉勝治、稲川 智、安江
博、大河内信弘:血液中センス/アンチセ
ンス RNA を用いた大腸癌の新規診断法の
開発. 第 112 回日本外科学会定期学術集
会 (千葉) 4 月 12 日-14 日, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 昭彦 (KOBAYASHI AKIHIKO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 10446552