

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究
分担研究報告書（平成25年度）

次世代シーケンスを用いたB型肝炎血中体液マイクロRNAの網羅的解析

研究分担者 田原栄俊 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨

次世代シーケンサーを用いたB型肝炎排除のための網羅的解析から、B型肝炎の予後診断およびB型肝炎根治のための治療法の開発をめざす。本研究では、HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織から癌部および非癌部の検体を用いてIonPGMを用いた次世代シーケンス解析を行った。既知のマイクロRNAに関しては、非がん部比較してHBVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ41種、21種を見いだした。HCVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ10種、11種を見いだした。非ウイルス肝がんでは顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ29種、23種を見いだした。これらの結果から肝臓癌で共通に増加するマイクロRNAとして3種見いだすことに成功した。

A. 研究目的

肝臓癌の発症には、B型肝炎やC型肝炎などのウイルス性肝炎からの発症と非ウイルス性の肝がんがある。本研究では、HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織から癌部および非癌部の検体を用いてライフテクノロジーズIonPGMを用いた次世代シーケンス解析を行い、HBVウイルス性肝癌、HCVウイルス性肝癌、非ウイルス性肝癌の発生におけるマイクロRNAの発現変化を網羅的に明らかにして、肝炎から肝臓癌へと移行するリスク診断マーカーの同定を目的とする。

B. 研究方法

HBV感染性肝がん患者8名（男性7名、女性1名）、HCV感染性肝がん10名（男性6名、女性4名）、非ウイルス性肝がん7名（男性4名、女性3名）から、採取した癌部組織および非がん部組織を採取した。

採取した組織から、RNAを精製して、Agilent bioanalyzerを用いて、精製されたRNAの品質を確認した。

精製したRNAを簡易型次世代シーケンサーIonPGMシステムを用いて、RNAシーケンスを行い網羅的解析し疾患に

より変動するマイクロRNAを明らかにする。

得られた次世代シーケンスデータを既知のマイクロRNAデータベース配列と照合する解析を行い、そのリード数からそれぞれの組織で発現しているマイクロRNAを定量する。

次世代シーケンスで解析した既知のマイクロRNAの定量解析データをデータベース化し、ウイルス肝炎、HBV肝がん、HCV肝癌と比較して、肝臓癌におけるマイクロRNA変動を網羅的に解析し、肝臓癌への進行にともなうマイクロRNA変動による肝炎診断の開発に結びつける。

（倫理面への配慮）

本研究は、平成13年3月に3省（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）合同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」ならびに関連8学会によって作成された「遺伝学的検査に関するガイドライン」に準拠して行う。具体的には、資料は最初に連結可能匿名化し、広島大学医学部付属病院の指定する個人情報管理者の下に、一般医学研究よりも厳格な管理を行う。資料提供者からの質問・意見等に関しては、各病院が責任を持って対応す

る。

C. 研究結果

HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織から癌部および非癌部の検体からRNAを抽出して、ライフテクノロジーズIon PGM解析のためのバーコード標識を用いたライブラリー構築を行った。作成したライブラリーを318シークエンスタップを用いてIon PGMを用いた次世代シークエンズ解析をおこなった。得られたシークエンズデータをmiR baseのデータベースと照合して、既知のマイクロRNAに一致するものと、一致しない配列に分類し、既知のマイクロRNAについては、HBVウイルス性肝癌、HCVウイルス性肝癌、非ウイルス性肝癌におけるリード数によりその発現解析を個行った。その結果、同一患者の非がん部と比較してHBV肝癌組織で発現が顕著に増加するマイクロRNAとして、41種類を同定した。また、HCV肝癌組織で発現が顕著に増加するマイクロRNAとして10種を同定した。さらに、非ウイルス性肝癌では、29種類のマイクロRNAの発現が顕著に増加していた。これらの肝癌において増加するマイクロRNAのうち、何れのタイプの肝癌でも共通に発現が増加するマイクロRNAは、miR-221を含む3種であった。一方で、同一患者の非がん部で減少するマイクロRNAは、HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性発がんにおいて、それぞれ21個、11個、23個であった。何れのタイプの肝癌でも減少するマイクロRNAではなかった。ウイルス性発がんと非ウイルス性発がんので分類した場合、HBV肝癌で共通に増加していたマイクロRNAは5種、共通に減少していたマイクロRNAは4種であった。

D. 考察

HBV肝癌、HCV肝癌、非ウイルス性肝癌の3つのタイプの同一患者の肝がん組織におけるマイクロRNAの発現は、同一患者の非がん部と比較した結果、共通に変化しているマイクロRNAは見いだしたものの、マイクロRNAの発現変化はその発がん過程により大きく異なることが示唆された。つまり、ウイルス性と非ウイルス性での発がんの過程は、異なるエピゲノム変化に起因している可能性が考えられた。

癌部および非癌部の検体からRNA非癌部と比較して癌部で共通に発現が増加していたマイクロRNA3種のうち、miR-221は、E2F、MYC、NF- κ B、 β -catenin、RB1、細胞周

期に関わるWEE1、アポトーシスプロテアーゼ活性化因子1のAPAF1、ANXA1、転写抑制因子CTCFなどの重要な分子を直接の標的にして様々な癌種で寄与していることが知られており、肝癌発がんにおいてもmiR-221が大きく寄与している可能性が示唆された。その他の2種のマイクロRNAは、肝癌での関与の報告はないが、他の癌種では細胞周期やEMT(上皮間葉転移)を制御しているマイクロRNAの機能が知られており、今後肝癌の発がん過程におけるこれらのマイクロRNAの寄与について詳細に検討する必要がある。

E. 結論

本年度は、既知のマイクロRNAに関しては、非がん部比較してHBVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ41種、21種を見いだした。HCVで顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ10種、11種を見いだした。非ウイルス肝がんでは顕著に増加および減少するマイクロRNAとして、それぞれ29種、23種を見いだした。これらの結果から肝臓癌で共通に増加するマイクロRNAとして3種見いだすことに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Mikihisa Takano, Chieko Yamamoto, Keisuke Sambuichi, Keisuke Oda, Junya Nagai, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, and Ryoko Yumoto, Introduction of a Single Transporter Gene ABCA3 Directs RLE-6TN to More Type II-like Alveolar Epithelial Cells, MEMBRANE, Vol.38(5), 246-253(2013).

(2) Shiotani B, Nguyen HD, Håkansson P, Maréchal A, Tse A, Tahara H, Zou L., Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1., Cell Rep. 2013 May 30;3(5):1651-62,(10.1016/j.celrep.2013.04.018).

2. 学会発表

(1) Hidetoshi Tahara, Proteomic analysis of EV in senescence and cancer., ISEV Workshop on EV Proteomics and Lipidomics, Melbourne 2014

(2) 岡田恵、田原栄俊, 老化細胞由来エクソ

ソームの生物学的意義とがん微小環境への影響，がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム，東京都 2014

(3) 鶴崎慎也，塩谷文章，志戸岡友希，嶋本顕，田原栄俊，PRPF19 をターゲットとした siRNA の抗がん剤としての応用の可能性，第36回分子生物学会年会，神戸 2013

(4) 藏元達谷、福永早央里、石原えりか、山本佑樹、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，細胞老化における miR-22 の新規ターゲット探索と機能解析，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(5) 志戸岡 友希，鶴崎 慎也，塩谷 文章，嶋本 顕，田原 栄俊，細胞老化におけるPRPF19の発現抑制に關与するmiR-27bの解析，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(6) 石原えりか、竹下文隆、小坂展慶、高橋陵宇、藏元達谷、塩谷文章、嶋本顕、落谷孝広、田原栄俊，マクロファージ細胞を用いた新規 small RNA デリバリーモデルの構築への試み，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(7) 岡田恵，中村亜由美，宗岡美紗，塩谷文章，嶋本顕，田原栄俊，老化細胞由来exosomeの分泌メカニズムと生物学的意義の探索，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(8) 福永早央里、石原えりか、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，老化を調節する microRNA による膵臓がん細胞抑制メカニズムの解明，第36回分子生物学会年会，神戸 2013

(9) 池田梢，岡本沙矢香，二瀬由宇，田原栄俊，血漿中miRNAを用いた膵がん特異的なバイオマーカーの探索と次世代シーケンサーによる配列解析の可能性，第36回分子生物学会年会，神戸市 2013

(10) 田原栄俊，Therapeutic role of micro RNAs in cancer and cellular senescence，Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting，東京 2013

(11) 田原栄俊，老化を誘導する抗腫瘍核酸医薬の可能性，第72回日本癌学会学術総会，横浜市 2013

(12) 福永早央里、石原えりか、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，老化関連 microRNA による膵臓がん抑制メカニズム，第72回日本癌学会学術総会，横浜市 2013

(13) 塩谷文章、志戸岡友希、田原栄俊，PRPF19 の発現抑制は DNA 損傷を誘発し細胞老化を誘導する，第72回日本癌学会学術総会，横浜市 2013

(14) 福永早央里、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，老化関連miRNAによる膵臓がん抑制機構の解明，がん若手ワークショップ，蓼科 2013

(15) 志戸岡友希、塩谷文章、鶴崎慎也、田原栄俊，細胞老化におけるPRPF19の発現抑制に關与するmiRNAの解析，第5回日本RNAi研究会，広島市 2013

(16) 藏元達谷、石原えりか、福永早央里、山本佑樹、塩谷文章、嶋本顕、田原栄俊，細胞老化における miR-22 の新規ターゲット探索と機能解析，第5回日本RNAi研究会，広島市 2013

(17) 岡田恵、中村亜由美、宗岡美紗、藤田知信、河上裕、田原栄俊，細胞老化によって増加するexosome分泌の機能とメカニズム解析，第5回日本RNAi研究会，広島市 2013

(18) 田原栄俊，がんの発生・進展における

マイクロRNAの関与，名古屋大学H25特徴あるプログラム_キャンサーサイエンスコース，名古屋市 2013

(19) 田原栄俊，マイクロ RNA を用いた革新的がん診断・治療，第14回ホルモンと癌研究会，東京都文京区 2013

(20) 田原栄俊、岡本沙矢香，Ion Torrent(TM) を利用した最新研究成果，第2回Ion Torrent ユーザーグループミーティング，大阪市 2013

(21) 田原栄俊，老化を誘導する核酸抗がん剤にむけた exosome DDSの開発，第29回日本DDS学会学術集会，京都市 2013

(22) 塩谷文章、志戸岡友希、田原栄俊，PR PF19の発現抑制による細胞老化誘導とがん分子標的としての可能性，第17回日本がん分子標的治療学会学術集会，京都 2013

(23) M. Okada, A. Nakamura, M. Muneoka and H. Tahara，Characterization Of Exosomes Secreted From Senescent Fibroblasts.，ISEV 2013，Boston 2013

(24) H. Tahara, M. Okada, M. Muneoka and A. Nakamura，Secretary mechanism and functions of senescence-associated exosomes，ISEV 2013，Boston 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1. 出願番号：特願2014 - XXXXX

発明者：田原栄俊、落谷孝広

発明等の名称：アルツハイマーを診断できる方法

出願日：平成26年03月20日(2014年) 予定

2. 出願番号：特願2014-41594

発明者：田原栄俊、池田梢

発明等の名称：膵がんの検出を補助する方法

出願日：平成26年03月4日

出願国：日本国、国際特許申請予定

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし