

# 慢性胃炎において病的意義を持つ長鎖 ncRNA の探索

札幌医科大学 医学部 分子生物学講座

丸山 玲緒

## 1. 背景と目的

慢性炎症が発癌の母地となりうることは良く知られているが、その詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。ごく最近、タンパク質に翻訳されることのない長鎖non-coding RNA が細胞・生命活動において重要な役割を担っていることが分かってきたが、実際のヒトの慢性炎症組織における長鎖ncRNAの生理的・病的意義に関しては、現時点ではほとんど全く分かっていない。本研究ではピロリ菌感染胃炎から胃癌への発癌過程を研究モデルとして、次世代シーケンサーを用いて実際の臨床検体の分子プロファイルを多数解析することにより、「ピロリ菌感染による慢性胃炎や発癌リスクの上昇に、中心的な役割を果たす長鎖ncRNAがあるか」という点に関して明らかにしたい。

長鎖ncRNAによる炎症の制御とその破綻という新しい視点により、これまで見えなかった慢性炎症からの発癌に關与する新たな分子メカニズムの解明が期待されるとともに、本研究で産生される分子プロファイルと長鎖ncRNA候補リストは、この分野の研究コミュニティに有用なリソースとなると思われる。

## 2. 方法

生検検体のChIPSeq実験:

上部消化管内視鏡の生検検査で得られた検体の一部を回収後、腺管分離法により腺管成分を分離し、筆者が以前に構築した微量検体用のプロトコール(参考文献1)を用いてChIP(クロマチン免疫沈降)実験を行った。ChIP実験ではヒストン修飾H3K4me3、H3K27me3に対して次の抗体を用いた(Millipore 04-745, 07-449)。得られたChIPed-DNAにアダプター配列を付加しPCRで増幅後、次世代シーケンサーSOLiD4(Life Technologies)を用いて解析を行った。ごく微量のサンプルに対応するため、既定のプロトコールの一部を改変した。

データ解析:

ChIPSeq実験で得られたシーケンスリードを、Bowtieを用いてヒトゲノム(hg19)上にマッピングし、MACSによりピーク(ヒストン修飾領域)を検出した。その後の三次解析では、pythonとRによる独自のスクリプトを用いて、サンプル間でのピークの統合・比較解析や転写開始点との関連づけ等の解析を行った。lincRNAのアノテーションデータとしては、Linnらが公表しているデータベース(参考文献2)を利用した。公共データベースのTCGA(The Cancer Genome Atlas)にある胃癌175検体のRNASeqデータをダウンロードし、癌部と非癌部でのエキソンレベルでの発現量をt検定にて比較した。同じくTCGAからゲノムワイドなDNAメチル化データ(Infinium Human Methylation 450)をダウンロードし、特定の領域に存在するプローブの値を抽出し、癌部・非癌部での値を比較した。

長鎖ncRNAの発現解析、DNAメチル化解析:

各種胃癌細胞株からTrizolを用いてtotal RNAを抽出し、Super Script IIIにより逆転写後、SYBR greenを用いてqPCRを施行した。正常胃粘膜や各種正常組織のRNAは市販のものを使用した。DNAメチル化解析:臨床内視鏡検体や胃癌細胞株から従来法によりゲノムDNAを抽出し、EZ DNA methylation kit(Zymo Research)を用いてBisulfite処理を行った。そのBisulfite DNAとlincRNA1のプロモーター領域に設計されたプライマーを用いてpyro-sequencingを施行し、特定部位のCpGのメチル化レベルを定量した。

### 3. 結果

初めに内視鏡検査で得られた検体から腺管分離法により上皮細胞成分のみを分離する行程を最適化した。得られた微量の上皮細胞を用いてChIP実験とChIPSeq実験を行う各過程の条件も検討し、プロトコルの改良を行った。最終的には上部消化管内視鏡の生検検体を用いたChIPSeq法を確立し、安定したワークフローの構築を行うことができた。これまでにChIPSeq実験を36検体（H3K4me3を22検体、H3K27me3を14検体）、RNASeq実験を6検体で施行した。これらのデータに関しては現在も解析中であるが、本報告では非癌部7検体のChIPSeq (H3K4me3) データの解析結果を報告する。

本解析では非癌患者3例（健常者2例とピロリ陽性胃炎患者1例）と癌患者4例の非癌部背景粘膜におけるK4me3の比較を詳細に行い、長期的な慢性炎症による変化を検証した。各検体ではおよそ15,000から20,000カ所のピークをゲノム上に認めたが、そのうち全検体で共通するピークは11,398カ所であった。また非癌患者3例全例でピークを認めるが癌患者（非癌部背景粘膜）の2例以上でピークの消失する領域を3,140カ所、逆に非癌患者全例でピークを認めず癌患者の2例以上でピークを認める領域を4,267カ所同定した。前者の癌患者の背景粘膜でK4me3が消失する3,140カ所のうち、lincRNAの転写開始点と重なるものが150カ所あり、それらに着目し更に解析を進めた。

まず発現情報の参考として、大型公共データベースTCGAで公開されている胃癌175検体（癌部:148検体、非癌部:27検体）のRNASeqデータを解析した。上記150個のlincRNAのうち、転写開始点近傍のエキシソンの発現量が癌部で非癌部より有意に低下しているものは8個あり、そのうちのひとつlincRNA1に関して更に解析を行った。lincRNA1の発現量をqPCRで確認したところ、胃粘膜を含む多くの正常組織では低発現ながらもユビキタスに発現が認められたが、検証した胃癌細胞株21株全てで発現の低下(1/10~1/1000程度)が認められた。この発現低下はDNAメチル化によるものと考え、bisulfite pyro-sequencing法によりlincRNA1プロモーター領域のCpG islandのメチル化レベルを測定したところ、正常胃粘膜では全くメチル化を認めなかったが、測定した全ての胃癌細胞株で100%に近いメチル化を認めた。またChIPSeq実験を行った上記の7検体のDNAメチル化を同様に測定したところ、lincRNA1のK4me3レベルとDNAメチル化レベルは強い逆相関を示した。次に多数の臨床検体（非癌患者の胃粘膜と癌患者の非癌部背景粘膜）で同部位のメチル化を測定したところ、健常者やピロリ陽性胃炎患者に比べ癌患者非癌部で有意に高メチル化を示した。更にTCGAの各種癌検体5352例のDNAメチル化データを解析したところ、この領域は胃癌・大腸癌・食道癌・頭頸部癌・子宮頸癌の癌部で高メチル化を示し、非癌部ではほとんどメチル化を認めなかった。更にこの5352例のゲノムワイドなDNAメチル化データを独自に解析し、この長鎖ncRNAのメチル化とほぼ同じ挙動を示す領域を複数同定した。

### 4. 考察とまとめ

本報告では非癌患者の胃粘膜と癌患者の非癌部背景粘膜のヒストンH3K4me3修飾プロファイルの比較解析を行ったが、両者で予想していた以上に明確な違いが認められた。本解析の特徴はピロリ菌陽性慢性胃炎のサンプルを非癌患者のグループに入れて解析を行っていることであり、それによりピロリ菌感染による単純な胃粘膜の変化は検出されないようになっている。すなわち本解析で認められる変化は、炎症による直接的な変化ではなく、より発癌に関与しうる発癌母地としての何らかの変化を反映しているものと考えている。この変化が30~40年といった長期的な慢性炎症の結果として引き起こされるのか、あるいはピロリ菌感染以外の何らかの病的因子により引き起こされる変化であるのかは不明であるが、大変興味深くかつ重要な知見であると思われる。

本報告ではひとつの長鎖ncRNAに着目し更なる解析を行った。このlincRNA1は健常者の胃粘膜では常に発現を認めるが、胃癌患者の非癌部ではDNAメチル化により発現が低下・消失している。胃癌患者の癌部あるいは癌細胞株でも同様である。興味深いことに、癌を発症していないピロリ菌陽性慢性胃炎の粘膜ではDNAメチル化の程度が低く、単純なピロリ菌感染によるDNAメチル化とは別な分子メカニズムが関与するものと想定している。少なくともこのlincRNA1のメチル化は将来的な発癌を予測する臨床リスクマーカーとしては有用であるが、現在このlincRNA1の発現消失が機能的にどのように発癌に関与しうるのか、実験的な検証を勧めているところである。またこのDNAメチル化は非常に普遍的な現象のようであり、将来的には慢性胃炎からの発癌の過程で生じるこのエピゲノム変化の分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。

本解析では、臨床検体のChIPSeqデータと公共データベースのRNASeqデータを用いて、慢性胃炎からの発癌に関与しうる長鎖ncRNAを同定した。現在その機能的な意義について検証すべく、更なる実験・解析を行っている。

## 5. 参考文献

1. Maruyama R, Choudhury S, Kowalczyk A, Bessarabova M, Beresford-Smith B, Conway T, Kaspi A, Wu Z, Nikolskaya T, Merino V, Lo PK, Liu XS, Nikolsky Y, Sukumar S, Haviv I, Polyak K. Epigenetic regulation of cell type-specific expression patterns in the human mammary epithelium. *PLoS Genetics* 2011; 7(4): e1001369
2. Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 2011; 25:1915-27.