

令和元年6月21日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08354

研究課題名(和文) 潰瘍性大腸炎発癌過程におけるマイクロRNAとシグナル伝達系活性化の関連性の解明

研究課題名(英文) MicroRNA dysregulation and signal pathway activation in ulcerative colitis-associated carcinogenesis

研究代表者

三富 弘之(MITOMI, Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90181940

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)：潰瘍性大腸炎(UC)の発癌過程において、大腸粘膜の慢性炎症によりmicroRNA(miR)の機能が障害され、その結果、異形成を経て癌化に至るとする仮説を立てた。その仮説を証明するために、UC関連異形成・発癌切除例の炎症粘膜、軽度・高度異形成、浸潤癌を抽出し、miR20a, miR21, miR93, miR181b発現の比較解析を行い、UC関連癌と通常型大腸癌との比較も行った。その結果、miR20aとmiR181bは炎症粘膜、異形成、浸潤癌で発現が漸減したが、逆にmiR21とmiR93は漸増した。また、UC関連浸潤癌では通常型大腸癌に比し、miR20a発現が有意に低かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、今回検討したmiRの大腸組織内における発現レベルを解析することにより、潰瘍性大腸炎の癌化の早期発見やこれらのmiRをターゲットとした潰瘍性大腸炎の癌化予防のための新たな治療法の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is hypothesized that dysregulation of microRNA (miR) due to chronic inflammation is one of the possible mechanism in ulcerative colitis (UC) -associated carcinogenesis. We analyzed expression levels of several miRs in surgically resected UC-associated neoplasia and sporadic colon cancer tissues. Our study shows that miRs 20a and 93 are gradually upregulated whereas miRs 21 and 93 are downregulated in inflammatory mucosa through dysplasia to invasive cancer in UC. In addition, miR 20a levels are significantly lower in UC-associated cancer than sporadic cancer. The expression levels of such miRs may be promising useful markers in UC patients for estimating an individual risk for the development of colon cancer. Furthermore, those miRs are potential targets for future chemopreventive approaches in the high-risk population of UC-associated carcinogenesis.

研究分野：人体病理

キーワード：潰瘍性大腸炎 大腸癌 炎症発癌 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎（以下、UC）における大腸癌有病率は非 UC 患者の約 3 倍と高く、罹病期間 10 年で 2%、20 年で 8%、30 年で 18%と癌化リスクは罹病年数に応じて高くなる。このことから長期罹患 UC 患者では、大腸内視鏡下のサーベイランスによる前癌病変（異形成）の発見とその早期摘出により、UC 関連大腸癌の死亡率低下に繋がることが示されている。一方、従来から UC の異形成（前癌）病変の組織診断が難しいことが指摘されており、申請者のグループも免疫染色による UC 関連の異形成・早期癌の正診率向上を目指した報告（Hum Pathol 2013; Diagn Pathol 2014）をしてきたが、未だ満足いくバイオマーカーは見つかっていない。

前癌病変を経由する大腸発癌経路には、i) 腺腫発癌経路、ii) 鋸歯状ポリープ発癌経路、iii) 異形成発癌経路があり、UC では iii) の経路により癌が発生する。申請者はこれまで、ii) では i) の経路と異なる miR 発現パターン、Wnt/ β -catenin シグナル関連遺伝子メチル化による活性化、BRAF 遺伝子変異による RAS/RAF/MAPK シグナル活性化を明確にしてきたが、一方で ii), iii) の早期癌化過程では陰窩底部から表層への段階的な異型細胞増生・細胞増殖亢進という共通点も示した。

慢性持続性炎症による miR の発現誘導や抑制は、細胞増殖、DNA 修復、DNA メチル化などに影響し、腫瘍形成性の刺激を与えるとされており、UC における炎症性発癌過程では、散発性（非炎症性）の腺腫発癌経路における遺伝子自体の異常が主体の機序とは異なり、転写後レベルで標的遺伝子発現を制御する miR が炎症ストレスにより慢性的な機能障害を引き起こすことが UC の炎症性発癌機構において重要であると考えられるが、UC の発癌過程における miR 発現を解析した報告は少ない。

UC 関連大腸癌の解析による局所浸潤能を規定する候補 miR、転移巣の解析による術後再発・転移能あるいは予後予測因子としての候補 miR の発見は意義深い。また、通常、組織学的診断が困難とされてきた UC の前癌病変である異形成の診断のバイオマーカーとなる候補 miR の同定も期待されている。さらに、臨床応用として UC 患者血清中の候補 miR を測定することにより、UC 関連大腸癌の腫瘍マーカーとしての役割も明らかにし得る可能性がある。現在 in vitro では、化学修飾した合成 antisense oligonucleotide (antagomiR) が miR 発現抑制に、二本鎖合成 miR (agomiR) が miR 発現増強に用いられてきた。このことから、UC の発癌過程で特異的に down-regulation あるいは up-regulation されている miR に対する agomiR / antagomiR 創薬の手掛かりが得られれば、RNA 干渉薬を用いた UC 関連大腸癌に対するオーダーメイド治療への展開が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では UC 発癌過程における miR 発現の変化と通常型大腸癌と UC 関連大腸癌との間の miR 発現の差異を明らかにし、UC の異形成（前癌病変）の早期発見や予後不良の UC 関連進行癌に対する miR 干渉薬による治療への展開を模索することを研究課題とした。

3. 研究の方法

(1) 対象

対象は、外科的に切除材料された UC 関連異形成・発癌症例 43 例（男女比 28:15，平均年齢 48.2 歳 [21~44 歳]，罹病期間平均 18.5 年 [1~43 年]，病型：全結腸炎型 30 例，左半結腸炎型 8 例，直腸炎型 1 例，不明 4 例）と同様に外科的に切除された通常型（散发性）大腸癌 10 例（男女比 6:4，平均年齢 65.6 歳 [51~74 歳]）である。

UC 関連異形成・発癌症例の外科切除材料の組織標本を詳細に検討して，炎症粘膜（INF）37 ブロック，UC 関連軽度異形成（LGD）23 ブロック，UC 関連高度異形成（HGD）16 ブロック，UC 関連浸潤癌（UC-CA）26 ブロック，さらに対照材料となる通常型大腸浸潤癌（SP-CA）として 10 ブロックを選択した。

(2) 方法

miR20a/21/93/181b 発現

ホルマリン固定・パラフィン包埋ブロックから RNA を抽出し，real-time PCR 法により miR20a/21/93/181b 発現の解析を行った。Real time PCR 法により得られたデータは，正常大腸粘膜に対するそれぞれの値として， 2^{-Ct} で表した。

UC の INF の組織学的炎症スコアと miR20a/21/93/181b 発現との関連炎症粘膜

INF 病変 37 ブロックからヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し，組織学的炎症スコアを検討した。組織学的炎症スコアは文献（Gupta RB, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. Gastroenterology. 2007;133:1099-1105）の記載に準じて，スコア 0,1,2,3 の 4 段階に分類し，組織学的炎症スコアと miR20a/21/93/181b 発現との関連性について検討した。

4. 研究成果

UC 関連異形成・発癌過程の各病変における miR20a/21/93/181b 発現変化

miR20a は INF 1.89 ± 1.32 （平均 \pm 標準誤差），LGD 2.02 ± 0.96 ，HGD 2.36 ± 1.58 ，UC-CA 2.55 ± 1.7 で，INF LGD HGD UC-CA のように UC の癌化過程の進展に伴って段階的に発現が低下した。同様に，miR181b は INF 10.79 ± 8.37 ，LGD 9.53 ± 6.50 ，HGD 9.12 ± 5.94 ，UC-CA 7.88 ± 6.75 と UC の癌化過程の進展に伴って段階的に発現が低下した。一方，miR21 は INF 17.27 ± 20.91 ，LGD 14.07 ± 17.77 ，HGD 16.08 ± 22.59 ，UC-CA 24.43 ± 31.69 で，INF LGD HGD UC-CA のように UC の癌化過程の進展に伴って段階的に発現が亢進した。また，miR93 は INF 6.28 ± 4.17 ，LGD 7.32 ± 3.67 ，HGD 7.53 ± 4.46 ，UC-CA 8.39 ± 6.65 で，INF LGD HGD UC-CA のように UC の癌化過程の進展に伴って段階的に発現が亢進した（図 1）。

INF に関する組織学的炎症スコア 0 は 17 病変，スコア 1 は 13 病変，スコア 2 は 2 病変，スコア 3 は 7 病変となったが，組織学的炎症スコアと miR20a/21/93/181b 発現との相関はなかった。

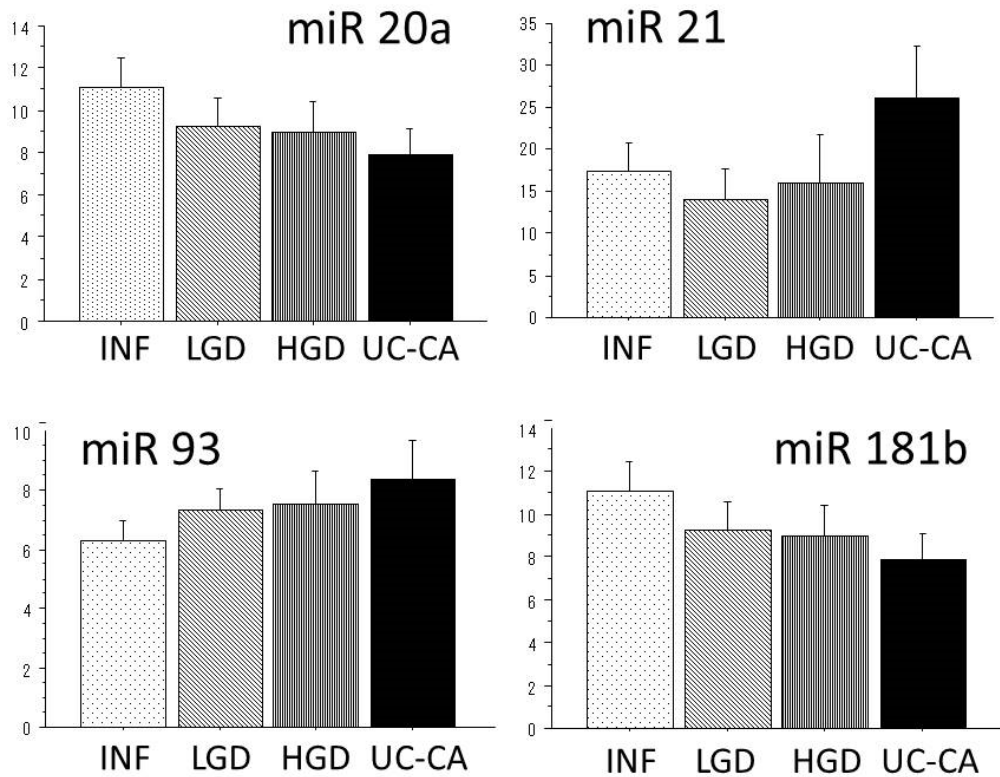


図 1. UC 関連異形成・発癌過程の各病変における miR20a/21/93/181b 発現

UC-CA と SP-CA における miR20a/21/93/181b 発現の差異

miR20a は UC-CA では 2.55 ± 1.77 (平均 \pm 標準誤差), SP-CA では 4.23 ± 2.23 で, UC-CA では SP-CA に比し有意に低かった ($P = 0.03$). 一方, miR93 発現は UC-CA が SP-CA に比しやや高い傾向があったが ($P = 0.08$), miR21 及び miR181b 発現はいずれも両者の間で差はなかった (図 2).

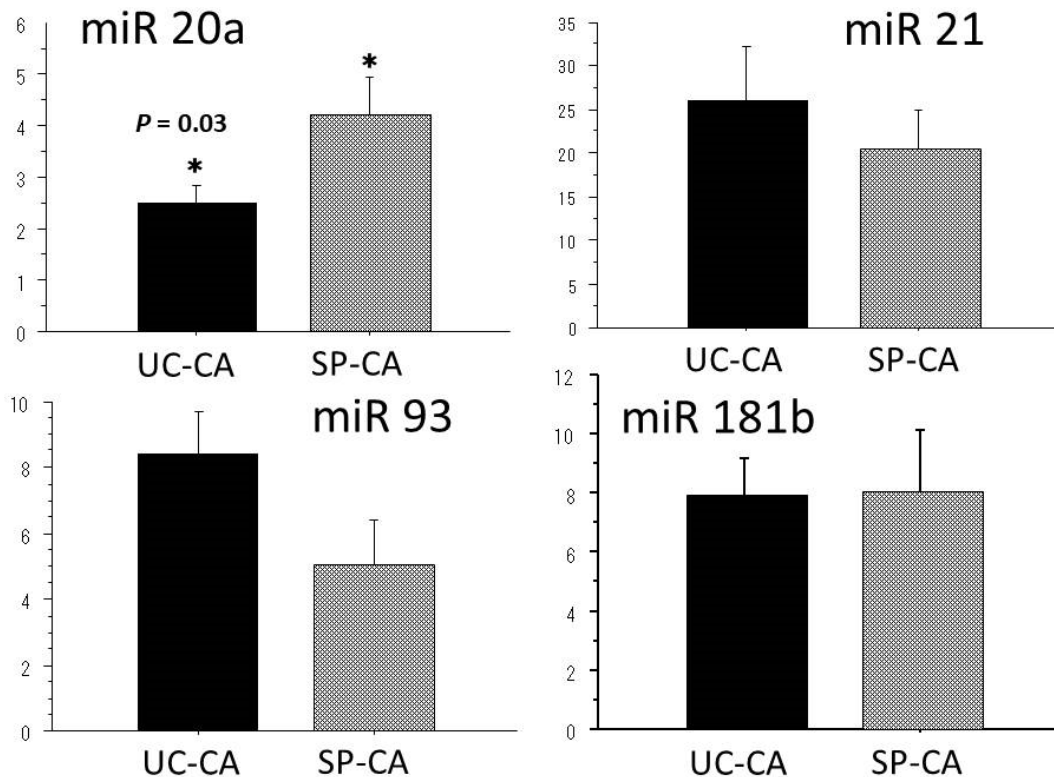


図2. UC-CA と SP-CA における miR20a/21/93/181b 発現の差異

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Hiroto T, Murakami T, Akazawa Y, Sasahara N, Saito T, Sakamoto N, Mitomi H, Nagahara A, Yao T. Immunohistochemical and genetic characteristics of a colorectal mucin-rich variant of traditional serrated adenoma. *Histopathology*. 2018;73:444-453.

Murakami T, Mitomi H, Yao T, Saito T, Shibuya T, Sakamoto N, Osada T, Watanabe S. Distinct histopathological characteristics in colorectal submucosal invasive carcinoma arising in sessile serrated adenoma/polyp and conventional tubular adenoma. *Virchows Arch*. 2018;472:383-393.

Murakami T, Sakamoto N, Ritsuno H, Shibuya T, Osada T, Mitomi H, Yao T, Watanabe S. Distinct endoscopic characteristics of sessile serrated adenoma/polyp with and without dysplasia/carcinoma. *Gastrointest Endosc*. 2017;85:590-600.

Tajima Y, Murakami T, Saito T, Hiroto T, Akazawa Y, Sasahara N, Mitomi H, Yao T, Watanabe S. Distinct involvement of the Sonic Hedgehog signaling pathway in gastric adenocarcinoma of fundic gland type and conventional gastric adenocarcinoma. *Digestion*. 2017;96:81-91.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：