

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17483

研究課題名(和文) 消化管前癌病変及びその悪性転化に関与するmiRNAの同定と発症機序の解明

研究課題名(英文) Identification of miRNAs involved in the premalignant lesions in gastrointestinal tract and their malignant transformation

研究代表者

竹内 千尋 (Takeuchi, Chihiro)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：60836055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非乳頭部十二指腸上皮性腫瘍におけるmiRNA/mRNA網羅的遺伝子発現解析を行った。オントロジー解析では、腫瘍特異的に発現しているmiR-135bの標的遺伝子の発現が低下しており、更にAPC遺伝子及びWnt pathwayとの関連が示された。腫瘍切除検体を用いた免疫染色ではmiR-135bの発現上昇と β -cateninの異常蓄積を認めた。更に腫瘍ではAPC遺伝子変異は殆ど認めなかった。実験的にmiR-135bが発現誘導によりAPCタンパク翻訳を阻害が示されたことから、非乳頭部十二指腸上皮性腫瘍においてはmiR-135bがWnt経路を亢進させ腫瘍促進を引き起こしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

十二指腸上皮性腫瘍の前癌病変と早期癌におけるmiRNAの発現異常とその腫瘍発症機序のメカニズムについて比較検討した報告は少ない。本研究では網羅的遺伝子発現解析と病理学的検討及び基礎的検討を通してmiRNAによる腫瘍発症のメカニズムを明らかにした。消化管において前癌病変・早期癌の初期発症に関与する分子メカニズムを解明する事は、有効な診断法・治療法の確立や化学療法予測を可能にするという点で臨床的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive gene expression analysis of miRNA / mRNA using nonpapillary duodenal epithelial tumors. Gene ontology analysis showed that the expression of the target genes of miR-135b, which was significantly expressed in tumors, was decreased, and that it was associated with the APC gene and Wnt pathway. Indeed, immunostaining using resected specimens showed high expression level of miR-135b and abnormal accumulation of β -catenin. And APC gene mutation was rarely observed in the tumors. The induction of miR-135b expression decreased the expression of APC protein. These results suggested that upregulation of miR-135b may inhibit APC protein expression, leading tumorigenesis through upregulation of Wnt pathway signaling in nonpapillary duodenal epithelial tumors.

研究分野：消化器内科

キーワード：miRNA 網羅的遺伝子発現解析 非乳頭部十二指腸上皮性腫瘍 Wnt/ β -catenin pathway APC mutation

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非コード RNA の 1 つである miRNA は消化管腫瘍の発生・癌の進展や他臓器への転移、また抗癌剤耐性に大きく関わるとされる。進行した胃癌や大腸癌における miRNA の発現異常の報告は散見されるが、消化管における腺腫や鋸歯状病変等の前癌病変と早期癌における miRNA の発現異常とその腫瘍発症機序のメカニズムについて比較検討した報告は少ない。

2. 研究の目的

消化管においては de novo 発癌と前癌病変からの悪性転化が認められるが、前癌病変・早期癌の初期発症に關与する分子メカニズムを解明する事は、有効な診断法・治療法の確立や化学療法予測を可能にするという点で臨床的意義が大きいと考えられる。我々はハイボリウム施設として十二指腸等の前癌病変を含む早期腫瘍検体を用いて miRNA の網羅的遺伝子発現解析を行う。前癌病変及び癌の特異的のマーカ-となる miRNA を明らかにし、病理学的な悪性度予測マーカ-の確立と in vitro・in vivo の系を用いた消化管上皮性腫瘍の発症機序解明を目指す。

3. 研究の方法

(A) 生検検体を用いた miRNA 網羅的発現解析の系の確立

本研究は臨床検体から抽出した遺伝子情報からゲノムインフォマティクス解析を行う為、2013年9月に東京大学医学部倫理委員会の承認を得て、症例集積を継続している。またゲノムインフォマティクスの専門家との合同チームを結成し、網羅的な発現解析の体制を整える。本研究に先行して十二指腸上・胃・大腸において、腫瘍および正常部からの微小生検検体(約 10mg)からマイクロアレイ可能な高精度の RNA を抽出し、網羅的な miRNA/mRNA の発現解析を行う。ゲノムインフォマティクス解析により腫瘍化に關与する可能性がある候補 miRNA を抽出し、候補 miRNA については基礎・病理学的な検討を行う。

(B) Real time PCR を用いた候補 miRNA に対する妥当性評価

前述の候補 miRNA については、マイクロアレイに使用した症例および他の症例から抽出した RNA を用いて、TaqMan probe を用いた Real time PCR による検証を行う。マイクロアレイの結果の再現性を確認し、マイクロアレイの結果の妥当性を評価するとともに、候補 miRNA について正確に絞り込む。

(C) in situ hybridization を用いた臨床切除検体における miRNA の検出

腫瘍および正常組織において候補 miRNA がどのように発現分布しているか検証するため、ホルマリン固定検体を用いた in situ hybridization (ISH) による miRNA の検出を試みる。まず cell line における候補 miRNA の発現量を real time PCR で検証し、発現量の多い細胞についてセルブロックを作成し、ISH での検出を行う。続いてホルマリン固定臨床検体を用いての ISH による miRNA の検出を試みる。発現法には LNA (Locked Nucleic Acid) probe とチラミド増感を用いた免疫染色法を用いる。

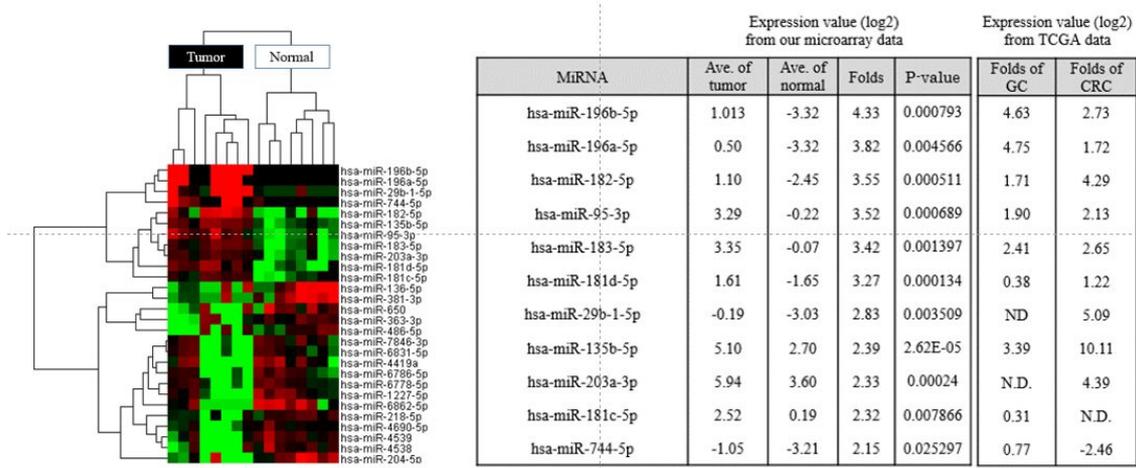
(D) 候補 miRNA の target 遺伝子の同定、oncogenic pathway との關連を検証

腫瘍で特異的に発現している miRNA については、その target となりうる mRNA について target scan, pictar, miRDB といった複数の target 予測アルゴリズムを用いて抽出する。過去の報告などで腫瘍形成に關与している可能性のある遺伝子について絞込み、in vitro・in vivo の系での miRNA mRNA の interaction および biological effect についての検証を行う。

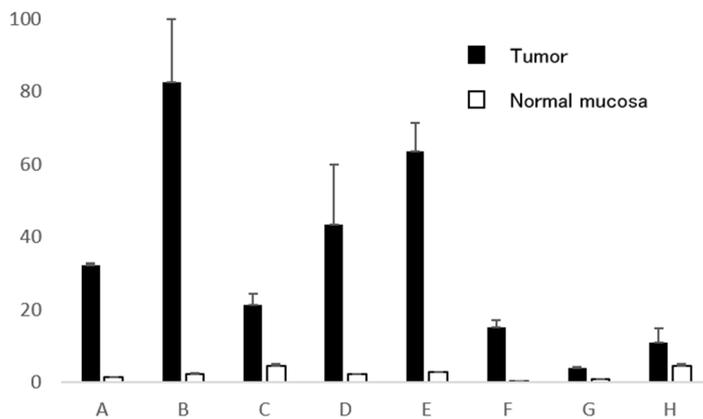
4. 研究成果

(A)

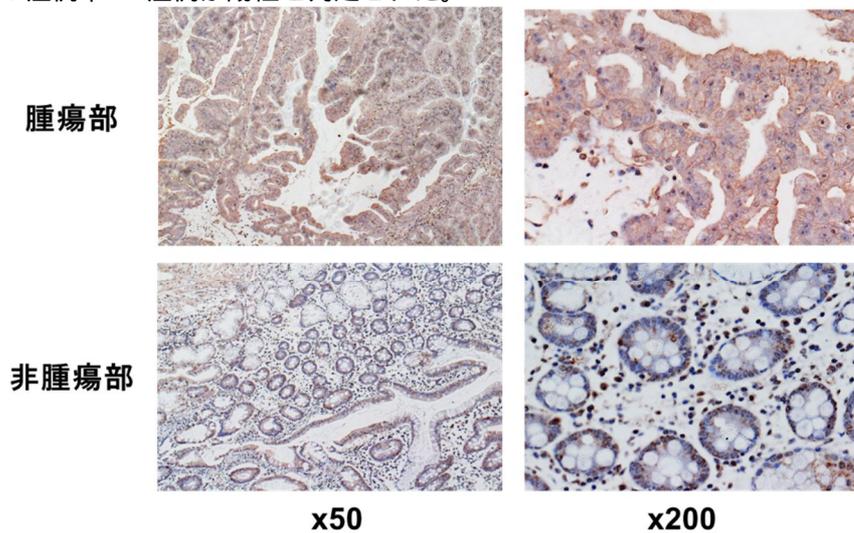
十二指腸腫瘍および周囲正常部からえられた Total RNA を microarray に計 8 症例提出し、腫瘍部と周囲正常部における遺伝子発現量の解析データを得た。クラスター解析では腫瘍と正常部は異なる遺伝子発現プロファイルを示した。特に miR-135b については腫瘍部で有意に発現上昇しており、TCGA (The Cancer Genome Atlas) に存在する胃癌・大腸癌においても正常部と比較し発現上昇していることが確認され、有力な候補 miRNA と考えられた。



(B) 前述の候補 miRNA について Taqman probe を用いて Validation を行い、明らかに腫瘍部で発現が上昇していることが確認された(下図: miR-135b)。



(C) in situ hybridization を用いた臨床切除検体における miRNA の検出
 前述の候補 miRNA について、ホルマリン固定された十二指腸腫瘍の切除検体を用いて面積染色を試みた。LNA probe で hibridization を行い、チラミド増感法を用いた後に DAB で検出した。下図のように腫瘍部で特異的で染色され、正常部ではほぼ染色されなかった。本研究の検討では、38 症例中 22 症例が陽性と判定された。



(D) 前述の miR-135b について発癌に寄与するメカニズムを解明するために、target 遺伝子の絞り込みを行った。複数の遺伝子で APC 遺伝子がターゲットと予測され、実際に mRNA の発現データでも APC 遺伝子や Wnt pathway の関与が示唆された。

miR-135b-5pのターゲット予測

Target gene	重複個数	Targetsan score	Pictar score	miRDB score	miRorg score
APC	3	-0.34	ND	66	-0.97

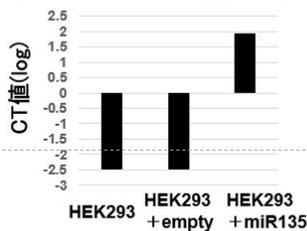


遺伝子発現データを用いたGSEAの結果と比較

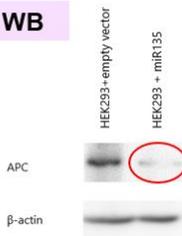
Up-regulated genes	ES	P value	Down-regulated genes	ES	P value
SABATES_COLORECTAL_ADENOMA_UP	0.795	<0.00001	SABATES_COLORECTAL_ADENOMA_DN	-0.801	<0.00001
SANSOM_TARGETS_UP	0.609	<0.00001	SANSOM_TARGETS_DN	-0.628	<0.00001
SANSOM_WNT_PATHWAY_R	0.665	<0.00001			

そこで、miR-135bを発現していないHEK293細胞において、レンチウイルスベクターを用いて安定発現を試みたところ、ターゲット遺伝子であるAPCのタンパク発現は有意に減少しており、抽出したTotal RNAを用いた発現解析ではWnt pathwayの亢進が示唆された。TOPFLASH assayを用いて、Wnt pathwayの亢進を証明した。これらの事実は十二指腸腫瘍においてはmiR-135bの発現上昇によるWnt pathwayの亢進が発がんに寄与する可能性を示唆すると考えられた。

安定持続発現株の作成

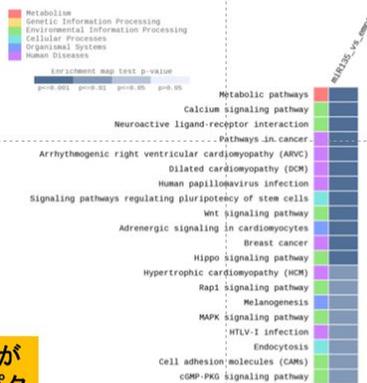


WB



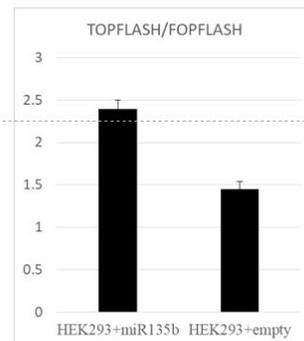
miR135bがAPCタンパク発現を抑制

KEGG Pathway解析



APC抑制によるWnt pathway亢進を示唆

TOPFLASH Assay



レポーターアッセイによるWnt pathway亢進の証明

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Yu, Tsutsumi Yutaka, Takeuchi Chihiro, Shiogama Kazuya, Mizutani Yasuyoshi, Inada Ken-ichi, Yamamichi Nobutake, Koike Kazuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Nuclear staining of claudin 18 is a new immunohistochemical marker for diagnosing intramucosal well differentiated gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 644-652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimamoto Takeshi, Yamamichi Nobutake, Gondo Kenta, Takahashi Yu, Takeuchi Chihiro, Wada Ryoichi, Mitsushima Toru, Koike Kazuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 The association of Helicobacter pylori infection with serum lipid profiles: An evaluation based on a combination of meta-analysis and a propensity score-based observational approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0234433 ~ 0234433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0234433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kageyama-Yahara Natsuko, Yamamichi Nobutake, Takahashi Yu, Takeuchi Chihiro, Matsumoto Yuta, Sakaguchi Yoshiki, Koike Kazuhiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Tandem repeats of the 5' flanking region of human MUC5AC have a role as a novel enhancer in MUC5AC gene expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100632 ~ 100632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2019.100632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内千尋
2. 発表標題 内視鏡生検検体から基礎研究への展開： 遺伝子発現解析とエピゲノム解析
3. 学会等名 第20回新都市内視鏡病態機能研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内千尋
2. 発表標題 シングルセル解析を用いた胃幹・前駆・分化細胞におけるDNAメチル化感受性の解明
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	富田 秀太 (Tomida Syuta) (10372111)	岡山大学・大学病院・准教授 (15301)	
研究協力者	稲田 健一 (Inada Kenichi) (70246081)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------