

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590339

研究課題名（和文）

腫瘍の発生と発育・進展過程に関わるマイクロ RNA の意義—病理組織切片による解析

研究課題名（英文）

Biological implication of microRNAs in tumorigenesis, tumor development, and progression - analysis with *in situ* hybridization using histopathological sections

研究代表者

稲田健一 Inada Kenichi

藤田保健衛生大学医学部准教授

研究者番号：70246081

研究成果の概要（和文）：

今回の研究で検索対象とした腫瘍は、食道癌（扁平上皮癌）、胃癌（腺癌）、卵巣癌（腺癌）、肝細胞癌と比較的多岐にわたっていたが、食道癌以外では miRNA とその標的とされる特定の蛋白との関連性に関しては優位な結果は得られなかった。その原因としては、ISH 法に用いるプローブの劣化ならびに、プローブ入手先の予期せぬ変更が第一に挙げられた。一方、食道癌においては癌の発育、進展過程に関与する可能性が示唆されたが、進行度との明確な相関は見出されなかった。これら一連の検索は、方法論的にも他機関ではほとんど施行されていないユニークなものであり、現在、上記以外の腫瘍（上皮性、非上皮性を含む）や前癌病変を対象に継続的に推進している。

研究成果の概要（英文）：

Although we examined various tumors including esophageal cancer (squamous cell carcinoma), gastric cancer (adenocarcinoma), ovarian cancer (adenocarcinoma), and hepatocellular carcinoma in this study, no apparent biological interrelationship between microRNAs and their targeted specific proteins was revealed except esophageal cancer. We supposed that the central reason for the failure to detect the interrelationship was deterioration of ISH probes and unexpected change of company that supplied them. On the contrary, we found that microRNA 199a, Brm, and Egr1 constructed double-negative feed in esophageal cancer, suggesting that they were mutually related in the process of esophageal carcinogenesis, cancer development, and its progression. But no special relationship was found between them and tumor stage. We are continuously studying about other tumors both epithelial and nonepithelial and various precancerous lesions because this research method is very unique.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：microRNA, *in situ* hybridization, LNA/DNA オリゴプローブ, thyramide, 病理組織切片, 食道扁平上皮癌, Brm, Egr1

1. 研究開始当初の背景

microRNA (以下 miRNA) は 22 塩基程度の non-coding RNA であり、遺伝子の転写後制御因子として近年注目されている。1 個の miRNA は 100 個以上の遺伝子を標的にするがその機能は多岐にわたり、各々の遺伝子の発現を厳密に制御しているとされる。最近では様々な腫瘍の発育・進展過程に対する機能面での解析に加えて、腫瘍の早期診断のためのバイオマーカーとしての有用性、治療標的としての可能性なども論じられるようになってきた。これまでの研究材料の多くは、ヒト癌細胞株や腫瘍組織、ヌートマウス移植腫瘍、血液や尿などである。方法論的には、サンプルから抽出した RNA (あるいは DNA) を用いたマイクロアレイや半定量的 PCR 法などの発現解析が主体であり、腫瘍の病理形態学的な特徴と絡めた研究はほとんど行われていなかった。そのため、腫瘍の組織型や分化度との関係や、前癌病変における意義などの知見も非常に乏しかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、様々なヒト腫瘍や前癌病変の病理組織切片上で各種 miRNA の発現異常を *in situ* hybridization (ISH) 法で解析するとともに、標的分子とされる転写因子や当該 miRNA の発現調節に関与する蛋白分子の発現に関して免疫組織化学的手法を用いて検索を行い、腫瘍の発生と発育・進展過程における miRNA の意義を検討することである。

3. 研究の方法

本研究では、以下の手順で解析を進めた。

①種々のヒト腫瘍の病理組織パラフィン切片を対象に、個々の腫瘍の発生ならびに発育・進展・転移の各過程に関与するとされる各種 miRNA の発現異常を、ISH 法を用いて腫瘍の病理形態学的所見と照らし合わせて詳細に解析した。

②対象 miRNA が標的とする可能性のある転写

因子やその発現調節に関与するとされる癌抑制遺伝子等の蛋白分子の発現パターンを免疫組織化学的に検索した。

③①②を総合的に解釈することにより、腫瘍の発生ならびに発育・進展過程に関わる miRNA の意義を考察した。

4. 研究成果

平成 22 年度

①食道原発扁平上皮癌 (進行癌, 早期癌) 20 例を対象に、ホルマリン固定パラフィン包埋病理組織切片を用いて、miR-199a-5p, -3p (以下 5p, 3p) の *in situ* hybridization (ISH) 法および連続切片における Egr1, Brm の免疫染色を行い比較検討した。

②解析可能であった 10 例で、非腫瘍部粘膜上皮では、5p および 3p はともに基底層部より一段上の細胞群で発現が高かったが、癌浸潤部ではともに発現が低下していた。

③Brm と Egr1 の免疫染色では、非腫瘍部粘膜上皮において Brm は基底層部から表層部まで幅広く染まったが、Egr1 は中間層が染まる発現様式を示した。一方、癌浸潤部においては Brm の発現は高く、Egr1 の発現は非腫瘍部粘膜上皮に比べ低下していた。

④以上まとめると、食道扁平上皮癌において、miR-199a-5p, miR-199a-3p, Egr1 の発現は低下し、Brm は強く発現していた。この傾向は食道癌細胞株を用いたこれまでの解析結果と一致していた。これら一連の遺伝子制御回路が、癌の発育、進展過程に関与する可能性が示唆されたが、今回の検討では癌の進行度との明らかな相関は認められなかった。

⑤卵巣癌 (漿液性嚢胞腺癌, 粘液性嚢胞腺癌, 明細胞腺癌) 5 例ならびに肝細胞癌 2 例を対象に、5p, 3p に対する ISH 法を施行したが全例陰性であった。

平成 23 年度

①昨年度までの解析に基づき、クロマチン変

換因子 Brm が miR-199a-5p, -3p の標的遺伝子の候補のひとつであることを見出した。一方, miR-199a 制御因子として Egr1 が存在する。これらを総合した結果, miR-199a, Egr1, Brm の 3 因子が double negative feedback 制御を形成するとの結論を得た。

- ②今年度は, 外科的切除ヒト胃癌症例 77 例 (腺癌) のホルマリン固定パラフィン包埋病理組織切片を対象に, 1 に関して検討した。方法としては, miR-199a-5p, -3p (以下 5p, 3p) の *in situ* hybridization (ISH) 法および連続切片における Brm の免疫染色を行い比較検討した。
- ③胃癌症例 77 例の全例が, 5p, 3p のいずれも陰性であった。
- ④Brm は 52/77 例 (68%) で発現低下がみられ, その傾向は低分化腺癌でより顕著であった (59%)。
- ⑤③の原因として, プローブ劣化による可能性が第一に考えられるため再度検討を試みる予定であったが, これまで用いてきたプローブ (Thermo Scientific 社に受注) が入手できなくなったため, 新たな LNA/DNA オリゴプローブを他社 (Exiqon 社) に受注した。
- ⑥miR-199a 強制発現細胞株 (陽性対照) と, 陰性対照細胞株のホルマリン固定セルブロック標本を作製し, 新規プローブの濃度, proteinase 前処理, ハイブリダイズ温度など染色条件の検討を試みたが, この時点では良好な染色結果が得られなかった。
- ⑦新規プローブと miR-199a のハイブリが成功しているか否かに関して検索したところ, ハイブリ自体がうまくいっていないことが判明した (蛍光顕微鏡による観察)。
- ⑧原因究明のためプローブ提供企業と協議しつつ, 新たなプローブの設計も着手した。

平成 24 年度

- ①新しく miR199a-5p LNA/DNA probe (Exiqon 社) を作製し, 1998~2005 年に当大学病院で外科的切除された胃癌 45 症例の 10%ホルマリン固定病理組織切片を用いて 199a-5p の発現を検討した。同時に Brm 発現に関し免疫組織化学的に検討した。判定は陽性細胞の割合により, miRNA199a は- (陰性), + (<30%), ++ (30%~60%), +++ (60% ≤), Brm は 1 (陰性), 2 (<10%), 3 (10%~50%), 3 (50%~90%), 5 (90% ≤) に分けた。

- ②Brm 発現強度 5 では, 199a 発現-(3/8, 38%), + (1/8, 12%), ++ (0/8, 0%), +++ (4/8, 20%), 同 4 では, - (2/9, 22%), + (2/9, 22%), ++ (4/9, 45%), +++ (1/9, 11%) であり, miRNA199-5p と Brm 発現との相関性は認められなかった。組織型との関連性では, 印環細胞癌および粘液癌で陰性傾向を示した (各 n=4)。
- ③C 型肝炎由来肝細胞癌では, HCV ゲノムの発現制御に miRNA199a が関与するとの報告がある。そこで 2012 年に当大学病院で外科的切除された 11 症例を対象に, 10%ホルマリン固定病理組織切片を用いて 199a-5p に関し発現検討し, 肝硬変部と癌部を比較した。
- ④肝硬変部は 5/11 (45%), 癌部は 6/11 (55%) で陽性となり差は認めなかった。
- ⑤今回の検討で新たなプローブの有効性が確認された。以前報告した食道癌における Brm と miRNA199a の逆相関は胃癌では見出されなかった。C 型肝炎由来肝硬変と肝癌における miRNA199a 発現の意義は今回の検討からは不明であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Mizutani Y., Matsuoka K., Takeda H., Shioyama K., Inada K., Hayakawa K., Yamada H., Miyazaki T., Sawasaki T., Endo Y., Tsutsumi Y.: Novel approach to identifying autoantibodies in rheumatoid synovitis with a biotinylated human autoantigen library and the enzyme-labeled method. J. Immunol. Method. 387: 57-70, 2012. [査読あり]
2. Tagawa T., Haraguchi T., Hiramatsu H., Kobayashi K., Sakurai K., Inada K., Iba H.: Multiple microRNAs induced by Cdx1 suppress Cdx2 in human colorectal tumour cells. Biochem. J. 447: 449-455, 2012. [査読あり]
3. Yamamichi N., Oka M., Inada K., Konno-Shimizu M., Kageyama-Yahara N., Tamai H., Kato J., Fujishiro M., Kodashima S., Niimi K., Ono S.,

Tsutsumi Y., Ichinose M., Koike K.:
Rebamipide induces dendritic cell
recruitment to
N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
e (MNG)-exposed rat gastric mucosa
based on IL-1 β upregulation. Biochem.
Biophys. Res. Commun. 424: 124-129,
2012. [査読あり]

4. Tsuge S., Mizutani Y., Matsuoka K.,
Sawasaki T., Endo Y., Naruishi K.,
Maeda H., Takashiba S., Shiogama K.,
Inada K., Tsutsumi Y.: Specific *in situ*
visualization of plasma cells
producing antibodies against
porphyromonasgingivalis in gingival
radicular cyst. Application of the
enzyme-labeled antigen method. J.
Histochem. Cytochem. 59: 673-689, 2011.
[査読あり]

5. Sakurai K., Furukawa C., Haraguchi T.,
Inada K., Shiogama K., Tagawa T.,
Fujita S., Ueno Y., Ogata A., Ito M.,
Tsutsumi Y., Iba H.: MicroRNAs
miR-199a-5p and -3p target the Brm
subunit of SWI/SNF to generate a
double-negative feedback loop in a
variety of human cancers. Cancer Res.
71: 1680-1689, 2011. [査読あり]

[学会発表] (計1件)

櫻井浩平, 稲田健一, 伊庭英夫, 他
miR-199a-5p と-3p は, エピジェネティクス
に重要な因子である Brm を標的とする
第 69 回 日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月
24 日, 大阪

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
稲田健一 (藤田保健衛生大学医学部准教授)

研究者番号: 70246081

(2)研究分担者
水谷泰嘉 (藤田保健衛生大学医学部助教)

研究者番号: 10546229

(3)連携研究者
()

研究者番号:

