

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24年5月16日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790346

研究課題名（和文）マイクロRNAを用いた胃腸管間質腫瘍の発育・進展に関する研究

研究課題名（英文）The role of miRNA in the progression of GIST

研究代表者

山元 英崇（YAMAMOTO HIDETAKA）

九州大学・大学病院・病理部

研究者番号：30404073

研究成果の概要（和文）：

胃腸管間質腫瘍(GIST)におけるマイクロRNA(miRNA)の発現の意義を検討した。miRNAアレイおよび定量的real-time RT-PCRにおいて、*miR-133b*等の特定のmiRNAが高悪性度GISTにおいて発現が低下していることを見出した。逆に*miR-133b*の標的遺伝子である*fascin-1* mRNAおよび*fascin-1* 蛋白は高悪性度GISTにおいて有意に発現が亢進しており、予後不良因子であった。以上より、GISTにおいて*miR-133b*発現低下と*fascin-1*過剰発現がGISTの進展に重要な役割していると考えられ、*fascin-1*は新たなバイオマーカーや治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To better understand the role of aberrantly expressed miRNAs and their target genes affecting the biology of gastrointestinal stromal tumor (GIST), we examined miRNA expression signature. By miRNA array we found that several miRNAs, including *miR-133b*, were down-regulated in high-grade GISTs. Subsequently, quantitative real-time RT-PCR revealed that *fascin-1* mRNA was up-regulated in accordance with *miR-133b* down-regulation in high grade GIST. We then examined the *fascin-1* protein expression by immunohistochemical staining, and found that *fascin-1* overexpression was significantly correlated with shorter disease-free survival time and several aggressive pathological factors, including risk grade. Our results suggest that down-regulation of *miR-133b* and overexpression of *fascin-1* may play an important role in the progression of GIST, and that *fascin-1* may be a useful biomarker and a promising molecular therapeutic target.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：消化器・唾液腺、胃腸管間質腫瘍、マイクロRNA

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

胃腸管間質腫瘍(GIST)は、良性から悪性まで幅広い生物学的態度を示す。予後改善のためには、既存の分子標的治療だけでは不十分であり、詳細な腫瘍発生・進展の分子メカニズムを解明し、それに基づいた予後予測因子や新規治療方法の開発のための基礎的なデータを集積する必要がある。近年、マイクロRNA(miRNA)が、特定のRNAを阻害し、様々な腫瘍の発育や進展に関与していることが明らかにされつつあるが、GISTにおけるmiRNA発現の意義は不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究においては、GISTにおけるmiRNA発現をプロファイリングし、発育や進展に関与している可能性があるmiRNAをスクリーニングする。次にそれらのmiRNAが標的とする遺伝子(RNA)や遺伝子産物(蛋白質)の発現を測定し、悪性度、予後に関与する因子あるいは治療標的となりうる分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) miRNA発現のプロファイリング:

miRNAアレイ(約900のmiRNAを網羅的に解析可能なチップを使用)を行い、臨床病理学的悪性度因子(腫瘍サイズ、核分裂数、リスクグレード、血管浸潤など)、KIT遺伝子変異亜型、血管新生の程度により、クラスター解析を行い、発現量の異なるmiRNAを同定する。

(2) 悪性度に関与する候補miRNA発現の確認:

上記miRNAアレイ結果で得られた、悪性度に

より発現量の異なるmiRNAについて、定量的RT-PCRを行い、悪性度と特定のmiRNA発現量との関連を確認する。

(3) 特定のmiRNAの標的候補遺伝子の同定: 公開されているデータベースを用いて候補をリストアップし、予後と関連したいくつかのmiRNAに重複して対応する候補遺伝子(mRNA)を“有力候補”として絞り込み、その遺伝子産物(mRNAおよび蛋白質)の発現を定量的RT-PCRならびに免疫組織化学染色を用いて検索し、臨床病理学的因子や予後との関連を検討する。

4. 研究成果

(1) GISTにおけるmiRNA発現パターンの網羅的解析:

19例のGISTに対し、miRNAアレイを施行した。unsupervised analysisを行った結果、GIST19例は比較的均一なmiRNA発現パターンを示しつつも、おおまかに6つのmiRNA発現プロファイルのグループに分けることができた。それらは、低リスクグレード・KIT/PDGFR α 変異陰性群、高リスクグレードのKIT exon9または exon11変異群、低リスクグレードのKIT exon11変異群、など特徴を共有する群に分けることができた。次に、supervised analysisを行い、8個の因子(NF1合併、部位、腫瘍径、核分裂数、NIHリスクグレード、AFIPリスクグレード、Ki-67陽性率、KIT/PDGFR α 変異型)により2群に分けた場合、それぞれ発現量の差があるmiRNAは数個から数十個であり、GISTの発生・進展に関与する可能性がある候補miRNAがリストアップされた。

(2) GIST の悪性度に関与する可能性がある
miRNA の抽出 :

上記の結果と、類似研究の結果(Choi et al. Int J Cancer 2010)を比較したところ、*miR-133b*が、いずれにも共通して高リスクグレードGISTにおいて発現が低下していることが判明した。そこで、*miR-133b*に注目して解析を追加した。定量的RT-PCRにおいても、*miR-133b*発現量は高リスクグレードGISTにおいて低いことが確認された(図1a)。

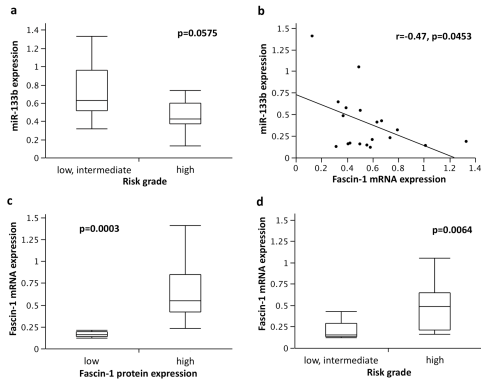


図1. *miR-133b*, fascin-1 mRNAおよび fascin-1蛋白発現とリスクグレードの関係

(3) *miR-133b*と、その標的候補遺伝子である fascin-1発現の関係 :
公開されているデータベース(TargetScan, <http://www.targetscan.org/>)によると、*miR-133b*の標的遺伝子は648個であった。本研究では、これらの候補の中で、特にfascin-1に注目した。定量的RT-PCRにて、*fascin-1* mRNAは高悪性度GISTにおいて有意に発現が亢進し、*miR-133b*と*fascin-1* mRNA発現量は逆相関していた(図1b, d)。また*fascin-1* mRNA発現量と免疫染色によるfascin-1蛋白発現強度は有意に相関していた(図1c, 2)。

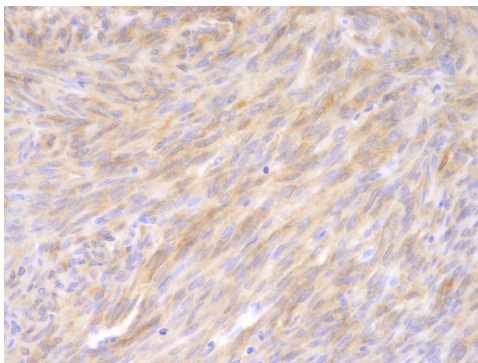


図2. Fascin-1蛋白強発現

(4) fascin-1発現の臨床病理学的意義 :
147例の臨床サンプルに対象を広げ、fascin-1蛋白発現を免疫染色にて検索したところ、fascin-1高発現は、静脈浸潤、粘膜潰瘍形成、高リスクグレードと相関し、これらはいずれも予後不良因子であった(図3)。fascin-1は細胞の運動能を亢進させる分子であり、癌腫の浸潤や転移に関与することが知られている。食道扁平上皮癌においては、*miR-133b*発現低下により、fascin-1発現が亢進し、腫瘍細胞の増殖、浸潤能に関与していることが実験的に証明されている(Kano et al. Int J Cancer 2010)。本研究結果から、GISTにおいても*miR-133b*発現低下とfascin-1過剰発現が、腫瘍の浸潤・転移に重要な役割している可能性が示唆された。近年、fascin-1に対する阻害薬が実験的に癌細胞の転移を抑制したという報告がある。従って、fascin-1はGISTの新たなバイオマーカーであり、治療標的分子となる可能性が期待される。なお本研究の成果の一部は、論文投稿中である。

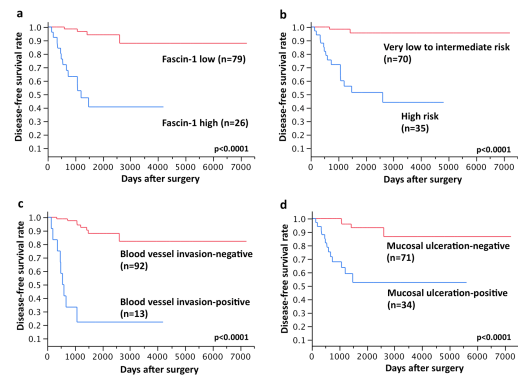


図3. fascin-1蛋白発現、リスクグレード、血管浸潤、潰瘍形成と無病生存期間の相関

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4件)

1, Fujita A, Yamamoto H, Imamura M, Nakamura N, Maehara Y, Tsuneyoshi M, Oda Y. Expression level of the mitotic checkpoint protein and G2-M cell cycle

regulators and prognosis in gastrointestinal stromal tumors in the stomach. Virchows Arch 460:163-9, 2012

2, Yamamoto H, Kojima A, Nagata S, Tomita Y, Takahashi S, Oda Y. KIT-negative gastrointestinal stromal tumor of the abdominal soft tissue: A clinicopathological and genetic study of 10 cases. Am J Surg Pathol 35:1287-1295, 2011

3, Yamamoto H, Kohashi K, Tsuneyoshi M, Oda Y. Heterozygosity loss at 22q and lack of INI1 gene mutation in gastrointestinal stromal tumor. Pathobiology 78:132-139, 2011

4, Yamamoto H, Kojima A, Miyasaka Y, Imamura M, Nakamura N, Yao T, Tsuneyoshi M, Oda Y. Prognostic impact of blood vessel invasion in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. Hum Pathol 41:1422-30, 2010

〔学会発表〕（計1件）

山元英崇、孝橋賢一、小田義直.
胃腸管間質腫瘍(GIST)における microRNA 発現の特徴. 第70回日本癌学会学術総会,
2011.10.3-5, 名古屋

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.surgpath.med.kyushu-u.ac.jp/ap/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山元英崇 (YAMAMOTO HIDETAKA)

九州大学病院・病理部・助教

研究者番号：30404073

(2)研究分担者：なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者：なし

()

研究者番号：