

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430143

研究課題名(和文)炎症性発癌過程におけるmicroRNAの関与と意義 病理組織学的解析

研究課題名(英文)Biological implication and significance of microRNA in inflammatory tumorigenesis - histopathological analysis

研究代表者

稲田 健一 (Inada, Ken-ichi)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：70246081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌、肺癌、乳癌を対象に、miR-199aとmiR-200cの発現をin situ hybridization (ISH)法で解析した。乳癌ではEpCAMを高発現している腫瘍集ではmiR-200cの発現が高いことを見出した。両者の発現相関の分子機構を明らかにする予定である。しかし本研究では、多くの症例で染色シグナルが弱かった。その理由はISH法に用いるプローブの劣化が挙げられた。今後、ISHの感度、特異度を改善する必要がある。

炎症、発癌、microRNAを病理学的に解析する研究者は非常に少なく、我々の手法はユニークである。様々な癌の解析を視野に入れて、病理学的な関連性を明らかにしていく。

研究成果の概要(英文)：We examined the expressions of miR-199a and miR-200c by in situ hybridization (ISH) in hepatocellular carcinoma, lung cancer and breast cancer. We found that miR-200c expression is increased in EpCAM-positive breast cancer. We plan to reveal the molecular mechanism of the correlation between miR-200c and EpCAM. However, in this study, the expressions were very weak in almost all cases probably due to the deterioration of ISH probes. We need to improve the sensitivity and specificity of our ISH.

Our approach is unique because there are very few researchers who study the inflammation, tumorigenesis and microRNA by pathological methods. We are continuously studying the pathological relationships using a variety of tumors.

研究分野：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 乳癌 扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

microRNA (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注目されている。miRNA は標的遺伝子 mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR) に相補的に結合し、その発現を抑制する。1 個の miRNA は、数百の遺伝子を標的とし、各々の遺伝子発現を厳密に制御し、腫瘍の発生・進展過程に関与する。

近年、腫瘍の発生、発育、進展過程を、炎症性変化の観点から捉えられるようになってきた。炎症反応の場で NF- κ B を代表とする種々の転写因子が活性化され、その結果、産生されるサイトカインが、炎症性発癌や癌進展機構と結びつくことが考えられている。しかしながら、炎症変化によって引き起こされる miRNA やその標的遺伝子の発現異常を、病理組織学的に解析した研究はない。そのため、炎症によって発現変動する miRNA と、腫瘍の組織型や分化度との関係の知見は非常に乏しかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症反応の観点から、腫瘍の発生・進展過程に関与する miRNA を病理学的に検討することである。我々は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本における miRNA の発現を高感度に検出する *in situ* hybridization (ISH) 法を既に開発している (Yamamichi N. et.al. 2009) (Sakurai K. et.al. 2011)。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 ISH 法で解析する。これに加えて、miRNA の標的遺伝子の蛋白分子の発現を免疫組織化学的手法によって解析し、miRNA の発現と比較検討する。

3. 研究の方法

炎症と関連が示唆される癌の FFPE 切片を解析対象にする。本研究では、以下の手順で解析を進めた。

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 の発現様式を、ISH 法によって解析し、腫瘍の病理形態学的所見と照らし合わせて詳細に検討した。

対象 miRNA が標的とする可能性がある遺伝子の蛋白分子の発現様式を、免疫組織化学的に検討した。

上記を総合的に解釈することによって、腫瘍の発生ならびに発育・進展過程や炎症に関わる miRNA とその標的遺伝子の意義を考察した。

4. 研究成果

(1) 平成 25 年度

ヒト B、C 型肝炎ウイルス (HBV、HCV) 肝炎、同肝硬変、肝癌、および非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 関連肝癌を合計 11 症例収集し、FFPE 切片上で、(肝細胞癌との関連が既に報告されている) miR-199a-5p の発現様式を ISH 法によって解析した。

miR-199a-5p の発現は非癌部 (肝硬変) においては 1 例 (1/11)、癌部においては 4 例 (4/11) が陽性を示した。しかし症例によって陽性細胞の割合が異なり、その意義は不明であった。さらに形質細胞に強い非特異的反応を示すとともに、陽性シグナルが非常に弱い症例もあり、その判定が困難であった。以上の結果より、ISH の感度、特異度を向上させる必要があると考えられた。次年度以降、ISH プロブの改良 (LNA の修飾位置の変更、LNA 以外の人工核酸 (BNA 等) の使用など) や、AT-tailing 法の採用を検討する。さらに、miR-199a の標的遺伝子 (Brm、Caveolin1 等) の免疫染色を行い、miR-199a の発現と比較検討する。

(2) 平成 26 年度

miRNA の ISH の感度、特異度の向上を目指して、以下の方法を検討した。

AT の繰り返し配列を template にする AT-tailing 法

LNA 以外の人工核酸 (BNA) で修飾したプロブの使用

いずれも良好な結果を示さなかった。しかし、LNA プロブを新しく外注しなおしたところ、強いシグナルが得られた。検討の結果、プロブは半年~1 年経過すると反応性が著しく低下することが明らかとなった。この新規 LNA プロブを用いて、肺原発の扁平上皮癌を対象に miR-199a の ISH を行った。これらは本研究課題とは異なる症例だが、食道原発扁平上皮癌の miR-199a の発現様式は十分把握されている (Sakurai K et.al. 2011) ため、扁平上皮癌を対象とした。miR-199a は、癌巣周辺部に明瞭に染色された。癌巣中心に向かって角化が進行する箇所では染色性が徐々に低下し、角化部分は陰性であった。これらの部位は miR-199a の標的遺伝子である Brm、CD44 は陽性であった。新規プロブが有効であったことから、プロブは長期保存せず使用することが miRNA 検出に重要である。

(3) 平成 27 年度

前年度では、miR-199a に対する LNA プロブを新規作製 (外注) することによって、染色性に問題があった ISH に改善がみられた。我々は miR-200c が、NF- κ B の制御下にあることや乳癌の進展に関与することを見出しつつあるため、今年度は、解析対象を miR-200c とした。さらに EpCAM の発現が高い乳癌細胞では、miR-200c の発現が高いことも明らかに

している（投稿準備中）。そこで乳癌FFPE切片を用いて、EpCAMの免疫染色とmiR-200cのISHを行い、両者の発現を比較検討した。

EpCAMの免疫染色は比較的容易ではあったが、同一標本中に染色される癌とされない癌が混在しており、その意義は不明であった。miR-200cの発現は、EpCAMの発現と概ね相関しているといえるが、今後は症例数を増やしてさらに検討する必要がある。また、miR-199aと比較して、miR-200cの発現シグナルは極めて弱いため、その検出感度を向上させることも必要と考えられる。我々のISHは、生体内におけるmiRNAの発現様式を解析する上で有用ではあるが、プローブの保存期間、miRNAの種類、発現量、検体の条件によって染色性が落ちることがあり、それらのトラブルシューティングに大きく時間を割いた。解析対象のmiRNAごとに、プローブのLNA修飾部位や、hybridization、washの条件（温度、時間、バッファー組成など）を細かく検討する必要があると思われる。これらの知見を利用し、これまでの研究期間内で解析してきたmiR-199a、miR-200cとその標的遺伝子の詳細な比較検討、炎症反応との関連についてさらに研究を推進していく。

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11件）

Konno-Shimizu M., Yamamichi N., Inada K., Kageyama-Yahara N., Shiogama K., Takahashi Y., Asada-Hirayama I., Yamamichi-Nishina M., Nakayama C., Ono S., Kodashima S., Fujishiro M., Tsutsumi Y., Ichinose M., Koike K.

“Cathepsin E is a marker of gastric differentiation and signet-ring cell carcinoma of stomach: a novel suggestion on gastric tumorigenesis.”

PLoS One. 8(2): e56766. 査読あり

Shiogama K., Inada K., Kohara M., Teramoto H., Mizutani Y., Onouchi T., Tsutsumi Y.

“Demonstration of hepatitis C virus RNA with high-sensitivity in situ hybridization employing a locked nucleic acid probe in humanized liver of infected chimeric mice and in needle biopsied human liver”

Int. J. Hepatol. 2013, DOI 10.1155. 査読あり

Shiogama K., Wongsiri T., Mizutani Y., Inada K., Tsutsumi Y.

“High-sensitivity epidermal growth factor receptor immunostaining for

colorectal carcinomas, compared with EGFR PharmDxTM: A study of diagnostic accuracy”

Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2013, 6, 24-30. 査読あり

Kono R., Okuno Y., Nakamura M., Inada K., Tokuda A., Yamashita M., Hidaka R., Utsunomiya H.

“Peach (*Prunus persica*) extract inhibits angiotensin II-induced signal transduction in vascular smooth muscle cells”

Food Chem. 139, 371-6, 2013. 査読あり

Mizutani Y., Tsuge S., Takeda H., Hasegawa Y., Shiogama K., Onouchi T., Inada K., Sawasaki T., Tsutsumi Y.

“in situ visualization of plasma cells producing reative to *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis: The application of the enzyme-labeled antigen method”

Mol. Oral. Microbiol. 29, 156-73, 2014. 査読あり

Kageyama-Yahara N., Yamamichi N., Takahashi Y., Nakayama C., Shiogama K., Inada K., Konno-Shimizu M., Kodashima S., Fujishiro M., Tsutsumi Y., Ichinose M., Koike K.

“Gli regulates MUC5AC transcription in human gastrointestinal cells”

Plos One. 9, e106106, 2014. 査読あり

Onouchi T., Mizutani Y., Shiogama K., Inada K., Okada T., Naito K., Tsutsumi Y.

“Application of the enzyme-labeled antigen method to visualizing plasma cells producing antibodies against Strep A. a carbohydrate antigen. Of *Streptococcus pyogenes* in recurrent tonsillitis.”

Microbiol. Immunol. 59, 13-27, 2015. 査読あり

Kobayashi K., Sakurai K., Hiramatsu H., Inada K., Shiogama K., Nakamura S., Suemasa F., Kobayashi K., Imoto S., Haraguchi T., Ito H., Ishizaka A., Tsutsumi Y., Iba H.

“The miR-199a/Brm/EGR1 axis is a determinant of anchorage-independent growth in epithelial tumor cell lines”

Sci. Rep. 5, 8428, 2015. 査読あり

Shiogama K., Kitazawa K., Mizutani Y., Onouchi T., Inada K., Tsutsumi Y.

“New Grocott Stain without using chromic acid.”

Acta. Histochem. Cytochem. 48, 9-14, 2015.

査読あり

Matsui T., Onouchi T., Shiogama K., Mizutani Y., Inada K., Yu F., Hayasaka D., Morita K., Ogawa H., Mahara F., Tsutsumi Y.
“Coated glass slides TACAS are applicable to heat-assisted immunostaining and in situ hybridization at the electron microscopy level.”
Acta. Histochem. Cytochem. 48, 153-7, 2015.
査読あり

Mizutani Y., Shiogama K., Onouchi T., Sakurai K., Inada K., Tsutsumi Y.
“Enzyme-labeled antigen method: development and application of the novel approach for identifying plasma cells locally producing disease-specific antibodies in inflammatory lesions.”
Acta. Histochem. Cytochem. 49, 7-19, 2016.
査読あり

〔学会発表〕(計5件)

櫻井浩平、稲田健一、山道信毅、堤寛
「新規癌抑制 lncRNA nexus である DRAIC/PCAT29 は前立腺癌の進展を制御する」第74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月8日

伊庭英夫、小林和善、平松寛明、櫻井浩平、稲田健一、堤寛、原口健
「SWI/SNF クロマチン構造変換因子とmiRNAの視点に立った上皮癌の遺伝子制御ネットワークの理解」第74回日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月8日～10日

塩竈和也、尾之内高慶、水谷泰嘉、櫻井浩平、稲田健一、堤寛
「好中球細胞外トラップ(NETs)とフィブリンはHE染色で鑑別できるか？」
第56回日本組織細胞化学会 総会学術集会、大阪、2015年10月3日～4日

尾之内高慶、塩竈和也、松井貴弘、水谷泰嘉、櫻井浩平、稲田健一、堤寛
「NETsとフィブリンの微細構造：パラフィン切片を用いた走査型電顕および免疫電顕解析」第56回日本組織細胞化学会 総会学術集会、大阪、2015年10月3日～4日

水谷泰嘉、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤寛
「酵素抗原法の技術開発：ホルマリン固定パラフィン包埋切片作製過程における組織内の抗体失活要因の検証」第56回日本組織細胞化

学会 総会学術集会、大阪、2015年10月3日～4日

〔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 (INADA, Ken-ichi)
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
塩竈 和也 (SHIOGAMA, Kazuya)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：10387699

水谷 泰嘉 (Mizutani, Yasuyoshi)
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：