

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860277

研究課題名(和文) 病理組織検体を用いた安定したmicroRNA検出法の確立と肝臓診断への応用

研究課題名(英文) Improvement of in situ hybridization for microRNA and application to liver cancer diagnosis

研究代表者

熊谷 有紗 (KUMAGAI, ARISA)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：50596963

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)：近年、microRNAを組織切片上で検出可能な手法としてLNAプローブを用いたISH法が報告された。しかし、基礎的な手法の検討は十分になされておらず、組織形態とmicroRNAの安定した検出が困難であった。本研究で改良を加え、microRNAの良好な検出と組織形態保持を両立するISH法を確立した。HCCでは腫瘍巣周囲にmiR-21強陽性小型HCC細胞集塊が存在し、それらは免疫組織化学的に胆管細胞マーカーや肝幹細胞/前駆細胞マーカーを発現することが明らかとなった。また、CK19陽性HCCでは通常型HCC比べてmiR-21発現が高頻度にみられ、細胞増殖能や浸潤能へ関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recently, microRNA in situ hybridization using locked nucleic acid probe has been developed as a new method for detection of microRNA expression on formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. However, it needed improvement to detect both microRNA expression and histological features constantly. In this study, we have focused on improving the methods of microRNA in situ hybridization for detection of microRNA expression on clinical human tissue samples. By applying established ISH, it was clarified that the localization and morphological and immunohistochemical features of HCC cells with miR-21 expression as well as clinicopathological significance of miR-21 in HCC. In addition, it was also indicated that miR-21 expression was more frequently observed in HCCs with CK19 expression which are associated poor prognosis than usual HCC without CK19 expression.

研究分野：人体病理学、分子病理学

キーワード：microRNA in situ hybridization法 肝細胞癌 miR-21

1. 研究開始当初の背景

microRNAは細胞の分化や病気の進展に関わる遺伝子およびタンパク質発現を制御する重要な役割を果たしていることが明らかとなり、特異的な microRNA が診断マーカーや分子標的治療および予後の指標と考えられ始めている。

Locked nucleic acid probe を用いた microRNA in situ hybridization (ISH) 法は陽性シグナルを免疫組織化学的手法により検出可能であり、光学顕微鏡下で細胞形態学的変化と microRNA 発現を合わせて判定することができる新しい microRNA 検出法である。しかし、安定してシグナルを検出するための手技的検討は十分になされていない。腫瘍の発生、進展の分子メカニズムに基づいた分子標的治療の開発が進むにつれ、病理診断には治療の進歩に対応可能な分子病理学的特徴を含めた包括的な診断情報の提供が必要となると考えられる。本研究では、microRNA ISH 法の改良と病理診断、研究への有用性について検討する。

近年、胆管細胞形質を発現する肝細胞癌は通常の肝細胞癌と異なる病変の進行や治療抵抗性を示すと言われているが、その発生機序は未だ解明されていない。我々のこれまでの免疫組織化学的検討においても、胆管細胞マーカーが肝細胞癌で発現することが明らかとなった。肝癌における microRNA の発現を組織細胞形態と合わせて検出し、その特徴を明らかにするとともに通常の肝細胞癌と胆管細胞形質を発現する肝細胞癌との違いについて検討する。

2. 研究の目的

microRNA の良好な検出と細胞形態保持を両立する microRNA ISH 法を確立する。改良した microRNA ISH 法を用いて、肝癌で発現変動が報告されている microRNA の検出を行い、肝癌診断への応用とその有用性について検討する。さらに、この手法を用いて肝細胞癌を中心に

microRNA の腫瘍内での発現の分布や組織細胞形態との関連性を詳細に検討し、腫瘍の分化、進展や転移との関係、肝細胞癌における胆管細胞形質発現との関連について検討する。

3. 研究の方法

(1) 良好な microRNA 検出と細胞形態保持を両立する ISH 法の確立

肝細胞癌を含む様々な癌で発現変動が報告されている miR-21 を始め、miR-145、-143、-200a、-200b 等に対するプローブを用いて、至適条件の検討を行う。検討は前処理、ハイブリダイゼーション、シグナル検出の3段階に分けて行う。

(2) 改良した ISH 法を用いて肝細胞癌における miR-21 発現細胞の局在と免疫組織化学的特徴を明らかにする。

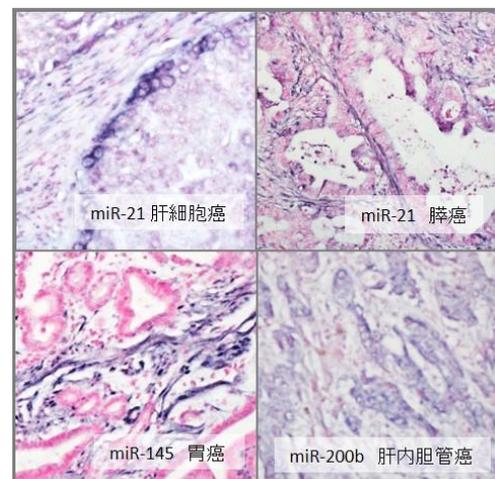
(3) 胆管細胞マーカーCK19 陽性 HCC の臨床病理学的特徴と miR-21 発現との関連について検討する。

4. 研究成果

(1) 安定した microRNA 検出と細胞形態保持を両立する ISH 法を確立した。

前処理: proteinase K → Pepsin への変更、ハイブリダイゼーション: 反応温度と反応時間の変更、シグナル検出: 発色液 (NBT/BCIP) の反応時間延長により、microRNA の良好な検出と細胞形態保持の両立が可能となった(図1)。

図1 至適条件下の ISH 法による microRNA 検出



(2) 改良した ISH 法により肝細胞癌における miR-21 発現細胞の局在と免疫組織化学的特徴を明らかにするとともに、臨床病理学的意義について検討した。

肝細胞癌(HCC)52 例中 31 例(59.6%)において腫瘍細胞で miR-21 の発現が同定され、HBV 感染、分化度との関連を認めた。さらに miR-21 陽性 HCC 31 例中 16 例(51.6%)において miR-21 強陽性を示す小型 HCC 細胞集塊がみられ、腫瘍内線維性間質の程度との関連を認めた。miR-21 強陽性小型 HCC 細胞集塊は N/C 比の高い細胞で構成され、腫瘍胞巣周囲の線維性間質に接して存在していた。これらの小型 HCC 細胞 16 例中 13 例で免疫組織学的にいわゆる肝幹細胞/前駆細胞マーカーの陽性、肝細胞マーカーHepPar1 の陰性を示した(図 2、表 1)。

図 2 miR-21 強陽性小型 HCC 細胞集塊の免疫組織化学(代表例)

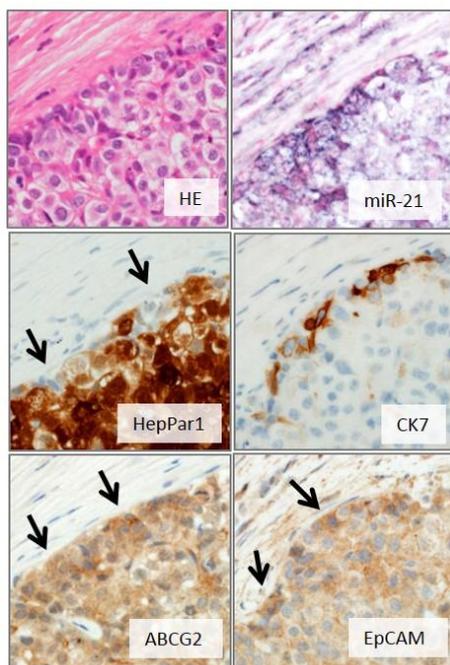


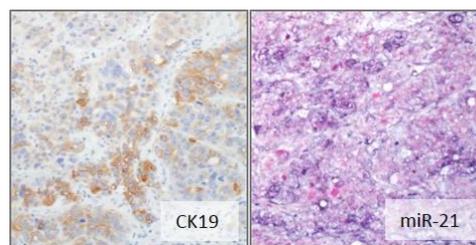
表 1 miR-21 強陽性小型 HCC 細胞集塊の免疫組織化学的特徴

Case	Hep Par1	CK 7	Hepatic stem/progenitor cell markers										No. of positive stem/progenitor cell markers	Fibrosis within HCC
			ABC G2	CK 19	EpC AM	CD 56	Dlk 1	CD 90	CD 133	c-Kit				
1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3	+
2	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	3	+
3	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	3	+
4	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	3	+
5	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	4	-
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	3	-
7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
8	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	+
9	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	+
10	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
11	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1	+
12	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1	+
13	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1	+
14	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-

(3) CK19 陽性 HCC の臨床病理学的特徴と miR-21 発現について検討した。

CK19 は HCC 50 例中 10 例(20%)で陽性を示し、肝内転移および門脈浸襲のある群、隔壁形成のある群、腫瘍内線維性間質陽性(≧10%)群で有意に多く認められた(p<0.05)。一方、miR-21 は 50 例中 29 例(58%)で陽性を示し、CK19 と同様に肝内転移、隔壁形成、腫瘍内線維性間質との関連が見られた他、B 型肝炎ウイルス感染群、分化度が中または低分化度群で有意に miR-21 の発現が見られた。また、CK19 陽性 HCC では CK19 陰性 HCC に対して miR-21 の発現頻度が有意に高く、CK19 発現と miR-21 発現の関連が示唆された(p<0.05)(図 3)。

図 3 CK19 及び miR-21 の代表的な陽性像



同一結節内で CK19 及び miR-21 発現が認められる

本研究の ISH 法を用いた microRNA 検出により、肝細胞癌では腫瘍胞巣周囲の線維性間質に接して miR-21 強陽性小型 HCC 細胞集塊が存在し、免疫組織化学的に胆管細胞マーカーや肝幹細胞/前駆細胞マーカーを発現する特異的な性質を有することが明らかとなった。また、癌遺伝子的な役割を持つ miR-21 が通常型の肝細胞癌に比べて CK19 陽性肝細胞癌で高頻度に発現していることが明らかとなり、CK19 陽性肝細胞癌において miR-21 が細胞増殖能や浸潤能に関わっている可能性が考えられた。

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 2 件)

- ① Kumagai A, Kondo F, Sano K, et al. Immunohistochemical study of hepatocyte, cholangiocyte and stem cell markers of hepatocellular carcinoma: the second report - relationship with tumor size and cell differentiation. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読あり, 2016 (in press) doi: 10.1002/jhbp.356.
- ② Uozaki H, Morita S, Kumagai A, et al. Stromal miR-21 is more important than miR-21 of tumour cells for the progression of gastric cancer. Histopathology, 査読あり, 65(6):775-83, 2014. doi: 10.1111/his.12491.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 近藤福雄、熊谷有紗、石田毅、他：肝臓の胆管形質と幹細胞形質の発現、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 14 日、仙台国際センター、仙台市。
- ② 熊谷有紗、渡部朱織、渡邊雅人、他：膵臓間質における miR-21、CD10、Podoplanin、Periostin の発現、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 13 日、仙台国際センター、仙台市。
- ③ 近藤福雄、前野佐和子、熊谷有紗、他：混合型肝臓の病理診断の諸問題に関する見解、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 13 日、仙台国際センター、仙台市。
- ④ 石田毅、近藤福雄、熊谷有紗、他：肝臓癌における幹細胞性形質発現の免疫組織化学的検討、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12 日、仙台国際センター、仙台市。
- ⑤ 東海林琢男、近藤福雄、熊谷有紗、他：胆管細胞癌における幹細胞マーカー発現の検討、2016 年 5 月 12 日、仙台国際センター、仙台市。
- ⑥ 菊地良直、大野玲奈、熊谷有紗、他：膀胱癌の腫瘍細胞および腫瘍間質細胞における in situ hybridization 法を用いた miR-21 発現に関する検討、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12 日、仙台国際センター、仙台市。
- ⑦ 熊谷有紗、渡部朱織、渡邊雅人、他：CK19 陽性肝臓癌における microRNA-21 の発現、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 5 月 1 日、名古屋国際会議場、名古屋市。
- ⑧ 池田豊、近藤福雄、熊谷有紗、他：細胆管細胞癌の形態学的・組織化学的検討、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 5 月 1 日、名古屋国際会議場、名古屋市。
- ⑨ Kumagai A, Aso T, Morita S, et al: microRNA-21 expression in human hepatocellular carcinoma tissues、4th International Kyoto Liver Cancer Symposium、2014 年 6 月 7 日、国立京都国際会館、京都市。
- ⑩ 大野玲奈、熊谷有紗、森田茂樹、他：透析患者のバスキュラーアクセスの狭窄病変における microRNA の発現、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 26 日、広島国際会議場、広島市。
- ⑪ 熊谷有紗、副島友莉絵、渡邊雅人、他：肝臓癌における miR-21 発現細胞の特徴と臨床病理学的意義、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24 日、広島国際会議場、広島市。
- ⑫ 副島友莉恵、熊谷有紗、渡邊雅人、他：細胆管細胞癌における $\alpha v \beta 6$ 、 $\alpha 6 \beta 4$ 、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンと細胞外基質の発現、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24 日、広島国際会議場、広島市。
- ⑬ Kumagai A, Takahashi Y, Morita S, et al: Small cell clusters with high expression of miR-21 in human hepatocellular carcinoma show intermediate phenotype as well as a close association with fibrous

stromal reaction, 103rd Annual Meeting,
United States and Canadian Academy of
Pathology, 2014年3月4日、米国、サン
ディエゴ.

[図書] (計2件)

- ① 福里利夫、熊谷有紗：In situ hybridization 法の応用、組織細胞化学。2015:93-8, 2015.
- ② 福里利夫、高橋芳久、熊谷有紗、他：【最新肝癌学-基礎と臨床の最新研究動向-】
肝癌の浸潤・転移 肝細胞癌の浸潤様式、
脈管侵襲、転移機序、日本臨床、73 増刊
1 最新肝癌学：307-10, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 有紗 (KUMAGAI ARISA)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：50596963