

平成30年6月7日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19347

研究課題名(和文)大腸カルチノイドの転移因子の探索

研究課題名(英文)Predictive marker for metastasis in NET-G1

研究代表者

北村 晋志(KITAMURA, Shinji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：60564490

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): miRNAアレイ解析で、脈管侵襲陰性症例と比較し、陽性症例で有意に発現強度が高かったmiR-144-3p、miR-451a、miR-551b-3p、miR-486-5p、miR-10b-5pの5つのmiRNAを同定した。TargetScan、IPA解析などをおこない、直腸カルチノイドの脈管侵襲に関わるmiRNAとして、miR-144-3p、miR-451aが同定された。miR-144-3pはPTENを、miR-451aはp19をtargetとし、標的遺伝子の発現を抑制することで、遊走能、浸潤能を上昇させることが示唆された。

研究成果の概要(英文): We performed miRNA array analysis using 7 NET-G1 tumors with LVI and 7 without LVI. Identified miRNA expression level was evaluated by RT-PCR. Target genes were examined by IPA and TargetScan analyses. A NET cell line H727 transfected with miRNA mimic or target gene siRNA was examined for proliferation, migration and invasion. The expression levels of miR-144-3p and miR-451a in NET-G1 tumors with LVI were significantly higher than those without LVI with miRNA array analysis and RT-PCR. The target gene analyses revealed that miR-144-3p and miR-451a directly interact with PTEN and p19 mRNA, respectively. The miR-451a mimic significantly increased cell migration, and miR-144-3p mimic significantly increased cell invasion. Knockdown of PTEN induced significant augmentation of cell invasion. The miR-144-3p and miR-451a may be associated with metastasis in NET-G1 through repression of PTEN/p19.

研究分野：消化器内科

キーワード：直腸カルチノイド

1. 研究開始当初の背景

神経内分泌腫瘍は2010年のWHO分類から、Ki67と核分裂像を基準とし、NET G1, NET G2, NECに分類された。NETはカルチノイドと呼ばれ、大腸では特に直腸に多いことが知られている。大腸カルチノイドは完全切除可能なものに対しては、第一選択として内視鏡的切除が試みられることが多く、脈管侵襲のない10ミリ以下の腫瘍を内視鏡治療の適応とする施設が多いが、内視鏡治療適応に関する明確な基準は存在しておらず、治療方針を決定する明らかなエビデンスは存在しない。大腸カルチノイドの大部分が直腸Rbに存在する病変であることも大きな問題であり、追加外科切除においては人工肛門を必要とするなど、非常に侵襲の多い治療となることから、実臨床では腫瘍径や脈管侵襲の有無を踏まえた上で、患者自身と相談の上で、治療方針を決定しているのが現状である。

近年では内視鏡技術の進歩から微少な大腸カルチノイドが発見されることも少なくないが、大腸カルチノイドでは微小病変であっても転移を認める症例も存在し、脈管侵襲のある症例については小病変であっても手術が行われているが、大部分の症例には転移を認めないため、over surgeryとなっていることが問題視されている。現在のところ術前にリンパ節転移の有無を調べる方法はない。つまりリンパ節転移の分子機構を解明することで、リンパ節転移を未然に防ぐ診断・治療方法と同時にリンパ節転移の有無を正確に予測しうるバイオマーカーの開発が求められている。

ところで、microRNA (miRNA) は生命現象の様々な局面で重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。miRNAのもととなるDNAはゲノム上に存在する非翻訳領域に局在しており、転写・修飾により mature miRNA となると、その集積により他の遺伝子の翻訳を抑制してタンパク機能を調節する。近年がんの発生・増殖・転移との深い関与が多数報告されており、中には miR21 のようにがんの制御において中心的役割を担っていると考えられるものも見出されている。従ってリンパ節転移に関わる miRNA を同定し、その miRNA によって制御されているタンパク質の同定及びその機序を明らかにすることで、転移の分子機構に関する重要な情報が得られると考えられる。一方、最近がんの転移と上皮間葉転換 (EMT) 及び間葉上皮転換 (MET) との関係が注目されている。EMT/MET は幹細胞の維持や炎症の制御などの恒常性維持機構、さらには虚血性疾患やがんの悪性形質 (転移・浸潤、治療抵抗性など) に関与していることが明らかとなってきた。

Hypoxia-Inducible Factor (HIF) が様々な経路を介して、EMT を引き起こすという報告もされている。しかしリンパ節転移における、EMT/MET の制御の分子機構、miRNA

との関係はまだ十分に解明されていない。miRNA によって発現制御されているタンパク質と EMT/MET 及び低酸素状態との関係を明らかにすることは、リンパ節転移の総合的な分子機構の理解、更には転移の分子機構に基づいた治療方法及びリンパ節転移の術前診断につながると考えられる。

2. 研究の目的

大腸カルチノイド (NETG1) は大部分が直腸に発生し、その治療にはまず内視鏡治療が試みられる。脈管侵襲陽性例等、転移リスクが高い症例では追加外科切除が行われるが、over surgery という問題点や転移症例に対する治療の観点から、その分子機構の解明に基づく診断方法や治療方法の開発が求められている。申請者らはこれまでに、大腸カルチノイドの脈管侵襲陽性及び陰性の臨床検体の比較研究に取り組み、陽性例で有意に発現が抑制されている microRNA を同定した。本研究では CRISPR Cas という新しいゲノム編集技術を用いて、上記遺伝子の KO (knock out) 及び安定高発現細胞株を樹立し、in vivo でリンパ節転移に関わる遺伝子を特定、in vitro で遺伝子の相互関係を解明し、転移の分子機構に基づいた治療方針の決定を目指す。

3. 研究の方法

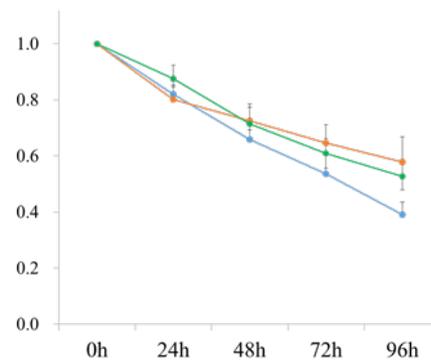
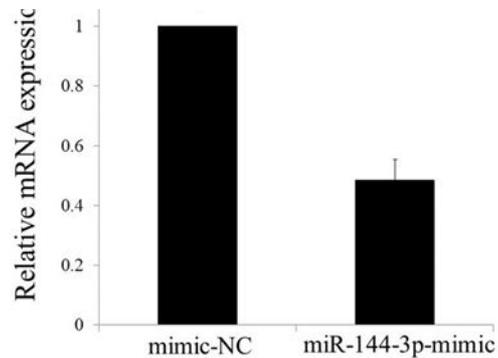
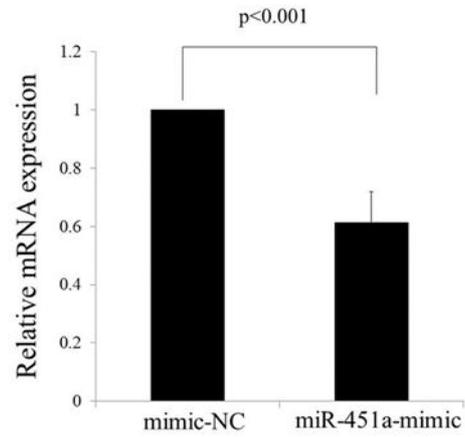
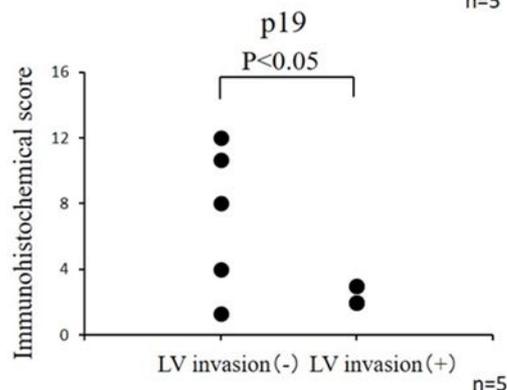
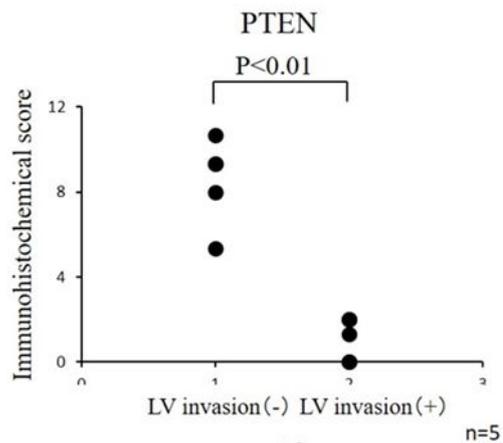
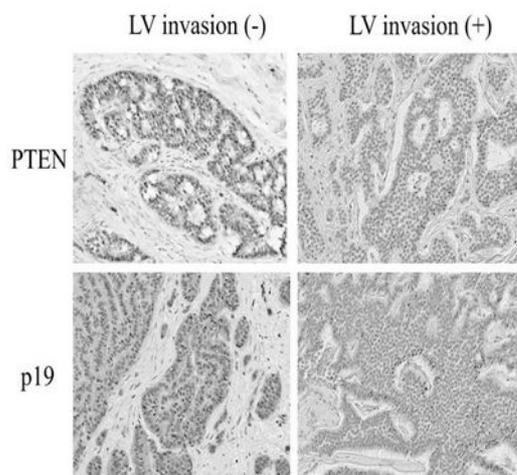
内視鏡的治療により切除された 10mm 以下の直腸カルチノイドを対象として、特殊・免疫染色にて脈管侵襲の有無を再評価し、年齢、腫瘍径をほぼ適合させた脈管侵襲陰性症例 7 例 (平均年齢: 51.3 歳、平均腫瘍径: 6.7mm、男女比: 3:4)、陽性症例 7 例 (平均年齢: 56.7 歳、平均腫瘍径: 6.4mm、男女比: 6:1) に対して miRNA アレイ解析を行った。アレイ解析により抽出された miRNA の発現は、新たな組織で RT-qPCR により評価し、次いで、TargetScan・IPA 解析で同定された標的遺伝子の発現については免疫染色にて評価した。さらに、カルチノイド培養細胞株 (H727 細胞) を用いて、抽出された miRNA を疑似的過剰発現させ、増殖能、遊走能、浸潤能を調べるとともに、標的遺伝子の siRNA を用いたノックダウン実験を行い、同様に機能解析を行った。

4. 研究成果

miRNA アレイ解析で、脈管侵襲陰性症例と比較し、陽性症例で有意に発現強度が高かった miR-144-3p、miR-451a、miR-551b-3p、miR-486-5p、miR-10b-5p の 5 つの miRNA を同定した。RT-qPCR にて、脈管侵襲陽性検体において miR-144-3p と miR-451a の発現のみが有意に高かった。次いで、TargetScan、IPA 解析にて miR-144-3p は PTEN が、miR-451a は CDKN2D (p19) が標的遺伝子であることを同定し、免疫染色にて脈管侵襲陽性症例において有意にその発現が低下していることを確認

した。さらに、miR-144-3p, miR-451a を疑似的過剰発現した H727 カルチノイド細胞に対して PTEN, p19 を RT-qPCR により解析した結果、それぞれ control と比較して有意に発現量が低下し、Wound healing Assay、Invasion Assay にて miR-451a は遊走能が、miR-144-3p は浸潤能が有意に上昇した。次いで、PTENsiRNA を導入した H727 細胞でも同様に浸潤能が有意に上昇した。

【結語】直腸カルチノイドの脈管侵襲に関わる miRNA として、miR-144-3p、miR-451a が同定された。miR-144-3p は PTEN を、miR-451a は p19 を target とし、標的遺伝子の発現を抑制することで、遊走能、浸潤能を上昇させることが示唆された。



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)

〔学会発表〕(計 3 件)

Jinsei Miyoshi, Noriaki Murayama, Tadahiko Nakagawa, Tetsu Tomonari, Shinji Kitamura, Koichi Okamoto, Hiroshi Miyamoto, Yasushi Sato, Naoki Muguruma and Tetsuji Takayama : Mir-144-3P/451A as a Novel Biomarker for Predicting Recurrence and Metastasis in Rectal Neuroendocrine Tumors Through Targeting Pten/P19., Digestive Disease Week 2018, Washington, D.C., Jun. 2018.

Masanori Takehara, Naoki Muguruma, Koichi Okamoto, Kazuyoshi Noda, Kaizo Kagemoto, Yuri Matsumoto, Tadahiko Nakagawa, Shunsaku Takeishi, Jun Okazaki, Daisaku Fujimoto, Shinji Kitamura, Tetsuo Kimura, Hiroshi Miyamoto and Tetsuji Takayama : Endoscopic Resection is safe and effective for rectal carcinoid tumors., The First World Congress of Gastrointestinal Endoscopy,, Hyderabad, Feb. 2017.

NET に対する治療戦略 10mm 以下の直腸カルチノイド(NET-G1)に対する内視鏡的治療の有用性の検討 松本 早代(徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部消化器内科), 岡本 耕一, 六車 直樹, 中川 忠彦, 関 峻太, 武原 正典, 影本 開三, 高岡 慶史, 岡崎 潤, 藤本 大策, 木村 哲夫, 北村 晋志, 宮本 弘志, 岡久 稔也, 高山 哲治 日本癌治療学会学術集会 第54回(2016年10月)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北村 晋志 (KITAMURA, Shinji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：6 0 5 6 4 4 9 0