

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06855

研究課題名(和文) 消化管粘膜下腫瘍におけるmicroRNA解析から導かれる病態解明と予後因子予測

研究課題名(英文) Elucidation of pathway and prognostic factor prediction derived from microRNA analysis in gastrointestinal submucosal tumor

研究代表者

小原 英幹 (Kobara, Hideki)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10612476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：消化管粘膜下腫瘍は、臨床的には、疾患比率的にGISTと良性平滑筋腫の鑑別意義は大きい。侵襲的な組織採取法でなく、血液のみで両者の鑑別ができないかmiRNAに着目した。そこで探索を重ねた結果、血清中のexosomeに含まれるmiRNAに着目し、解析した結果、7分子のmiRNAの発現に有意な差があった。7分子のうち、GIST腫瘍組織と正常組織のmiRNAの比較においても、発現に有意な差があった3分子のmiRNAをreal-time qPCRによる定量の対象とし解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Distinguishing between GIST and benign leiomyoma among gastrointestinal submucosal tumors is clinically significant. We focused on miRNAs, not invasive tissue collection methods, but whether they can differentiate both by blood alone. As a result of focusing on miRNA contained in exosome in serum, there was a significant difference in expression of 7 molecules of miRNA. Of the 7 molecules, we identified three molecules of miRNA that had significant differences in the miRNA expression of GIST tumor tissue and normal tissue. Accordingly, we are going to further investigate whether these molecules would work as a target of quantification by real-time qPCR.

研究分野：消化管粘膜下腫瘍

キーワード：消化管粘膜下腫瘍 消化管間葉系腫瘍 microRNA exosome

1. 研究開始当初の背景

消化管粘膜下腫瘍は、正常粘膜に覆われ、粘膜上皮を主体に発育する腫瘍の総称であり、通常の上皮組織生検で診断困難である。それゆえ、特に小さな腫瘍では、未診断のまま、経過観察され患者様の不安感は拭えない。臨床的には、疾患比率的に悪性の素質を有する消化管間葉系腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor: GIST) と良性平滑筋腫の鑑別意義は大きい。また、microRNA による特定の遺伝子の発現調節、翻訳制御のメカニズムの異常と GIST の関連性の研究は、新しい病態解明の足がかりとなると考えられる。

2. 研究の目的

我々が開発した内視鏡による粘膜下トンネル生検法の特徴は、従来の組織採取法に比較し、小さな腫瘍でも腫瘍視認下に確実な純検体を得ることが可能な点である。基礎研究に適したその純検体を用いて microRNA の網羅的解析を行い、有意発現した特異的 microRNA が新たな血清学的鑑別マーカーとなる診断法の確立を目的とした。さらに、GIST の増殖・転移能について microRNA による分子メカニズム解明を進めていくとともに新たな創薬の可能性を探求した。

3. 研究の方法

前述のトンネル生検法で得られた Fletcher 分類転移低リスク GIST 9 例と良性平滑筋腫 6 例のヒト組織サンプルにおいて 2555 種類の microRNA のうち real time qPCR 法で有意差のみられる候補マーカー miRNA を抽出した。そこで GIST 10 例と平滑筋腫 6 例の血清において組織中で有意発現した miRNA が血清の鑑別マーカーになるかどうかを探索した。また、GIST の増殖・転移能について microRNA による分子メカニズム解明を目的とした研究では、GIST 野生株とスニチニブ耐性株を入手後、トランスクリプトーム解析及び miRNA の

網羅的解析をそれぞれ行った。そしてトランスクリプトーム及び miRNA のアレイデータを組み合わせてパスウェイ解析を行った

4. 研究成果

腫瘍組織において GIST と平滑筋腫を鑑別診断できる miRNA が新たに複数存在した (miR-140 family, miR-133 family, miR-378 family)。

【(GIST vs 平滑筋腫: miRNA の発現プロフィール (GIST で発現の高い miRNA)】

Name	Fold change	SD	p
Upregulated			
miR-140-5p	20.81	16.38	0.0164
miR-140-3p	17.30	11.71	0.0074
miR-181a-5p	7.96	6.56	0.0313
miR-199a-5p	3.79	2.76	0.0404
miR-3151-5p	2.52	1.04	0.0089
miR-483-5p	2.31	0.83	0.0074
miR-30a-5p	2.20	1.13	0.0408

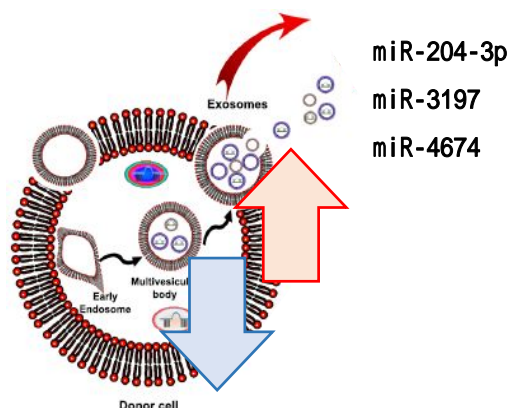
【(GIST vs 平滑筋腫: miRNA の発現プロフィール (GIST で発現の低い miRNA)】

Name	Fold change	SD	p
Downregulated			
miR-133b	0.04	0.02	0.002
miR-133a-3p	0.05	0.04	0.0029
miR-195-5p	0.22	0.27	0.0056
miR-378a-3p	0.24	0.16	0.0204
miR-378c	0.26	0.19	0.0179
miR-378i	0.26	0.2	0.0164
miR-378e	0.26	0.21	0.0213
miR-378d	0.26	0.2	0.0223
miR-378g	0.26	0.26	0.0226
miR-378f	0.28	0.2	0.018

血清において、これらの miRNA の含有量には、GIST と平滑筋腫の間に有意な差はなかった。血清 RNA から抽出した miRNA は、GIST の血清バイオマーカーとなる可能性が乏しいと判断した。そこで、血清に含まれる全ての miRNA ではなく、血清 exosome に含まれる miRNA のバイオマーカーとしての可能性を検討した。GIST 7 例と平滑筋腫 5 例の血清 exosome miRNA の発現をアレイチップ 2555 分子で比較した。t 検定で絞り込むと、13 分子が GIST で上昇し、9 分子が GIST で低下していた。しかしながら、FDR<10%で絞り込むと、有意に変動している miRNA は検出されなかった。GIST 症例を追加することはできたものの、平滑筋腫症例の集積に難渋したため、方針を変更し、GIST10 例(トンネル生検例)と健常者 10 例で血清 exosome miRNA を比較することにした。GIST と平滑筋腫の血清学的鑑別はできないが、この利点は、血清検体を確保しやすいことや同定される miRNA で GIST を含む消化管間葉系腫瘍のスクリーニング検査が可能になる点である。また、GIST の外科切除例 10 例を確保し、腫瘍組織の miRNA と腫瘍周囲正常組織の miRNA の比較検討を追加した。以上の検討の結果、血清 exosome miRNA の比較において、7 分子の miRNA の発現に有意な差があった。この 7 分子のうち 3 分子(miR-204-3p, miR-3197, miR-4674)においては、GIST 腫瘍組織と周囲正常組織の miRNA の比較においても、発現に有意な差があった。

Name	血清 exosome (GIST/健常者)	p	組織 (GIST/正常)	p
miR-204-3p	6.247	0.0007	0.421	0.0002
miR-3197	1.921	0.0001	0.524	0.0147
miR-4674	1.730	0.0007	0.700	0.0174

この 3 分子の miRNA を real-time qPCR による定量の対象とした。



次に、アレイチップで解析した 2555 種類の血清 exosome miRNA の中から、real-time qPCR で上記 3 分子を定量する際の内部コントロールに適する miRNA を選択した。内部コントロールに適する miRNA が満たすべき条件として、(1) GIST 群及び健常者群の各々において群内の発現の変動が小さいこと、(2) 群間の発現の差が小さいこと、(3) アレイチップで解析した際の miRNA 信号が十分大きく、real time qPCR で定量可能なもの、を設定した。これらの条件を満たす miRNA の 2 分子を選び、継続して解析中である。GIST の増殖・転移能について microRNA による分子メカニズム解明研究の結果では、スニチニブ耐性に関連すると考えられる miRNA 及びその標的遺伝子の組み合わせを同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kobara Hideki, Mori Hirohito, Fujihara Shintaro, Nishiyama Noriko, Fujita Koji, Iwama Hisakazu, Masaki Tsutomu et al.
Comparison of submucosal tunneling biopsy versus EUS-guided FNA for gastric subepithelial lesions: a prospective study with crossover design. Endoscopy International Open. 2017;5:E695-705. (査読有) DOI:

<https://doi.org/10.1055/s-0043-112497>

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 英幹 (KOBARA Hideki)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10612476

(2) 研究分担者

正木 勉 (MASAKI Tsutomu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：30335848

森 宏仁 (MORI Hirohito)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20568844

藤田 浩二 (FUJITA Koji)

香川大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50749421

藤原 新太郎 (FUJIHARA Shintaro)

香川大学・医学部・協力研究員

研究者番号：30612486

大森 典子(西山典子)(NISHIYAMA Noriko)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50613410

森下 朝洋 (MORISHITA Noriko)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60423430

(3) 連携研究者

岩間 久和 (IWAMA Hisakazu)

香川大学 総合生命科学研究センター

遺伝子研究部門・准教授

研究者番号：20398035