

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08640

研究課題名(和文) 原発不明がんの治療成績向上を目的とした、がん組織由来マイクロRNAの網羅的解析

研究課題名(英文) Global analysis of cancer-tissue-derived microRNA to improve treatment outcome of cancer of unknown primary

研究代表者

大越 靖 (OKOSHI, Yasushi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10400673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ホルマリン固定・パラフィン包埋(FFPE)検体として保存されたリンパ節転移組織のマイクロRNA発現量から原発巣推定が可能か検証した。11腫瘍31検体を解析した結果、原発巣を正しく推定できたのは71%であった。精度を向上させる手法を検討したところ、そもそも腫瘍転移を伴うFFPEリンパ節組織ではmiRNA発現に必要な内在性コントロールが同定されていないことが判明した。よってFFPEリンパ節組織における内在性コントロールを同定する解析を実施した。その結果、miR-24、miR-103a、let-7aの組合せが最も安定な内在性コントロールであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To assess the primary tumor of metastatic lesion, we investigated microRNA (miRNA) expression patterns using formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) lymph node tissues. Initial analysis of 31 samples from 11 types of tumor resulted that the primary site was correctly predicted in 71%. To achieve higher accuracy, we noticed that an endogenous reference gene for miRNA expression analysis had not been identified in FFPE lymph node with metastatic cancer. A suitable endogenous reference gene should be evaluated to avoid misinterpretation of data and identify true changes in miRNA expression levels. Finally, we found that the combination of three miRNAs, miR-24/miR-103a/let-7a, could be used as a suitable endogenous reference in a lymph node with metastatic cancer.

研究分野：医学 血液内科

キーワード：原発不明がん マイクロRNA 原発組織 ホルマリン固定パラフィン包埋 リンパ節 内在性コントロール遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発不明がん (CUP) は臨床的に注意深い全身検査や経過観察をおこなっても原発を同定できない転移性の腫瘍を指し、不均一な疾患グループである。我が国においては、悪性新生物による死亡の 2 ~ 3 % を占めると推測される (安藤、新臨床腫瘍学改訂第 2 版 2009)。実臨床において、病変のリンパ節生検が良悪性の判定や、原発巣・病理組織像の特定のために行われている。このリンパ節組織を用いた新たな判定法で原発巣の推定が可能となれば、最適な治療法の選択がなされ、患者生存率の向上につながると考えられる。そこで、長期間安定でホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織からも抽出可能であり、網羅的な解析が可能となっているマイクロ RNA (miRNA) に注目した。

(2) 18 - 24 塩基程度の非常に短い一本鎖の miRNA は、近年様々ながん腫において、標的遺伝子や蛋白の調節因子として間接的、直接的に影響を及ぼし、腫瘍発生や腫瘍抑制への関与が指摘されている。これまで FFPE 組織は生体分子の分解や架橋結合などが生じるため、遺伝子解析には不向きであるとされていたが、近年 FFPE 組織から凍結切片とほぼ同等に miRNA を回収する方法が確立された。臨床情報の蓄積された検体の解析ができ、時間の壁を超える有用な情報を得る事が可能となっており、現在 FFPE 組織中の miRNA 発現に関して様々な研究が進行している。CUP においても、FFPE 組織を使用した網羅的な miRNA 発現解析が、原発巣推定に有用であることが報告されている (Meiri et al., The Oncologist 2012. Rosenfeld et al., Nat Biotechnol 2008)。

(3) しかしながら、既報の原発巣推定アルゴリズムは、既に確立されている miRNA 発現パターンに対応させる手法であり、データの蓄積がない施設ではどの程度の精度が得られるか不明である。また、miRNA 発現はリアルタイム PCR 法によって定量を行うが、リンパ節組織における内在性コントロールが同定されていない問題もあった。

(4) よって腫瘍の転移がある FFPE リンパ節組織を用いて miRNA 発現量を測定し、蓄積データを必要としない解析方法で原発巣推定が可能か検討することが必要と考えられた。また、識別精度向上に向けてカットオフ値の変更や内在性コントロールの特定など様々な検証を行う意義があると考えられた。

(5) miRNA 発現プロファイルによって原発巣の推定が可能となれば、追加の検体採取や特殊な保存、すなわち患者や現場の医師・パラメディカルに新たな負担を負わせることなく、CUP の原発巣予測に利用可能となり、CUP 診療の向上に寄与できると期待された。

2. 研究の目的

本研究は、リンパ節組織に転移した腫瘍に

おける miRNA 発現プロファイルを解析することで原発巣の特定を可能とすることが目的である。通常の検査で採取・保存する FFPE 組織検体を用いることで、新規原発不明がんの補助診断としての活用を目指す。

本目的を達成するため、原発巣推定アルゴリズムに最適な手法を検討し、精度向上に向けた最適カットオフ値の選出や最適内在性コントロールの特定など様々な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 研究は茨城県立中央病院で実施し、対象検体は原発巣が明確で転移腫瘍がある FFPE リンパ節組織とする。また、腫瘍細胞を含まない FFPE リンパ節組織を比較用の検体として使用する。リンパ節組織中の腫瘍細胞の有無は HE 染色で確認する。なおこの研究は茨城県立中央病院倫理委員会の承認を得て行った。

(2) FFPE リンパ節組織切片 10 μ m 4 枚から Total RNA を抽出し、miRNA 逆転写反応を行う。次に 96-well Pick & Mix microRNA PCR panel plates (Exiqon) を用いて qRT-PCR を実行し、miRNA 発現を測定する。

(3) 原発巣推定のブラインド試験を実施する。本試験は、Rosenfeld et al. (2008) による 48 種類の miRNA 発現を使用した原発巣推定アルゴリズムと Ct 中央値カットオフ法を採用して行う。

(4) 方法 3 におけるブラインド試験の精度が低い場合は、カットオフポイントの設定を変更して再度原発巣推定のブラインド試験を実施する。まず 48 miRNA の中央値を内在性コントロールとして Ct 値を算出し、miRNA ごとに計算した中央値をカットオフポイントとしてブラインド試験を行う。次に、Ct 値を用いて miRNA ごとに最適カットオフ値 (中央値・第 1 四分位・第 2 四分位) を算出・設定し、ブラインド試験を行う。本試験を行うことで適切なカットオフ値選出によって識別精度向上が可能か検討する。

(5) 方法 4 においても精度向上が見られない場合、発現量の基準となる内在性コントロールの選出を行う。まず Global mean 法の SD 値によって 10 種類の内在性コントロール候補を選出する。続いて遺伝子安定性の評価を行うために開発された 4 種類の解析手法 (BestKeeper 解析、geNorm 解析、NormFinder 解析、Comparative Ct 解析) を用いた安定性評価試験を行う。また、4 種類の解析を統合するため幾何平均法によるランク評価試験を行う。最後に選出した最適内在性コントロールの効果を検証する。

4. 研究成果

(1) Ct 中央値をカットオフ値としてブラインド試験を実行した結果、11 腫瘍 (大腸がん・乳がん・胃がん・肺がん・卵巣がん・膀胱がん・膵がん・悪性黒色腫・食道がん・甲状腺がん・前立腺がん) 31 検体における識

別精度は23%であった。

次に、Ct値を算出しmiRNAごとに設定した中央値カットオフポイントを用いて、ブラインド試験を行った。その結果、識別精度は48%であった。また、カットオフ値をmiRNAごとに最適なポイント(中央値・第1四分位・第2四分位)となるように設定してブラインド試験を行った結果、識別精度は71%となった。

(2) 正確なmiRNA発現量を決定する内在性コントロールを選出する解析を実施した。71種類のmiRNAを対象とし、41検体の転移腫瘍を含むリンパ節組織と16検体の腫瘍細胞を含まないリンパ節組織を用いた安定性評価試験を実施した。

71種類のmiRNA(Ct値)はすべての検体で正規分布を示した(Shapiro-Wilk test; $p > 0.1$ for all samples)。この結果に基づいて、Global mean法を採用し、ばらつきの低い10種類の候補遺伝子を選出した(miR-16, miR-21, miR-24, miR-34a, miR-92a, miR-103a, miR-148b, miR-152, miR-191, let-7a)。選出した10候補遺伝子を使用して4種類の安定性評価解析を行った結果、全ての解析においてmiR-103aが最も安定だと評価された(図1、図2)。

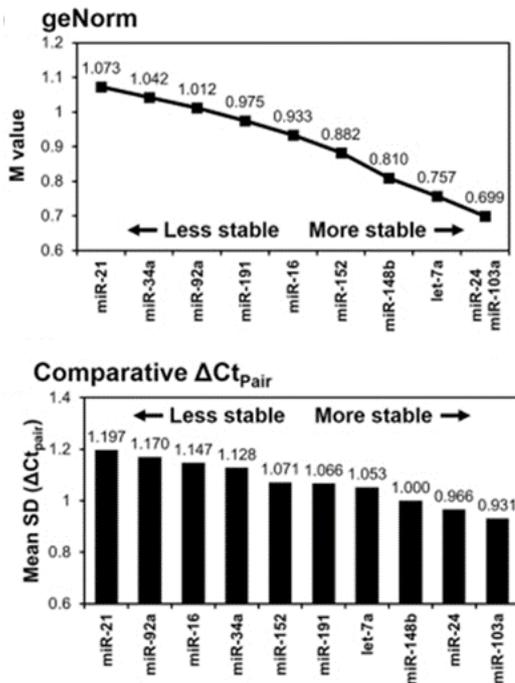


図1 安定性評価解析

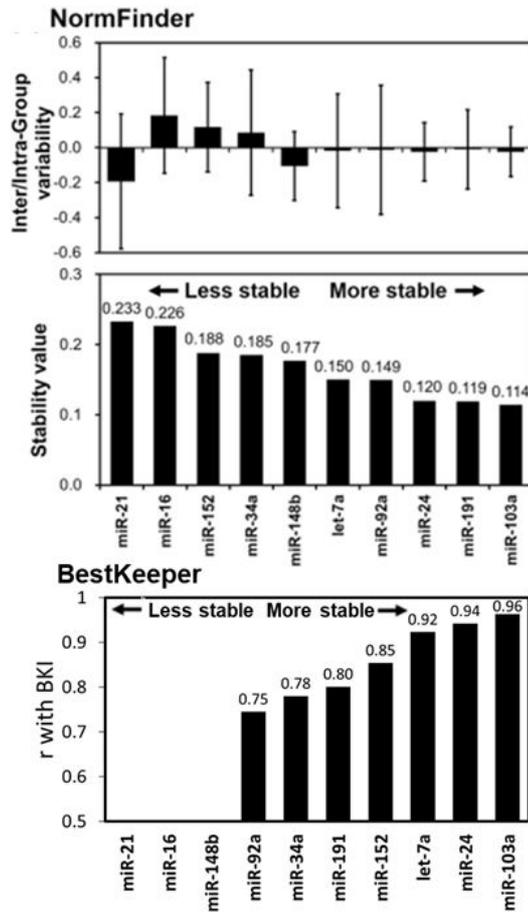


図1 安定性評価解析(続き)

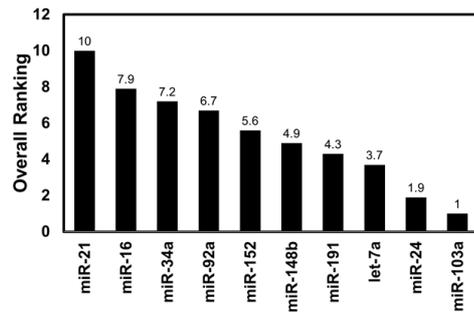


図2 ランク評価解析

しかし、geNorm解析においてmiR-103aのM値(0.699)が安定性の指標である基準値(0.5)をクリアしていないため、高い安定性を持つと断言できない。よって、候補遺伝子を組合わせて再度安定性評価解析を実施した。組合せ候補遺伝子は、NormFinder解析で選出されたmiR-148b/miR-152、図2のランク評価解析における上位2組を組合せたmiR-24/miR-103a、そして上位3組を組合せたmiR-24/miR-103a/let-7aを選出した。これら3種類の候補因子と、腫瘍miRNA発現研究で使用される6種類の内在性因子(miR-16、miR-191、miR-16/miR-34a、miR-16/let-7a、U6/SNORD44/SNORD48、Global mean)を用いて4種類の安定性評価試験とランク評価解析を実施した。その結果、

miR-24/miR-103a/let-7a が最も安定な内在性コントロール因子であることが明らかになった(図3、図4)。

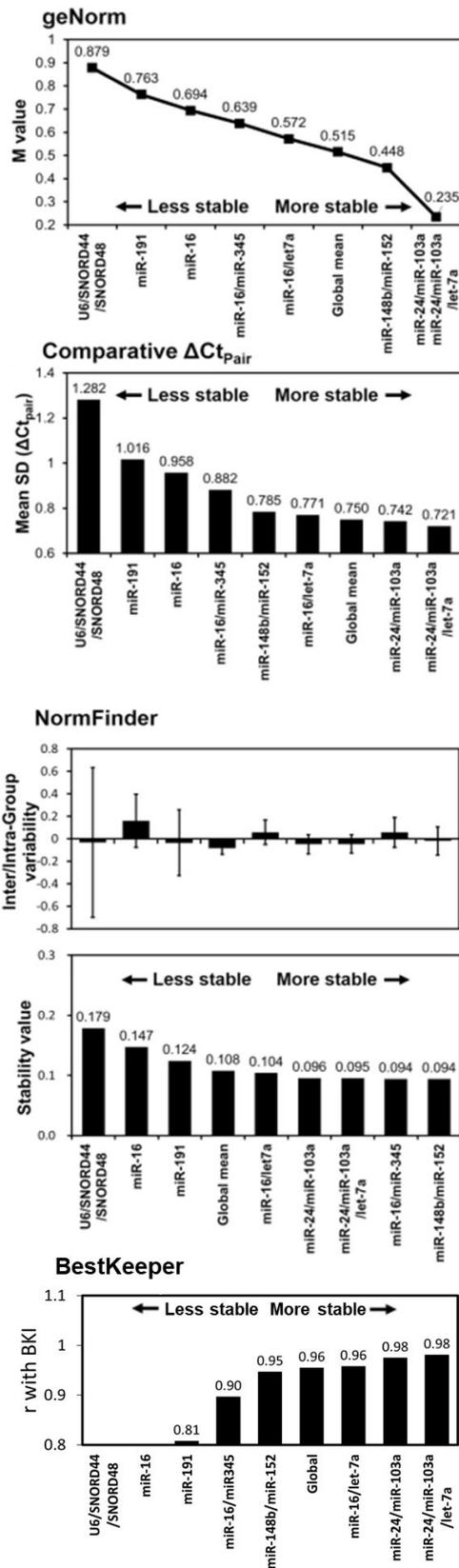


図3 組合せ遺伝子を用いた安定性評価解析

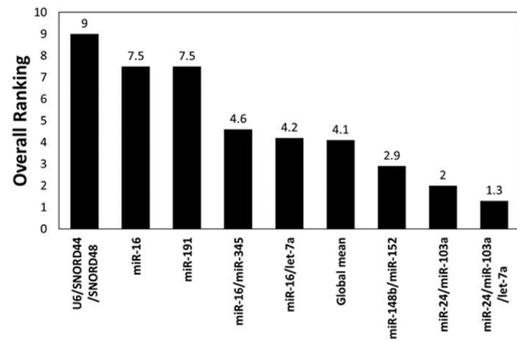


図4 組合せ遺伝子を用いたランク評価解析

本研究で特定した内在性コントロール因子 (miR-24/miR-103a/let-7a) の効果を確認するために、大腸がんのリンパ節転移組織を用いてmiR-29cの発現量を測定した。腫瘍転移と関連するmiR-29cは腫瘍組織中で発現低下することが報告されている。内在性コントロール因子をmiR-24/miR-103a/let-7aとした本研究においても有意に発現が低下することが確認された(図5)。よって、miR-24/miR-103a/let-7aが内在性コントロール因子として適切であることが示された。その一方で、内在性コントロール因子をmiR-24、miR-103a、miR-24/miR-103a、U6/SNORD44/SNORD48とした場合は有意差が示されなかった。よってこれらの使用は誤った結果を引き起こす可能性があるため、避けるべきである。

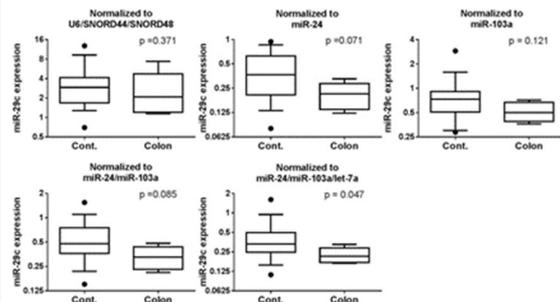


図5 各内在性コントロールによるmiR-29c発現

本研究によって複数のがん種にわたるFFPEリンパ節組織の内在性コントロールを特定した。このコントロールを用いてmiRNAごとに発現解析を行い、原発巣推定に使用する高精度アルゴリズムを開発することが期待される。

<引用文献>

安藤 正志、原発不明がん、新臨床腫瘍学改訂第2版、日本臨床腫瘍学会編集、南江堂、2009、652-661
Meiri et al., A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin, The Oncologist, 17(6), 2012, 801-812

Rosenfeld et al., MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin, Nature Biotechnology, 26(4), 2008, 462-469

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Inada K, Okoshi Y, Cho-Isoda Y, Ishiguro S, Suzuki H, Oki A, Tamaki Y, Shimazui T, Saito H, Horii M, Iijima T, Kojima H, Endogenous reference RNAs for microRNA quantitation in formalin-fixed, paraffin-embedded lymph node tissue, Scientific Reports, 8(1), 2018, 5918, doi:10.1038/s41598-018-24338-7, 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

稲田 勝重、大越 靖、張 愉紀子、飯嶋 達生、堀 光雄、小島 寛、リンパ節組織をもちいる microRNA 解析に適した内在性遺伝子の選出、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大越 靖 (OKOSHI, Yasushi)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：10400673

(2) 研究分担者

小島 寛 (KOJIMA, Hiroshi)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：10225435

島居 徹 (SHIMAZUI, Toru)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：80235613

玉木 義雄 (TAMAKI, Yoshio)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60188422

沖 明典 (OKI, Akinori)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60334067

鈴木 久史 (SUZUKI, Hisashi)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：40750740

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

稲田 勝重 (INADA, Katsushige)