

令和元年6月19日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08694

研究課題名(和文) 早期大腸癌のリンパ節転移に関わる微小環境の分子基盤

研究課題名(英文) MicroRNA expression profile correlated with early colorectal cancer with lymph node metastasis

研究代表者

立石 陽子 (Tateishi, Yoko)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20644438

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)：本研究の目的は、早期大腸癌の悪性度に関与するmicroRNAを明らかにすることである。我々は、リンパ節転移を有する粘膜下層浸潤癌の外科材料2例のホルマリン固定パラフィン包埋材料(FFPE)検体から、原発巣とリンパ節転移巣の腫瘍成分をレーザーマイクロダイセクションで切り分けRNAを抽出し、マイクロアレイを用いたmicroRNA網羅的発現解析を行った。原発巣とリンパ節転移巣との間に共通して2倍以上の変動がみられたものは、高度の発現上昇を示したものはmiR-125bで、発現低下を示したものはmiR-1228など8個であり、これらが早期大腸癌のリンパ節転移に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期大腸癌は多くが内視鏡切除により根治できるが、約10%にリンパ節転移を伴い外科切除が必要となる。このような高悪性度病変の峻別は早期大腸癌の病理診断における重要な課題である。本研究では、リンパ節転移を伴う早期大腸癌の原発巣とリンパ節転移巣のmicroRNA発現プロファイルを明らかにする。早期大腸癌の高悪性度病変を峻別する分子指標の同定することで、悪性度を予測するバイオマーカーとして臨床への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify the microRNAs (miRNA) expression profile in early (submucosal invasive) colorectal cancer (CRC) with lymph node metastasis. In two early CRC cases, the primary CRC elements and the lymph node metastasis elements were separately collected from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) specimens by laser microdissection system. Total RNAs were extracted and then subjected to comprehensive miRNA expression analyses (Agilent Expression Array). Differentially expressed miRNAs in the lymph node metastasis elements, whose levels showed more than two folds changes in compared to those of the primary CRC elements, were picked up. miR-125b was obtained as the upregulated miRNA, while eight miRNAs including miR-1228 were obtained as the downregulated miRNAs.

研究分野：病理

キーワード：早期大腸癌 リンパ節転移 microRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

進行大腸癌に対する主たる治療法は手術療法および術後補助化学療法であり、粘膜内癌に対する治療法は内視鏡的切除術である。その間の深達度に位置する粘膜下層浸潤癌(SM癌)では、約10%にリンパ節転移がみられ、所属リンパ節郭清を伴う外科手術が必要となるが、90%の症例は内視鏡的切除術による根治が期待される。実際の臨床の場では、大腸SM癌のうち手術を必要とする症例を如何に選別するかが、経済的、患者QOLの立場からも重要である。

Non-coding RNAの発現異常は多くの癌で報告され、新規バイオマーカーとして注目されている。microRNA(miRNA)は様々な遺伝子翻訳を制御することで発癌、浸潤、転移に寄与するとされている。進行大腸癌症例の凍結材料や血液を用いたmiRNA発現プロファイリングからは、大腸癌のスクリーニングや分子標的治療への応用が期待されている(Yamada et al. Clin Cancer Res.2015)。大腸SM癌においても特異的に発現するmiRNAを同定し、その働きを明らかにすることができれば、悪性を予測するバイオマーカーとして臨床への応用が期待される。

### 2. 研究の目的

今回の研究の目的は、早期大腸癌におけるmiRNAの発現を定量し、発現の局在を解析し、さらに臨床病理学的因子との相関を検討することである。

### 3. 研究の方法

(1) 当院にて切除された外科材料のうち、リンパ節転移を有する大腸SM癌2例のホルマリン固定材料(Formalin fixed paraffin embedded; FFPE)からlaser microdissectionにて原発巣とリンパ節転移巣を分離した。RNeasy FFPE kit (Qiagen)を用いてmiRNAを抽出し、マイクロアレイを用いたmiRNA網羅的発現解析を行った。

(2) 網羅的解析で抽出された浸潤・転移に有意な発現と考えられたmiRNAは、定量的RT-PCRによりその発現レベルを定量した。リンパ節転移を有するSM癌7例とリンパ節転移のないSM癌8例のFFPEから抽出されたmiRNAを対象とした。

(3) 目的とするmiRNAの発現の局在を明らかにするため、SM癌の原発巣とリンパ節転移巣のパラフィン切片を用いて、miRNAのIn situ hybridization(ISH)を行った。ISHの発現レベルは、陰性をスコア0、陽性をスコア0.5、強陽性をスコア1とし、それぞれの成分の割合(%)を乗じたものをスコアとして評価した。

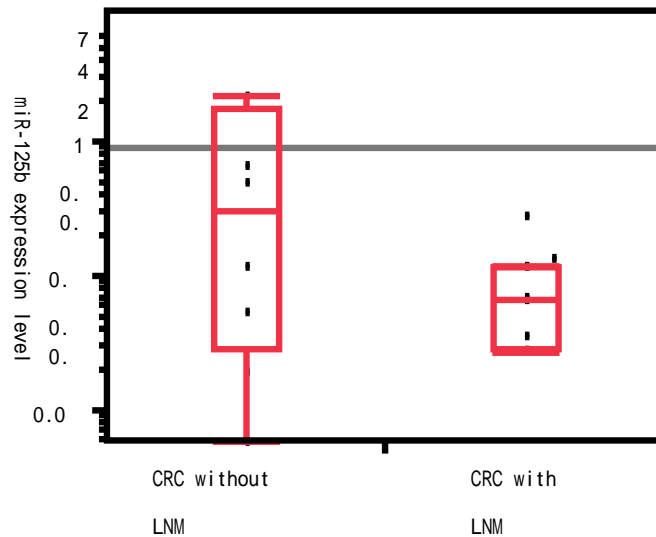
### 4. 研究成果

(1) microRNA網羅的発現解析において、原発巣とリンパ節転移巣の間に共通して2倍以上の変動が見られたものは、高度の発現上昇を示したものはmiR-125bで、発現低下を示したものはmiR-195-3p, miR-6845-3p, miR129-2-3p, miR-1913, miR-4785, miR-1228, miR-595, miR-6507-3pであった(表1)。

Systemic Name	Accession	症例 1		症例 2	
		Change relative to Primary CRC Log2 Ratio	Exp gTotal Gene Signal	Change relative to Primary CRC Log2 Ratio	Exp gTotal Gene Signal
hsa-miR-125b-5p	<a href="#">MIMAT0000423</a>	2.84	30.5	1.41	31.2
hsa-miR-195-3p	<a href="#">MIMAT0004615</a>	-4.09	0.1	-3.29	0.1
hsa-miR-6845-3p	<a href="#">MIMAT0027591</a>	-3.90	0.1	-3.86	0.1
hsa-miR-129-2-3p	<a href="#">MIMAT0004605</a>	-3.75	0.1	-3.87	0.1
hsa-miR-1913	<a href="#">MIMAT0007888</a>	-3.71	0.1	-3.90	0.1
hsa-miR-4785	<a href="#">MIMAT0019949</a>	-5.60	0.1	-3.99	0.1

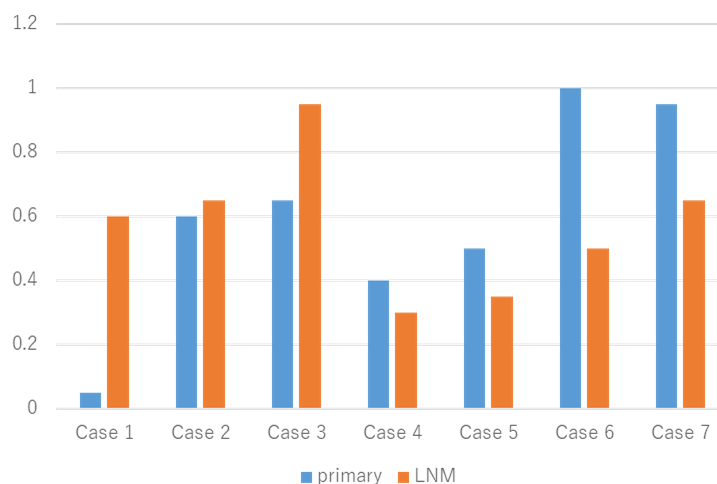
hsa-miR-1228-5p	MIMAT0005582	-4.44	0.1	-4.69	0.1
hsa-miR-595	MIMAT0003263	-5.09	0.1	-4.75	0.1
hsa-miR-6507-3p	MIMAT0025471	-4.81	0.1	-4.87	0.1

(2) miR-125b の発現レベルは、リンパ節転移(Lymph node metastasis; LNM)のないS M癌と比較して、リンパ節転移を有するS M癌では低い発現レベルにある傾向があった(図 1)。しかしながら、統計学的有意差は認められなかった(p=0.035)



(3) ISH 法による原発巣およびリンパ節転移巣の miR-125b の発現レベルは、3 例においてリンパ節転移巣で miR-125b の発現上昇が見られたものの、4 例ではリンパ節転移巣で発現低下が見られた(図 2)。

The average score of miR-125b signals by ISH in seven primary CRC and LNM in those. The average ISH score of LNM elements were higher than those of primary CRC in three cases out of seven cases.



## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1. microRNA expression profile specific to early colorectal cancer with lymph node metastasis

Yoko Tateishi, Koji Okudela, Hideaki Mitsui, Shigeaki Umeda, Yoko Kojima, Mai Matsumura, Takehisa Suzuki, Kazuteru Watanabe, Naomi Kawano, Yoshiaki Inayama, Kenichi Ohashi  
第 107 回日本病理学会総会 2018 年 6 月ロイトン札幌・ニトリ文化ホール・さっぽろ芸文館(北海道札幌市)

2. MicroRNA expression profile correlated with lymph node metastasis in early colorectal cancer

Tateishi Y, Okudela K, Mitsui H, Matsumura M, Suzuki T, Inayama Y, Ohashi K

第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪(大阪府大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~pathola/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：奥寺 康司

ローマ字氏名：Okudela Koji

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10326027

研究分担者氏名：梅田 茂明

ローマ字氏名：Umeda Shigeaki

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 30644439

研究分担者氏名：稲山 嘉明

ローマ字氏名：Inayama Yoshiaki

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：附属市民総合医療センター

職名：教授

研究者番号(8桁): 10184730

研究分担者氏名：大橋 健一

ローマ字氏名：Ohashi Kenichi

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 40231203

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。