

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15107

研究課題名(和文)大腸鋸歯状病変の革新的な癌化予測法の確立：マイクロRNAの網羅的解析

研究課題名(英文) Prediction of carcinogenesis for colonic serrated lesions with micro RNA analysis

研究代表者

高松 学 (TAKAMATSU, Manabu)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・研究員

研究者番号：00750366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸ポリープの一種である無茎性鋸歯状腫瘍(SSA/P)の一部は癌化することが知られているが、どのような症例が癌化するのか、マイクロRNA(miRNA)の網羅的な解析を通じて予測する手法の確立を試みた。組織から採取したゲノムをパネルで解析することにより、癌化したSSA/Pに特徴的に発現するmiRNA-Xと、その標的となるメッセンジャーRNA(mRNA-Y)をそれぞれ1種特定した。miRNA-Xのin situ ハイブリダイゼーションとmRNA-Y由来タンパクの免疫染色により、両者の特徴的なSSA/Pおよび癌組織内分布を可視化することで、癌化を予測しうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SSA/Pは比較的頻度の高い疾患であるが、従来はどのような症例を重点的に観察し予防的にポリープ摘除してゆくかについての方針を決定するために必要なデータが不足していた。本研究により、特にSSA/Pが多発する患者において、将来的に癌化する可能性のある症例を抽出するための効率的な方策が見いだされ、より多くの症例で検証するための礎を築くことができた。特に、miRNAの発現変化という視点から、癌化症例に特徴的な変化を捉えられた意義は大きく、これに関連するmRNA発現変化と併せて癌化する可能性のあるSSA/Pを効率的に選抜し得ることを示したことは、今後の大腸鋸歯状病変の診療において重要な意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Sessile serrated adenoma/ polyp (SSA/P) consists a major subtype of colonic polyp. Despite some SSA/Ps can develop cancer within the tumor, the characteristics of SSA/P with cancer has not been fully elucidated. We aimed to develop a model for predicting carcinogenesis of SSA/P by analyzing micro RNA (miRNA) and messenger RNA (mRNA) expression panel. We found several candidates of miRNAs for distinguish SSA/P with cancer and without cancer, and identified one miRNA (miRNA-X) that was expressed in SSA/P with cancer, and its target mRNA (mRNA-Y) as a potential marker of SSA/P carcinogenesis. miRNA in situ hybridization revealed characteristic distribution of miRNA-X within SSA/P and cancer. Immunohistochemistry for mRNA-Y derived protein revealed distinct pattern for SSA/P with or without cancer. We concluded that these findings are useful to predict carcinogenesis of SSA/P.

研究分野：人体病理学

キーワード：大腸 SSA/P 癌化予測 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

大腸鋸歯状病変は前癌病変として重要である。単発の鋸歯状病変は早期に切除することで癌化を回避しうるが、多発鋸歯状病変(鋸歯状ポリープ症候群)の場合、全ての病変を取り切れず、癌化・進行・転移する症例が少なからず存在し、臨床的に問題となっている。大腸鋸歯状病変は過形成性ポリープ、広基性鋸歯状腺腫/ポリープ(SSA/P)、鋸歯状腺腫(TSA)に大別され、このうちSSA/Pは約3~4%の確率で癌化するとされる(文献1)。SSA/Pは*BRAF*遺伝子変異が背景にあることが多いことは広く知られているが、それらの病変の中でどのような病変が癌化するかという点に関しては十分に解明されていない。本研究に先立つ事前検討で、*MLH1*遺伝子のメチル化といった既知の癌化経路とは異なる免疫組織学的特徴を示す症例が多く存在することが示された。すなわち、*BRAF*遺伝子変異のみならず、特定の遺伝子発現ならびにマイクロRNA(miRNA)などのエピゲノムの変化が関与している可能性がある。

この研究では、大腸鋸歯状病変の中で、SSA/Pに的を絞り、その併存癌を含めて、病変から抽出したマイクロRNA(miRNA)と癌関連遺伝子の発現(mRNA)を統合解析することにより、発癌と関連の深いmiRNAとその標的となるmRNAについて、発癌リスクの高い鋸歯状病変の遺伝子学的特徴を特定することを試みた。

2. 研究の目的

本研究では、大腸鋸歯状病変の癌化に関連する因子を、miRNAの発現変化という視点から網羅的に解析し、癌化を促進あるいは抑制するmiRNAを特定し、癌化する可能性の高い鋸歯状病変罹患者を癌化前に選抜することを目的とした。鋸歯状病変の癌化に関してmiRNAと癌関連遺伝子発現を統合的に解析した報告は未だ無く、癌化に特徴的なmiRNA発現パターンを特定、癌化経路を詳細に解明することで、発癌前の段階から治療方針を決定できる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、ホルマリン固定パラフィン包埋標本(FFPE)からマイクロダイセクションにより組織を回収し、RNAを抽出したのち、核酸デジタルカウントによりmiRNAおよびmRNAの発現変化をパネル解析し、発癌に関連性の深いmiRNAおよびmRNAを特定した。

具体的には、下記の方法で実施した。

(A) 大腸鋸歯状病変と鋸歯状病変併存癌のFFPE(14症例、計24サンプル)から、顕微鏡下マイクロダイセクションにより癌部(以下、Ca)、癌化症例のSSA/P部(以下、SSA/Pc)、非癌化SSA/P(以下、SSA/Pn)、背景粘膜(以下、N)から組織を回収し、miRNAとmRNAを抽出した。

(B) 核酸デジタルカウントにより、(A)のサンプルのmiRNAとmRNAの発現を定量した。

(C) 癌化SSA/Pと非癌化SSA/P、またSSA/Pと癌部とを比較し、それぞれに特徴的なmiRNAを特定した。

(D) SSA/Pの癌化を予測する候補miRNAについて、in situ ハイブリダイゼーションを用いてmiRNA発現を可視化し、標的となるmRNAを免疫染色で可視化した。

4. 研究成果

(A) miRNAのパネルによる定量

当初の予定では、2010年から2017年にかけての14症例から各部位のサンプル(Ca(n=7)、SSA/Pc(n=7)、SSA/Pn(n=7)、N(n=3)、計n=24)を解析する予定であったため、それらの症例から顕微鏡下マイクロダイセクションによる組織の回収を行い、RNAの断片化度合の測定(quality check)を実施した。その結果、2016年以前の検体については300nt以上のRNA断片の含有率が6~38%と低く、特にmRNAの発現解析に支障をきたすと考えられたため、さらに2017年~2019年の症例を追加し、ほとんどの症例で300nt以上のRNAの割合が30%以上となるようにサンプルを選抜した。nCounter(nanostring社)のmiRNAハイブリダイゼーションパネルにより、これらのサンプルにおけるmiRNA770種の定量を行い、各群での発現差($p < 0.01$ 、以下log2 fold changeで表記)の検定を行った。NとCaとの群間で、5.0以上の発現差がみられたものが14個存在した。同様に、SSA/PcとCaとの群間では2.0以上の有意差で12個、SSA/PcとSSA/Pnとの間では、同7個みられた。全サンプルにおける770種のmiRNAの発現変化を階層クラスタリングした結果を図1に示す。

(B) mRNAのパネルによる定量

4. (A)と同様の症例群について、24サンプルに対するmRNAハイブリダイゼーションパネル(PanCancer panel、770遺伝子)により、遺伝子発現の定量を行った。結果として、NとCaとの群間で、2.0以上の発現差がみられたものが8個存在した。同様に、SSA/PcとCaとの群間では3個、SSA/PnとCaとの群間では7個みられ、後2者に共通するmRNAは1個存在した。また、

N と SSA/Pc との間では同 6 個みられた。一方で、SSA/Pc と SSA/Pn との間では、2.0 以上の有意差を示す mRNA はなく、発現の差は最高で 1.3 ($p < 0.001$) であった。

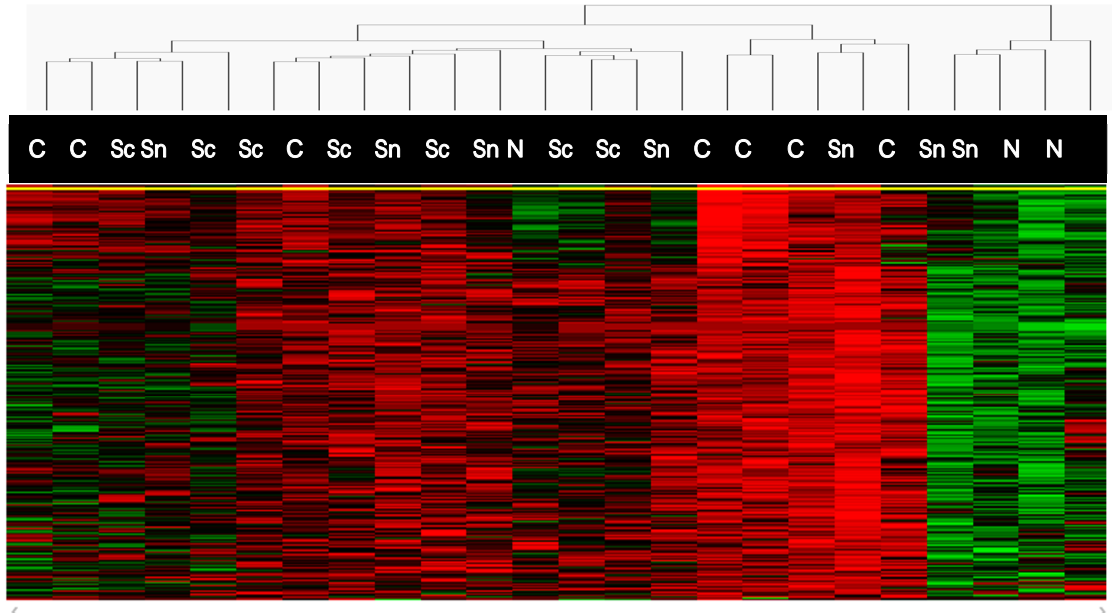


図 1 nCounter パネルによる miRNA 発現の階層クラスタリング結果。C:癌部、Sc:癌化症例の SSA/P 部、Sn:非癌化 SSA/P、N:背景粘膜

(C) miRNA の標的となる mRNA の特定

miRNA の塩基配列から標的となる mRNA を検索するデータベース(文献 2)によって、各群で発現変化のみられる miRNA と mRNA の関連性を調べた。その結果、SSA/Pn と SSA/Pc との群間で発現差のみられた miRNA-X の標的となる mRNA-Y をそれぞれ 1 種特定した。

(D) miRNA-X の可視化による組織内分布の解明

SSA/P における miRNA-X の役割を調べるため、miRNA in situ ハイブリダイゼーション法による組織内での miRNA-X の局在を調べた。miRNA-X は正常粘膜では殆ど発現がみられなかったが、SSA/Pn では表層に、SSA/Pc では陰窩底部にそれぞれ高発現し、癌部では低発現することが確認された(図 2)。

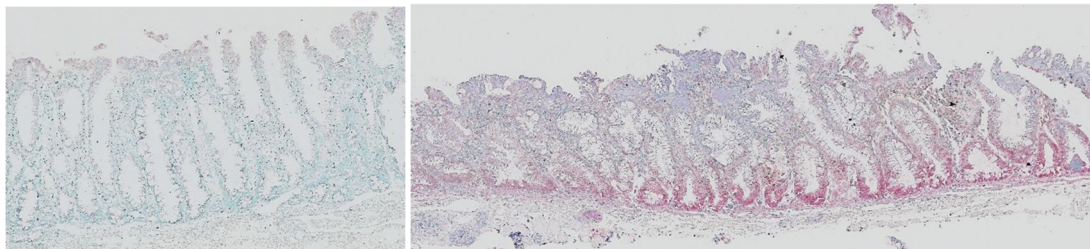


図 2 miRNA in situ ハイブリダイゼーションによる局在の可視化。左が SSA/Pn、右が SSA/Pc の代表症例。

(E) 免疫染色による標的 mRNA-Y の組織内分布の解明

SSA/P における mRNA の役割を調べるため、免疫染色による mRNA-Y 由来タンパク質の組織内における局在を調べた。mRNA-Y に由来するタンパク質(Yp)は、免疫染色によって正常粘膜では増殖帯に陽性となり、SSA/Pn では表層に、SSA/Pc と癌部では全層性に陽性でかつ癌部の方が発現が強くみられた(図 3)。この mRNA-Y(遺伝子 Y)は浸潤大腸癌において発現が亢進することが報告されており、癌化あるいは癌の浸潤・進展に関与している可能性が示唆される。

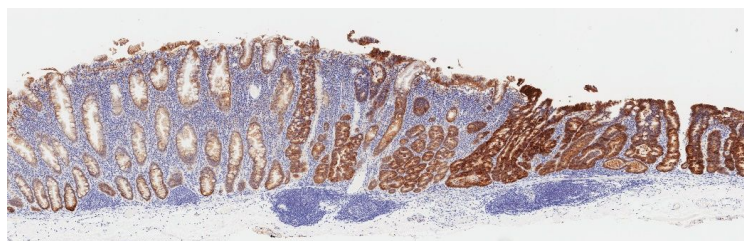


図 3 Yp の免疫染色。癌化部(右)で発現亢進があり、SSA/P 部(左)では全層に陽性となる。

(F) miRNA-X と mRNA-Y による SSA/P 癌化予測法

以上の知見を総合し、miRNA-X と mRNA-Y の可視化による発癌の予測をシミュレーションした。より低コストで実施可能な mRNA-Y 由来タンパクの免疫染色により、上皮全層性に発現亢進のみられる SSA/P をあらかじめ選抜し、それらに対して miRNA-X の in situ ハイブリダイゼーションを実施することで (図 4)、癌化リスクのある SSA/P を選別することがある程度可能と推察される。この手法により、特に SSA/P の多発する症例において、癌化する前の段階でそのリスクを定量化できる可能性が示された。今後は、検証用の症例を用いてこのシミュレーションが妥当かどうかを検証し、実際の臨床現場に応用可能かを検討する。

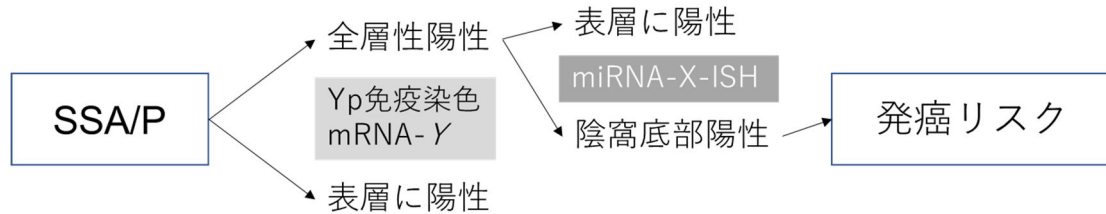


図 4 SSA/P 癌化予測のシエーマ。

引用文献：

- 文献 1. 第 84 回大腸癌研究会 鋸歯状病変に関するアンケート調査結果より抜粋。
文献 2. <http://mirdb.org/>より検索。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------