

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16781

研究課題名(和文) 月経血エクソソーム由来microRNA検出による新しい子宮内膜がん検診法の開発

研究課題名(英文) Development of a new screening method for endometrial cancer by detecting microRNAs derived from menstrual blood

研究代表者

西島 良美(Nishiima, Yoshimi)

群馬大学・大学院保健学研究科・講師

研究者番号：10710733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、子宮内膜の発癌初期段階において重要なPTEN遺伝子を抑制する可能性が報告されているマイクロRNAに着目し、子宮内膜病変の早期診断に寄与するバイオマーカーとしての応用可能性について検討を行った。研究開始当初は月経血を利用した検出法の確立を目指したが、所属機関の異動や臨床検体の確保が困難となったことから、補助事業期間中の研究実施計画に則り、ホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いる方法について解析を進めた。子宮内膜癌においてmiR-205発現とPTEN蛋白発現の消失に相関が認められ、miR-205がPTEN発現の制御および子宮内膜発癌初期段階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

本研究結果により、PTEN 遺伝子を抑制する可能性が報告されているマイクロRNAのうちmiR-205が、正常子宮内膜では非常に低発現でありかつ類内膜癌では高発現していることが明らかとなった。さらにPTEN蛋白発現の陰性率との相関が唯一認められた。これにより、miR-205は子宮内膜癌の進展ではなく、子宮内膜の発癌初期段階において関与する可能性が考えられ、miR-205発現解析が子宮内膜病変の早期診断におけるバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the applicability of microRNA expression contributing to the early diagnosis of endometrial lesions as a biomarker. MicroRNA has been reported to be the potential of suppressing PTEN gene, which is important in the early stage of endometrial carcinogenesis. At the beginning of the study, we aimed to establish a method for evaluating miRNAs in endometrial lesions using menstrual blood, but due to institutional transfer and the resulting difficulty in collecting menstrual blood samples during the granted period, the material was changed to formalin-fixed, paraffin-embedded endometrial tissues. In endometrial cancer, miR-205 was found to correlate with the loss of PTEN protein expression, suggesting that miR-205 is involved in the regulation of PTEN expression and the early stages of endometrial carcinogenesis.

研究分野：病理細胞診

キーワード：子宮内膜病変 PTEN マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

多様性を増す女性のライフスタイルは、同時に未経産者の増加、経産回数減少、高齢出産の増加などを生み出し、エストロゲンの暴露期間が長期化することで子宮内膜疾患に罹患する若年女性の増加に繋がっている。2010年以降、子宮内膜癌の罹患率が子宮頸癌を超え死亡率も増加傾向にあり(国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」、40歳以下の若年患者に散発性の子宮内膜癌の罹患率および死亡率が急増しているため、がん検診や婦人科受診での子宮内膜病変の早期発見・早期診断の重要性が増している。しかし婦人科受診に対しては羞恥心などの抵抗感があることが明らかとなり(吉田ら、臨床検査, 2011)、女性個人のライフスタイルにあった新しい検診補助システムの構築が急務である。

一方、様々な腫瘍の新規バイオマーカーとしてマイクロRNA(miRNA)が注目を浴びている。miRNAは蛋白質をコードしない約22塩基の長さを持つ短鎖RNAで、ターゲットとなるmRNAと結合し相互作用することが知られている。細胞の発生、分化や細胞死の誘導などに関わり、その発現異常が様々な癌の発症や進展過程にも重要な役割を担うことが明らかとなってきており、新たなバイオマーカー候補として現在多くの研究が進められている。子宮内膜病変に関しても多数の研究が行われており、多くのmiRNAが腫瘍の悪性化などに関与していると考えられるが(Srivastava SK., et al., Cancer Lett. 2017)、発がん初期段階を推定可能なバイオマーカーとしての応用には至っていない。しかし近年、子宮内膜の発がん初期過程に深く関与するPTEN遺伝子がmiRNAにより発現抑制されている可能性について示唆する報告が認められ(Yoneyama K. et al., Anticancer Res 2015)、発がん初期過程においてもmiRNAが関与する可能性がでてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍の新規バイオマーカーとして注目されているmiRNAに着目し、子宮内膜疾患に起因するmiRNAを安定して検出することを可能にし、近年増加傾向にある子宮内膜癌の早期発見・早期診断に有効なバイオマーカーとしての応用可能性を検証して新たな検診補助システム構築へ繋げることである。研究開始当初は月経血を利用して子宮内膜病変由来のmiRNA検出法の確立を目指したが、所属機関の異動や臨床検体の確保が困難となったことから、補助事業期間中の研究実施計画としてあげていたホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いる方法について解析を進めた。PTEN遺伝子を抑制する可能性が報告されているmiR-200a、miR-200b、miR-205、miR-182およびmiR-183に着目し、子宮内膜病変の進展におけるPTEN蛋白発現とmiRNAの発現について比較検討し関連性について解析することで、miRNAの子宮内膜発がん初期段階の早期発見・早期診断に対するバイオマーカーとしての応用可能性および有用性について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 症例の抽出

2004年から2018年に単純子宮全摘出され、群馬大学医学部附属病院病理部に保管されている45例のホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いた。類内膜癌症例は、典型的な類内膜癌の形態を呈し、明確な浸潤所見を認めかつ増殖症の併存を認めない箇所を選出した。症例の内訳は正常子宮内膜組織(23例、年齢分布37-48歳、平均年齢41歳)、類内膜癌(Grade1、22例、年齢分布27-80歳、平均年齢58歳)である。

(2) PTEN 蛋白発現の解析

4- μm の切片を作製し脱パラフィン後、0.3%過酸化水素加メタノールによりペルオキシダーゼ不可処理を室温30分間反応させ、水洗後に蒸留水で200倍希釈したイムノセイバー内に切片を入れポットにて98に沸騰させて40分間反応させた。反応後30分間静置し洗浄、2%正常ヤギ血清で室温10分間反応後、Mouse Monoclonal Anti-Human PTEN (1:100 dilution, clone 6H2.1; Dako)で室温60分間反応させた。PBSで5分 \times 3回洗浄後、ヒストファイン・シンプルステイン MAX-PO (M) (cat. No. 424132; Nichirei Biosciences)で室温30分間反応させ、PBS洗浄後に0.003%過酸化水素加0.2mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in 50mM Tris-HCl, pH7.6で10分間反応させた。洗浄後Newヘマトキシリン Type Mで35秒反応させ、脱水・透徹・封入を行った。染色評価は1名の病理医により行われ、同一条件下で標本全体を観察し、腺管および間質それぞれの最も強い陽性所見を-、 \pm 、1+、2+、3+で評価し、0から4点としてスコア化して平均値を算出した(図1, 2)。さらに同一症例について再薄切・再染色を行い、バーチャルスライドスキャナ(Nano Zoomer-SQ, C13140-01, 浜松ホトニクス(株))により標本全体の画像を取りこみ、Pannoramic Viewer内のQuant Center HistoQuantモジュールver.1.15.4 (3DHISTECK Ltd.)を使用してPTEN蛋白発現の陽性および陰性染色強度レベルをそれぞれ設定し(図3)、PTEN蛋白発現の半定量解析を行ってマイクロRNA発現との関連性を検討した。

(3) miRNA 解析

選定したパラフィンブロックより薄切切片10 μm 、1枚を作製し、内膜組織部分のパラフィン切片のみを回収してmiRNeasy FFPE Kit (QIAGEN)によりTotal RNAの抽出・精製を行った。Total RNA濃度の量・質を確認した後、TaqMan[®] MicroRNA Assays kit(Thermo Fisher Scientific)およびStepOnePlus Real Time PCR systemによりリアルタイムPCR解析を行った。

4. 研究成果

(1) PTEN 蛋白発現と子宮内膜組織との関連性

① 腺管スコアの比較

正常子宮内膜の腺管はスコア0からスコア4の順に78.2%、17.4%、4.3%、0%、0%で平均スコア0.260となり、類内膜癌の腺管は順に50%、18.2%、22%、4.5%、4.5%で、平均スコア0.954

となり、正常子宮内膜と比較し類内膜癌が有意に高値を示した(図 2(a), $P = 0.0251$)。

② 間質スコアの比較

正常子宮内膜の間質はスコア 0 からスコア 4 の順に 4.34%、0%、65%、30%、0%で平均スコア 2.21、類内膜癌の間質は順に 22%、0%、59%、18%、0%で平均スコア 1.72 となり、群間での有意差は認めなかった(図 2(b), $P = 0.1051$)。

③ 腺管と間質の平均スコアの比較

正常子宮内膜、類内膜癌それぞれの腺管および間質における平均スコアの比較を示す。いずれも間質スコアが有意に高値を示した (図 2(c) NE: $P < .0001$, (d) EC: $P = 0.012$)。

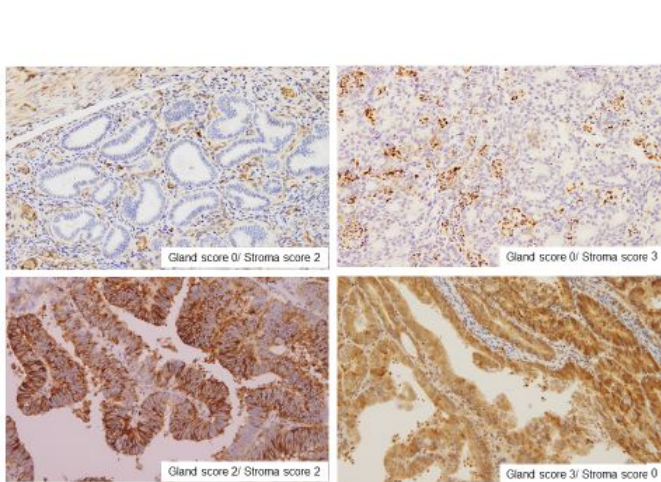


図1 PTEN蛋白発現の免疫組織化学染色結果(代表例)。

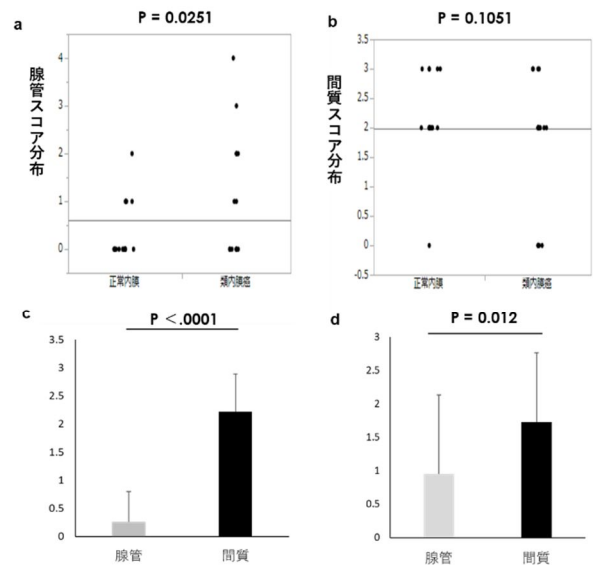


図2 (a) 腺管スコアの比較。(b) 間質スコアの比較 (c) 正常内膜における腺管と間質の平均スコアの比較 (d) 類内膜癌における腺管と間質の平均スコアの比較

④PTEN 蛋白発現の半定量解析結果

PTEN 蛋白発現の標本全体と腺管および間質それぞれの陽性率と陰性率を、方法に則り図 3 のように変換処理をして算出した。PTEN 標本全領域の陽性率および陰性率、腺管領域の陽性率、陰性率および間質領域での陽性率、陰性率の平均はそれぞれ正常内膜で 9.23%、5.53%、9.79%、9.41%、8.88%、3.97%となり、類内膜癌では 5.18%、14.72%、7.45%、23.06%、1.77%、

4.09%となった。2 群間の比較の結果、全領域の陰性率、腺管陰性率、間質陽性率において、類内膜癌で有意に低値を示した($P = 0.0019$ 、 $P = 0.0039$ 、 $P = 0.0001$)。

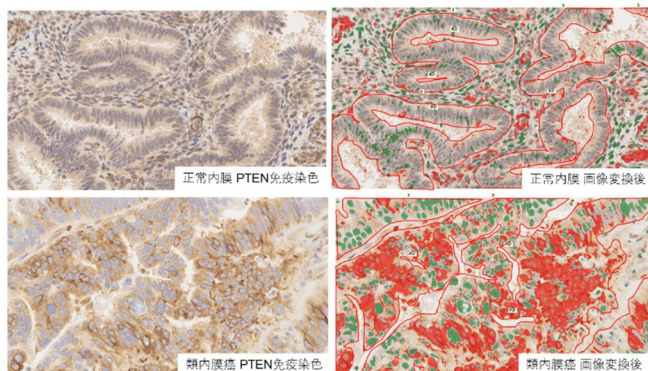


図3. PTEN免疫染色標本を画像解析により変換した。

(2) miRNA と子宮内膜組織との関連性

miRNA の発現を、内因性コントロールである U6 の Ct 平均値で補正した Ct 平均値を用いて解析を行った。それぞれの miRNA の正常内膜および類内膜癌での Ct 平均値は miR-182 (10.19、6.30)、miR-183(10.69、6.80)、miR-200a(4.70、1.29)、miR-200b(4.41、1.34)、miR-205(10.0、3.38)となり、いずれの miRNA 発現においても正常子宮内膜に比べて類内膜癌で有意に高発現を示した(いずれも $P < 0.0001$)。特に miR-182、183、205 では、正常子宮内膜では非常に低発現でかつ類内膜癌では高発現であったことから、腫瘍の進展ではなく発癌初期段階に関与することが示唆された。

(3) PTEN 発現と miRNA 発現の関連性

各々の miRNA と PTEN 発現の全体陽性率、全体陰性率、腺管陽性率、腺管陰性率、間質陽性率、間質陰性率との相関関係を解析したところ、miR-205 のみに PTEN 全体陰性率および腺管陰性率と相関を認めた(図 4)。これにより、miR-205 が発癌初期段階において PTEN 蛋白発現を制御する可能性が示唆された。

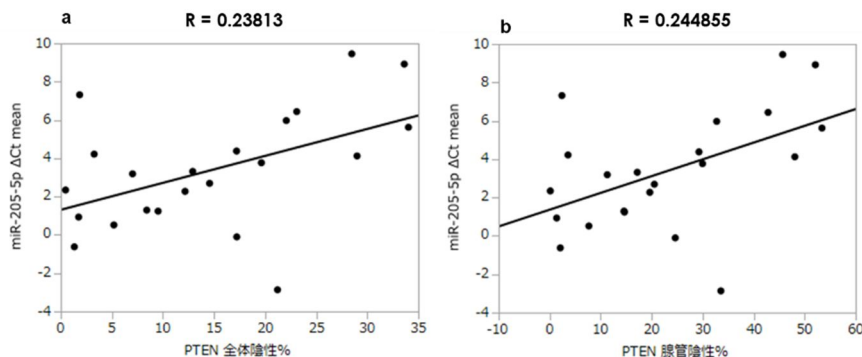


図4. PTEN腺管陽性率とmiR-205発現の関連性を示す。(a)PTEN全体陰性率と(b)PTEN腺管陰性率ともに弱い相関関係を認めた。

今回の PTEN 蛋白発現の検討では正常子宮内膜、類内膜癌いずれも腺よりも間質の発現量が多く、正常子宮内膜では染まらない場合と弱く染まる場合があった。また半定量解析結果では類内膜癌で全体陰性率・腺管陰性率が有意に低くなり、この結果はいずれも先行研究と合致していた。がん抑制遺伝子の一つである PTEN 蛋白発現は、正常子宮内膜では概ね弱く発現が保たれているが、癌化に伴い部分的に強発現や消失が認められることから、がん組織内においては不均質な PTEN 遺伝子変異が生じている可能性が示唆された。さらに PTEN 蛋白発現を制御するとの報告が認められた miRNA 発現との関連性については、miR-205 において正常子宮内膜組織での発現と子宮内膜癌組織内での発現に大きな差が認められかつ PTEN 蛋白発現との相関を認めた。以上の結果により、本研究において、miR-205 が PTEN 蛋白発現を制御することで子宮内膜癌の進展ではなく、特に子宮内膜の発癌初期段階へ関与することが示唆され、早期診断におけるバイオマーカーとして有用である可能性が考えられた。

現在、症例を追加して解析を継続しており、その成果をまとめて論文投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西島 良美、福田 利夫、萩原 治夫
2. 発表標題 若年子宮内膜癌における酸化ストレス関連因子発現動態の免疫組織学的解析
3. 学会等名 第59回日本臨床細胞学会総会（春期大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshimi Nishijima, Sayaka Kobayashi, Masanao Saio
2. 発表標題 Evaluation of PTEN protein expression in normal endometrium and endometrioid carcinoma surgical specimens.
3. 学会等名 32nd Congress of the ESP and XXXIII International Congress of the IAP（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------