

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 22 日現在

機関番号：82710

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21590394

研究課題名（和文）鋸歯状ポリープ発癌過程における micro RNA のエピジェネティクス制御

研究課題名（英文）Epigenetic modification of micro RNA expression in serrated polyp-carcinoma pathway

研究代表者

三富 弘之 (MITOMI HIROYUKI)

独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）

政策医療企画部・研究員

研究者番号：90181940

研究成果の概要（和文）：マイクロサテライト不安定性大腸発癌経路における前癌病変である鋸歯状ポリープ（広基性鋸歯状ポリープ及び古典的鋸歯状腺腫）とそれと鑑別が難しく、癌化リスクのない過形成性ポリープでは、マイクロ RNA20, 21, 93 181b の発現プロファイルの差異があり、それらの鑑別に有用である。予想に反して、鋸歯状ポリープのマイクロ RNA 発現と遺伝子メチル化との相反関係がみられた。鋸歯状ポリープの発生や癌化抑制にマイクロ RNA をターゲットにした創薬の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Serrated polyp including sessile and traditional serrated polyp/adenoma is a precursor to a subset of microsatellite-unstable colorectal carcinoma. In contrast, hyperplastic polyp is considered to have very low risk of progression to carcinoma. Histological discrimination is sometimes difficult and problematic between two polyps because of both having architectural similarities. We found a differential expression of microRNA 20, 21, 93 and 181b in serrated and hyperplastic polyps. We have further shown that loss of mismatch repair protein hMLH1 expression, probably as a result of gene methylation, is inversely correlated with microRNA 21 and 93 in serrated polyp. Our results point toward a potential target therapy of these microRNA in serrated polyp development or progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：マイクロ RNA、鋸歯状ポリープ、大腸腫瘍、遺伝子メチル化、DNA ミスマッチ修復遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸癌発癌過程は chromosomal instability (CSI) と microsatellite instability (MSI) 経路の 2 つに分けられ、CSI 経路には conventional adenoma-carcinoma pathway があり、APC, Kras, p53, DCC 遺伝子の欠失や変異の蓄積がその

発育進展に関与する。一方、MSI 経路には serrated pathway と呼称される新たな発癌経路があり、前癌病変として sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) を候補とする sessile serrated pathway と traditional serrated adenoma (TSA) を候補とする traditional serrated pathway

に細分されるが、いずれも hMLH1, MGMT などの DNA ミスマッチ修復遺伝子のメチル化が関与している。

(2) SSA/P は癌化リスクのほとんどない hyperplastic polyp (HP) との組織学的鑑別が難しいという問題点が指摘されている。

(3) microRNA (miR) は転写後レベルで標的遺伝子の発現を抑制するが、sessile/traditional serrated pathway で好発する遺伝子メチル化により miR 発現も抑制 (epigenetic modification) されている可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) SSA/P, TSA 及びそれらと組織学的鑑別の難しい HP との間での miR 発現の差を検討する。

(2) SSA/P, TSA における hMLH1 ミスマッチ修復遺伝子のメチル化による蛋白発現の低下と miR 発現との関連性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 対象は SSA/P 27 例 (平均年齢 66 歳、男女比 12:15、大きさ平均 11.2mm、部位 近位:遠位大腸 23:4)、TSA 28 例 (平均年齢 58 歳、男女比 12:16、大きさ平均 13.6mm、部位 近位:遠位大腸 9:19)、HP 24 例 (平均年齢 57 歳、男女比 21:3、大きさ平均 5.4mm、部位 近位:遠位大腸 0:24) である。

(2) 対象例のホルマリン固定パラフィン包埋切片から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法により miR20, 21, 93, 181b の発現 (正常大腸粘膜に対する相対値) を比較解析した。

(3) DNA ミスマッチ修復遺伝子蛋白発現については、hMLH1 抗体 (G168-15, Oncogene Research Products, 1:50) を用いて免疫染色を行い、発現低下の有無を検討した。

## 4. 研究成果

(1) SSA/P は TSA, HP に比べ miR21, 181b の発現が有意に高く、miR20 の発現は低かった。SSA/P は HP に比べ miR93 の発現が有意に高く、TSA に比べ低かった (図 1)。この成果から、組織学的に HP との鑑別が難しい SSP/P や TSA をこれらの miR 発現プロファイルにより鑑別できることが示された。さらに、将来的には SSA/P や TSA の発生やその癌化抑制にこれらの miR をターゲットにした agomiR や antagomiR 創薬の臨床応用が期待される。

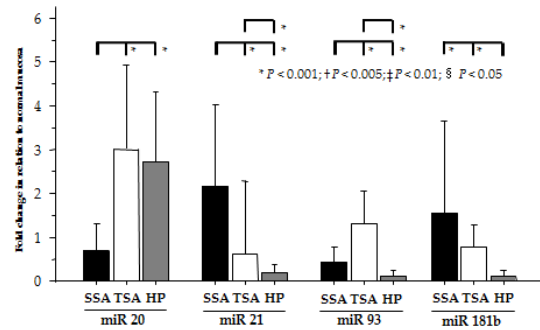


図1 各ポリープのmiR発現の差異

(2) hMLH1 遺伝子メチル化に伴って起こる蛋白発現低下は、SSA/P 27 例中 23 例 (85%)、TSA 28 例中 7 例 (25%) にみられた。SSA/P では、hMLH1 蛋白発現低下例は正常発現例に比べ、miR93 の発現が有意に高く、TSA では hMLH1 蛋白発現低下例は正常発現例に比べ、miR21 の発現が有意に高かったが (図 2)、その他の miR20, 181b には差は認められなかった。この成果からは当初の予想に反して、SSP/P や TSA における遺伝子メチル化による miR 発現の低下は証明出来なかったが、一方で 5 - aza - 2' deoxycytidine (azacytidine) などの脱メチル化剤の臨床応用により、miR21, 93 の発現を抑制することで、SSA/P や TSA の発生やその癌化抑制できる可能性が新たに示された。

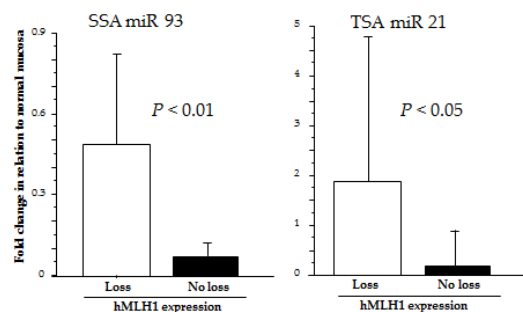


図2 SSA, TSAのhMLH1発現低下とmiR発現との関連

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- Imamhasan A, Mitomi H, Saito T, Hayashi T, Takahashi M, Kajiyama Y, Yao T. Immunohistochemical and oncogenetic analyses of the esophageal basaloid squamous cell carcinoma in comparison with conventional squamous cell carcinomas. Hum Pathol. 2012 May 18. [Epub ahead of print]
- Imamhasan A, Mitomi H, Saito T, Arakawa A, Yao T. Clear cell variant of squamous cell carcinoma originating in the esophagus:

- report of a case with immunohistochemical and oncogenetic analyses. *Pathol Int.* 2012 Feb;62(2):137-43.
3. Nakai K, Mitomi H, Alkam Y, Arakawa A, Yao T, Tokuda E, Saito M, Kasumi F. Predictive value of MGMT, hMLH1, hMSH2 and BRCA1 protein expression for pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in basal-like breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012 Apr;69(4):923-30.
  4. Mitomi H, Fukui N, Kishimoto I, Tanabe S, Kikuchi S, Saito T, Hayashi T, Yao T. Role for p16(INK4a) in progression of gastrointestinal stromal tumors of the stomach: alteration of p16(INK4a) network members. *Hum Pathol.* 2011 Oct;42(10):1505-13.
  5. Matsuoka T, Mitomi H, Fukui N, Kanazawa H, Saito T, Hayashi T, Yao T. Cluster analysis of claudin-1 and -4, E-cadherin, and  $\beta$ -catenin expression in colorectal cancers. *J Surg Oncol.* 2011 Jun 1;103(7):674-86.
  6. Fukui N, Ikeda Y, Tanaka N, Wake M, Yamaguchi T, Mitomi H, Ishida S, Furukawa H, Hamada Y, Miyamoto Y, Sawabe M, Tashiro T, Katsuragawa Y, Tohma S.  $\alpha\beta 5$  integrin promotes dedifferentiation of monolayer-cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2011 Jul;63(7):1938-49.
  7. 三富弘之, 五十嵐誠治, 伴慎一, 九嶋亮治, 藤田恒平, 平橋美奈子, 大城由美, 林大久生, 八尾隆史. 癌併存大腸広基性鋸歯状腺腫/ポリープの臨床病理学的特徴. *胃と腸* 2011;46:384-93.
  8. 三富弘之, 林大久生, Alkam Yimit, 八尾隆史: 大腸癌—最近の研究動向— III. 大腸癌の分子生物学と発癌機序 発癌機序 大腸鋸歯状病変の癌化. *日本臨床* 69: 115-120, 2011.
  9. 八尾隆史, 菅井有, 岩下明德, 藤盛孝博, 九嶋亮治, 野首光弘, 三富弘之, 味岡洋一, 小西文雄. 大腸 SSA/P の病理組織学的特徴と診断基準. *大腸癌研究会プロジェクト研究から*. *胃と腸* 2011;46:442-8.
  10. Mitomi H, Fukui N, Tanaka N, Kanazawa H, Saito T, Matsuoka T, Yao T. Aberrant p16(INK4a) methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010 Feb;136(2):323-31.
  11. Katsuragawa Y, Saitoh K, Tanaka N, Wake M, Ikeda Y, Furukawa H, Tohma S, Sawabe M, Ishiyama M, Yagishita S, Suzuki R, Mitomi H, Fukui N. Changes of human menisci in osteoarthritic knee joints.

Osteoarthritis Cartilage. 2010 Sep;18(9):1133-43.

[学会発表] (計 6 件)

1. Imamhasan Abdukadir, 三富弘之, 齋藤剛、林大久夫、荒川敦、内田士郎、福村由紀、三谷恵子、八尾隆史: Immunohistochemical and oncogenetic analyses of the esophageal basaloid squamous cell carcinoma in comparison with conventional squamous cell carcinomas. 第 101 回日本病理学会総会, 2012.4.27, 東京.
2. 内田士郎, 三富弘之, 齋藤剛, Abdukadir Imamhasan, 増田芳雄, 和田了, 八尾隆史: 食道上皮内腫瘍におけるポリコム蛋白 EZH2, Bmi-1 発現の検討. 第 101 回日本病理学会総会, 2012.4.26, 東京.
3. アリカムイミティ, 三富弘之, 中井克也, 齋藤光江, 霞富士雄: Basal-like 乳癌(BL C)における EGER, cytokeratin (CK) 5/6/14/17, c-kit 発現と clinical outcome. 第 19 回 日本乳癌学会総会, 2011. 9.2-9.4, 仙台.
4. 三富弘之, 松岡隆, 齋藤剛, 林大久夫, 八尾隆史: 胃間質細胞腫瘍(GIST)における p16INK4a(p16)/Retinoblastoma (Rb) 経路の破綻とその臨床病理学的意義. 第 99 回日本病理学会総会, 2010, 東京.
5. 松岡隆, 三富弘之, 齋藤剛, 林大久夫, 八尾隆史: Claudin-1, Claudin-4, E-cadherin,  $\beta$ -catenin の発現低下は大腸癌における予後不良因子である. 第 99 回日本病理学会総会, 2010, 東京.
6. 齋藤剛, 三富弘之, 三谷恵子, 八尾隆史: デスモイド腫瘍における  $\beta$ -catenin の遺伝子異常のタイプと標的遺伝子の活性化能および細胞増殖能の比較検討. 第 99 回日本病理学会総会, 2010, 東京.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] 出願状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等 なし

6. 研究組織
  - (1) 研究代表者
 

三富 弘之 (MITOMI HIROYUKI)  
独立行政法人国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・政策医療企画部・研究員  
研究者番号: 90181940
  - (2) 研究分担者
 

福井 尚志 (FUKUI NAOSHI)

独立行政法人国立病院機構相模原病院・  
臨床研究センター・政策医療企画部・研  
究員  
研究者番号：10251258

金澤 秀紀 (KANAZAWA HIDEKI)  
独立行政法人国立病院機構相模原病院・  
臨床研究センター・統括診療部・医長  
研究者番号：90265661