

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590307

研究課題名（和文）小型肺腺癌浸潤とマイクロ RNA-マイクロダイセクションをとりいれた研究

研究課題名（英文）Invasion-associated microRNA of small lung adenocarcinoma-A detailed study using laser microdissection

研究代表者

後藤 明輝（GOTO AKITERU）

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90317090

研究成果の概要（和文）：マイクロダイセクションや *in situ* hybridization といった新規手法を用いて、肺腺癌の浸潤過程に関与する microRNA を検討し、miR-146a を肺腺癌の浸潤関連マイクロ RNA として同定した。さらに、miR-146a の標的遺伝子として BTG2 を見出した。また、肺腺癌の浸潤部の間質では miR-21 が筋線維芽細胞に過剰発現していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Invasion-associated microRNAs in lung adenocarcinoma were identified by microarray analysis of microRNA. The samples were microdissected from invasive and non-invasive parts of small lung adenocarcinomas. Among 143 microRNAs differentially expressed by more than 2-folds, sequential qRT-PCR study validated five microRNAs (miR-21, miR-107, miR-141, miR-146a, miR-451) as invasion-associated microRNAs, regardless of EGFR gene status. We also identified BTG2 gene as the target of miR-146a. As for the stromal cells in invasive part of lung adenocarcinoma, the combination of immunohistochemistry of smooth-muscle actin and *in situ* hybridization of miR-21 revealed strong expression of miR-21 in myofibroblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：呼吸器・縦隔、浸潤・転移、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロ RNA と肺癌：マイクロ RNA は 20 塩基長ほどの非翻訳単鎖 RNA であり、メッセンジャー RNA に対して抑制的に作用することで生体の発生分化、恒常性維持に必須である。近年、マイクロ RNA 研究は急速に進歩

しており、とりわけ癌とマイクロ RNA のかわりには注目を集め、文献的には肺癌の発生進展にマイクロ RNA が関わるものがほぼ確実である。

(2) 癌浸潤とマイクロ RNA: 臨床材料を用いた *in vivo* の知見は乏しいが、*in vitro* で

mir-21 がマトリックスメタプロテアーゼ制御因子を介して浸潤促進的にはたらくことや、mir-200 family が上皮間葉転換を抑制して浸潤抑制的にはたらくことなどが知られており、マイクロRNAは癌の浸潤に関与すると想定される。

(3) 肺腺癌浸潤の生物学：肺腺癌では、中心部の線維化をともなって非浸潤癌から浸潤癌に至る経路が知られている。非浸潤癌から浸潤癌への移行は、生物学的、臨床的にきわめて重要なプロセスである。癌（上皮）では p53 異常や特定領域の allelic imbalance がこの段階で加わる。一方、肺腺癌間質 fibroblast は MLH1 の発現上昇、Cox1, FGFR-4 や Smad3 の発現低下をみるなど、正常肺間質と遺伝子発現パターンが異なり、浸潤の進行とともに active fibroblast の出現、MMP2 活性の上昇や、myofibroblast 発現パターンの変化が観察される。すなわち、癌上皮のみならず、癌間質も肺腺癌の浸潤に深く関わると考えられる。

2. 研究の目的

小型肺腺癌が非浸潤癌から浸潤癌に移行する過程で変化するマイクロRNAをマイクロダイセクションに基づき、同定する。この結果を In situ hybridization (ISH) で確認するとともに、in vitro のマイクロRNA発現抑制や強制発現実験で生物学的意義を検証する。また、Tissue microarray でのマイクロRNAターゲットの免疫組織化学で、浸潤において意味のあるマイクロRNAターゲットの同定も目指す。

3. 研究の方法

(1) 肺癌臨床検体：2005年～2010年における東京大学医学部附属病院での肺癌手術検体の凍結検体20例及び（凍結検体と一部同一症例を含む）ホルマリン固定後パラフィ

ン包埋（FFPE）検体50例を用いた。凍結検体のうち4例はダイセクションの条件検討に使用し、EGFR遺伝子 wild type (EGFR-wt) 群及びEGFR遺伝子 mutation (EGFR-mt) 群各3例ずつ、合計6例をマイクロアレイに提出及びFFPE検体との対応検討に用いた。

(2) 肺癌 Tissue Microarray: 2005年～2008年における東京大学医学部附属病院での肺癌手術切除検体から各症例の腫瘍部分の1ブロックから2か所を打ち抜き、再構成して作成されたTMAブロックを使用した。TMAは免疫組織化学的検討及びmicroRNAに対する *in situ* hybridization に使用した。

(3) 肺癌細胞株: 10種類の肺癌細胞株、PC3、H1650, H1975（ここまで3つはEGFR遺伝子変異あり）、A459, H23, H522, H1648, H2009, LC2/Ad, LCKJを用いた。また、正常気管支細胞株であるBEAS-2Bを使用した。尚、microRNAの標準化の指標として胃癌細胞株SNU719からのRNA抽出液を用いた。

(4) レーザーマイクロダイセクション、RNA抽出：マイクロダイセクション用のスライド作製は、RNase-freeの環境で行った。凍結検体及びホルマリン固定後パラフィン包埋検体（FFPE）ともに薄切後、RNase除去操作を行った専用のスライド（Leica #11505189）に張り付け、マイクロダイセクションの装置は、LMD7000（Leica）を用いて非浸潤部及び浸潤部の癌細胞を分取した。上記ダイセクションにて回収した検体をRNAqueous-Micro Micro Scale RNA Isolation（凍結検体）または RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE（FFPE）のプロトコルに従いmicroRNAを含むtotal RNAの抽出を行った。

(5) MicroRNA マイクロアレイ：EGFR遺伝子変異の有無に分けて、各3症例の凍結検体の非浸潤部及び浸潤部から癌細胞をダイセクションで分取し、total RNAを抽出した。各々

totalRNAで500ngずつ3症例分を混合し、1つの検体としてEGFR mt/wt×非浸潤部/浸潤部の計4検体をTORAY社、3D-geneにて解析した。

(6) 定量的RT-PCRによるmicroRNAの測定

7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用い、抽出したRNA より各microRNAの発現を定量した。microRNA の逆転写及びQuantitative RT-PCR に使用する試薬、プライマーは TaqManMicroRNA Assays (Applied Biosystems) を用いた。発現量を標準化するための内因性コントロールとして small RNA の一つであるRNU6B を測定した。

(7) microRNAの標的候補の検討

マイクロアレイの結果から選定されたmicroRNA (主にmiR-146a) に対して、Target Scan(http://www.targetscan.org/vert_50/) を使用して、miRNAのターゲット候補を検索した。また、併せて文献検索を行い、各microRNAの標的として調べる遺伝子を決定した。

(8) micro RNAの *in situ* hybridization

肺癌切除検体からのFFPE及びTMAに対して、Exiqon社のmiRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (FFPE) (Cat # 90009) 及び各microRNAに対するmiRCURY LNA Detection probeを用いてmicroRNAの *in situ* hybridizationを行った。

(9) 免疫組織化学的検討

肺癌手術例のFFPEからの薄切標本及びTMAを用いて、BTG2、 α -SMAの免疫組織化学的検討を行った。

(10) 細胞生物学的検討

各細胞株を用い、microRNA mimic (mir-146) 導入実験、Wound healing 実験を行い、それぞれの実験で細胞株よりのRNA抽出、タンパク抽出を施行してmicroRNA, mRNA測定, Westen Blottingを施行した。

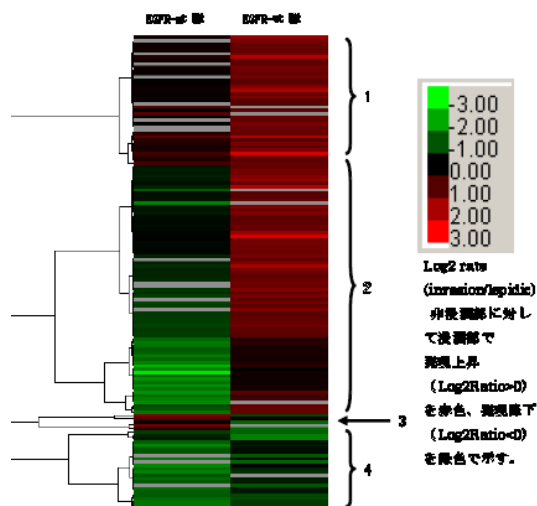
4. 研究成果

(1) 小型肺腺癌浸潤と関連するマイクロ

RNA (マイクロ RNA マイクロアレイによる解析)

EGFR遺伝子変異の有無に分けて、各3症例の凍結検体から非浸潤部及び浸潤部のRNAを抽出し、TORAY社、3D-geneにて解析した。

マイクロアレイ解析の結果、EGFR遺伝子野生型群とEGFR遺伝子変異群各々で非浸潤部と浸潤部に少なくとも2倍以上の差があった143個のmicroRNAが抽出され、そのmicroRNAに対してクラスター解析をおこなった(図1)。クラスター解析の結果、非浸潤部に対する浸潤部の発現の違いから4つのクラスターに分けられた。



No.	EGFR-mt群	EGFR-wt群	microRNAの数
1	up	up	39
2	down	up	76
3	up	down	5
4	down	down	24
計			143

図1 肺腺癌浸潤関連マイクロ RNA クラスター解析の結果

(2) 肺癌臨床検体における microRNA 発現の検討

マイクロ RNA マイクロアレイの検討において、各クラスター内で変動の比較的大きかったもの及び既報での情報を基に、測定する候補となる microRNA 8 個を選び、さらに定量的 RT-PCR で検証を行った。その結果、miR-21, miR-107, miR-141, miR-146a, miR-451 を EGFR 遺伝子変異の有無に関わらない肺腺癌

の浸潤関連マイクロ RNA として同定しえた。

(3) miR-146a と肺腺癌間質浸潤の検討

(2) で同定されたマイクロ RNA のうち、miR-146a につき、Target Scan を利用して 107 個の標的候補を選定した。また、マイクロダイセクションを用いて遺伝子の発現を調べた Borczuk らの論文から肺腺癌で非浸潤部と浸潤部で変化の大きい遺伝子のリスト (319 個) を得た。この 2 つのリストに共通する遺伝子として、BTG2 が認められ、miR-146a の標的候補として検討することとした。

BTG2 に対する免疫組織化学的検討を行ったところ、浸潤部では非浸潤部に比して有意に染色強度が低かった。また、浸潤部の BTG2 免疫組織化学による予後解析では浸潤部 BTG2 陰性の群は陽性群に比べ、無病生存期間が有意に短かった (図 2, $p = 0.0018$)。

miR-146a ISH と BTG2 の IHC の対応関係みると、両者は非浸潤部及び浸潤部のそれぞれで、Spearman の順位相関で負の相関が認められた ($p = 0.0063$, $\rho = -0.204$)。

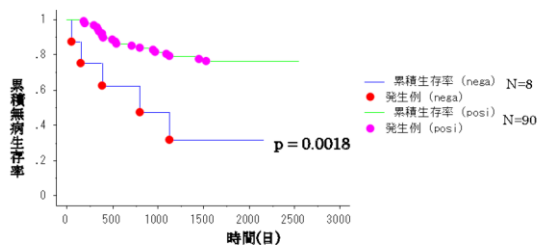


図 2 肺腺癌浸潤部 BTG2 発現と無病生存率

肺癌細胞株 5 種及び正常気管支上皮細胞株 BEAS-2B を用いて miR-146a 及び BTG2 の発現を確認した。miR-146a の発現が比較的高かった A549 及び PC3 では mRNA 及び蛋白レベルのいずれでも BTG2 は低発現であった。逆に miR-146a の発現が低値を示した LCKJ、H522 は mRNA 及び蛋白レベルのいずれでも BTG2 は高発現であった。比較的 BTG2 の発現が高かった 3 つの細胞株 (LCKJ、H522、BEAS-2B) に miR-146a mimic を

導入したところ。細胞形態の変化や、BTG2 mRNA の発現の低下を認めた。また、miR-146a mimic の導入後の移動能を検討するため、LCKJ、H522、BEAS-2B に対して wound healing 実験を行ったところ、いずれの細胞株についても、60h までの変化に有意な差が認められた。

(4) 腫瘍間質での microRNA 発現の検討

miR-21 の LNA プローブを用いて、手術検体及び TMA を用いて *in situ* hybridization を行った。miR-21 は癌細胞 (上皮)、腫瘍間質細胞のいずれにも陽性シグナルが認められたが、各腫瘍によって上皮、間質ともにさまざまな染色パターンが認められた。間質細胞中心に評価を行った。浸潤部と非浸潤部では染色の強さの分布に有意差は認められなかったが、浸潤部の間質細胞に miR-21 が高発現の症例で生存期間が有意に短かった ($p < 0.0021$)。

一方、miR-21 の ISH と HE 像を比較すると、間質の線維芽細胞、特に腫瘍に接して認められる筋線維芽細胞 (active fibroblast) に一致して発現が認められるものと推定された。抗 α -SMA 抗体によって免疫組織化学的検索を行うと、 α -SMA 陽性線維芽細胞 (筋線維芽細胞) に一致して miR-21 の陽性シグナルが確認できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Shoji K, Murayama T, Mimura I, Wada T, Kume H, Goto A, Ohse T, Tanaka T, Inagi R, van der Hoorn FA, Manabe I, Homma Y, Fukayama M, Sakurai T, Hasegawa T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M. Sperm-Associated Antigen 4, a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1 Target, Regulates Cytokinesis, and Its Expression Correlates with the Prognosis of Renal Cell Carcinoma. 査読有, Am J Pathol. 2013. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.02.024.

- ② Morita S, Yoshida A, Goto A, Ota S, Tsuta K, Yokozawa K, Asamura H, Nakajima J, Takai D, Mori M, Oka T, Tamaru J, Itoyama S, Furuta K, Fukayama M, Tsuda H. High-grade Lung Adenocarcinoma With Fetal Lung-like Morphology: Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Analyses of 17 Cases. 査読有, *Am J Surg Pathol.* 37(6):924-932, 2013. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31827e1e83
- ③ Watanabe K, Emoto N, Hamano E, Sunohara M, Kawakami M, Kage H, Kitano K, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. 査読有, *Int J Cancer.* 130:2580-2590, 2012. DOI: 10.1002/ijc.26254.
- ④ Kitagawa H, Watanabe K, Kage H, Inoh S, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Ohishi N, Takai D. Pulmonary Venous Invasion, Determined by Chest Computed Tomographic Scan, as a Potential Early Indicator of Zygomycosis Infection: A Case Series. 査読有, *J Thorac Imaging.* 27: W97-99, 2012. DOI:10.1097/RTI.0b013e3182282d17.
- ⑤ Ota, S., Ishikawa, S., Takazawa, Y., Goto, A., Fujii, T., Ohashi, K., Fukayama, M. Quantitative analysis of viral load per haploid genome revealed the different biological features of merkel cell polyomavirus infection in skin tumor. 査読有, *PLOS ONE.* 7, e39954. 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0039954.
- ⑥ Sohn J, Schetter A, Yfantis H, Ridnour L, Horikawa I., Khan M, Robles A, Hussain S, Goto, A., Bowman E, Hofseth L, Bartkova J, Bartek J, Wogan G, Wink D, Harris CC. Macrophages, nitric oxide and microRNAs are associated with DNA damage response pathway and senescence in inflammatory bowel disease. 査読有, *PLOS ONE,* 7, e44156. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0044156.
- ⑦ Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F, and Murakami Y. Aberrant expression of tumor suppressors, CADM1 and 4.1B, in invasive lesions of primary breast cancer. 査読有, *Breast Cancer,* 19: 242-252, 2012.
- ⑧ Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Goto A, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, and Murakami Y. Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. 査読有, *Int J Cancer,* 130:1329-1337, 2012. DOI: 10.1002/ijc.26160.
- ⑨ Ishimura, M., Sakurai-Yageta, M., Maruyama, T., Ando, T., Fukayama, M., Goto, A., Murakami, Y. Involvement of miR-214 and miR-375 in malignant features of non-small-cell lung cancer by down-regulating CADM1. 査読有, *Journal of Cancer Therapy,* 3, 379-387. 2012. DOI:10.4236/jct.2012.324050
- ⑩ Goto A, Li CP, Ota S, Niki T, Ohtsuki Y, Kitajima S, Yonezawa S, Koriyama C, Akiba S, Uchima H, Lin YM, Yeh KT, Koh JS, Kim CW, Kwon KY, Nga ME, Fukayama M. Human papillomavirus infection in lung and esophageal cancers: analysis of 485 Asian cases. 査読有, *J Med Virol.* 83. 1383-1390. 2011. DOI: 10.1002/jmv.22150.
- ⑪ Kitano K, Watanabe K, Emoto N, Kage H, Hamano E, Nagase T, Sano A, Murakawa T, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer. 査読有, *Cancer Sci.* 102. 2126-2131. 2011. DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02101.x
- ⑫ Morita S, Goto A, Sakatani T, Ota S, Murakawa T, Nakajima J, Maeda E, Fukayama M. Multicystic mesothelioma of the pericardium. 査読有, *Pathology Int.* 61. 319-321. 2011. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2011.02654.x.
- ⑬ Morikawa T, Goto A, Nishimatsu H, Fukayama M: Metastatic Small Intestinal Cancer of the Urinary Bladder. 査読有, *Case Rep Oncol.* 3(3):334-338. 2010.

- ⑭ Voortman J*, Goto A*, Mendiboure J, Sohn JJ, AJ Schetter, Saito M, Dunant A, Pham TC, Petrini I, Lee A, Khan MA, Hainaut P, Pignon JP, Brambilla E, Popper HH, Filipits M, Harris CC, G Giaccone. (*: Equal contribution): MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of nonsmall cell lung carcinoma. 査読有, Cancer Res. 70(21):8288-98. 2010. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-1348.

[学会発表] (計件)

- ① 高橋正人, 増田弘毅, 吉田 誠, 南條 博, 川村公一, 杉山達朗, 後藤明輝, 正常動脈壁における内皮細胞と平滑筋細胞の Mib5(Ki-67)陽性 8 個細胞クラスターの発見. 第 101 回日本病理学会総会, 東京、2012 年 4 月 27 日
- ② 南條 博, 小林実貴夫, 吉成由樹, 廣嶋優子, 高橋正人, 川村公一, 吉田 誠, 後藤明輝, 増田弘毅, Mobilization of endothelial cells and vascular dendritic cells of bone marrow origin in the organ. 第 101 回日本病理学会総会, 東京、2012 年 4 月 27 日
- ③ 増田弘毅, 高橋正人, 吉田 誠, 川村公一, 南條 博, 杉山達朗, 後藤明輝, 血流負荷家兎総頸動脈の内弾性板ギャップの発生機構は増殖平滑筋細胞クラスターによる改築である. 第 101 回日本病理学会総会, 東京、2012 年 4 月 27 日
- ④ 根元 晃, 長谷川 樹, 高橋正人, 廣嶋優子, 吉田 誠, 川村公一, 南條 博, 後藤明輝, 長期生存自然経過単心室症の 一剖検例. 第 101 回日本病理学会総会, 東京、2012 年 4 月 28 日
- ⑤ 後藤明輝, 肺癌の発生・進展とマイクロ RNA, 第 75 回日本病理学会東北支部学術集会、秋田、2012 年 7 月 21 日
- ⑥ 村上 善則, 桜井美佳, 伊東 剛, 桑野秀規, 松原大祐, 後藤明輝, 分子病理学的解析が示す細胞接着分子 CADM1 のヒト肺癌における抑制、促進両面の役割. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、2012 年 9 月 21 日
- ⑦ 伊東 剛, 永田政義、川合剛人, 丸山智子, 桜井-八下田 美佳, 伊藤彰彦, 後藤明輝, 松原大祐, 村上 善則. 遺伝子欠損マウスを用いた CADM1 の肺腫瘍抑制における役割の解明. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、2012 年 9 月 20 日

- ⑧ 桑野秀規, 岩井美和子, 川合剛人, 伊東剛, 桜井 (八下田) 美佳, 後藤明輝, 小泉史明, 中島 淳, 田村研治, 村上 善則, 肺腺がんの EGFR-TK 阻害剤に対する耐制獲得における細胞接着分子 CADM1 の役割. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、2012 年 9 月 21 日
- ⑨ 熊谷友紀, 伊東 剛, 永田政義, 川合剛人, 丸山智子, 桜井 (八下田) 美佳, 後藤明輝, 村上 善則, 肺腺がん細胞株の実験的肺転移における遺伝子発現変動を指標として抽出される転移関連因子の探索. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌、2012 年 9 月 21 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
後藤 明輝 (GOTO AKITERU)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90317090

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：