

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6月17日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590329

研究課題名（和文） 高齢者胃癌の発生過程におけるmicroRNAのエピジェネティック制御

研究課題名（英文） Epigenetic control of microRNA in the development of gastric carcinomas in the elderly

研究代表者 新井富生（ARAI TOMIO）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：20232019

研究成果の概要（和文）：

胃癌は加齢とともに発生率が急増する代表的ながんであり、これまで組織型に基づき分化型癌・未分化型癌の2つに大別され発癌経路が研究されることが多かった。しかし胃癌の中には組織学的多様性を示す腫瘍が少なからず存在し、従来の組織分類と発癌経路を一对一で関連づけることは困難であることが判明してきた。そこで我々はマイクロサテライト不安定性（MSI）を指標として検討した結果、MSIは高齢者、女性、乳頭腺癌と充実型低分化腺癌で高率であることを見出した。この高齢者に特徴的な胃癌におけるmicroRNAプロファイルを検討したところ、大腸癌と異なり、胃癌ではmicroRNAプロファイルとMSIとの関連性は認められなかった。これは胃癌の多様性に関係しているかもしれない。また、低分化腺癌の充実型と非充実型とは異なるmicroRNAプロファイルを示したことから、充実型と非充実型とは異なる発癌経路を経て発生する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Gastric cancer is representative malignant neoplasm which increases with aging, and its carcinogenesis has been commonly studied based on the histological classification: differentiated type and undifferentiated type. However, gastric cancer often has histologic diversity within the tumor and it is difficult to explain a close relationship between histological classification and carcinogenesis. Therefore, we examined microsatellite instability (MSI) as a marker and found that MSI was significantly related with older age, occurrence in women, papillary adenocarcinoma and solid-type poorly differentiated adenocarcinoma. Unlike colorectal cancer, MSI was not associated with microRNA profile in gastric cancer. This may be due to variety of gastric cancer. Then, we focused on gastric poorly differentiated adenocarcinoma which often occurred in the elderly and found that microRNA profile in solid-type poorly cancer was different from that in nonsolid-type cancer. This result indicated that solid-type cancer may develop in the different way from nonsolid-type cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成23年度	800,000	240,000	1,040,000
平成24年度	700,000	210,000	910,000
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：胃癌，加齢，microRNA

1. 研究開始当初の背景

胃癌は加齢とともに発生率が急増する代表的ながんであるが、その発癌経路は大腸癌に比べ、未だ解明されていない点が多い。胃癌は通常、組織型に基づき分化型癌・未分化型癌の2つに大別され、現在までこの組織分類に沿った発癌経路が研究されてきた。しかし胃癌の中には組織学的多様性を示す腫瘍が少なからず存在し、従来の組織分類と発癌経路を一对一で関連づけることは困難であることが判明してきた。そうした中、胃癌をマイクロサテライト不安定性 (MSI) の状態で分類する方法が提案され (Simpson AJ, *et al. Trends Mol Med* 2001)、胃癌の発生過程は大腸癌と同様に分子病理学的に染色体不安定性経路と MSI 経路とに分類する方法が提唱された。

高齢者胃癌ではテロメア短縮に関連した染色体不安定性経路が優位であるものの、加齢とともに MSI 経路の比率が増加し、80 歳代では胃癌発生数の約 1/3 に達する。MSI を示す胃癌の発生にはミスマッチ修復遺伝子プロモーター領域のメチル化が関与するが、何故加齢により増加するかは不明である。

また、高齢者胃癌は、MSI の比率が高く、組織学的多様性を示すことが多い (Arai T, *et al. Gastric Cancer* 2004)。しかし、加齢に伴い組織学的多様性が増す要因については未だ十分解明されていない。

一方、microRNA (miR) は転写後レベルで標的遺伝子の発現を抑制する機能を有する。癌化過程での CpG island のメチル化により、ミスマッチ修復系遺伝子とともに miR の発現も抑制されている可能性がある。このように、加齢とともに増加するメチル化・MSI を示す胃癌の発生に miR 発現のエピジェネティック制御が関与するかを明らかにする。

2. 研究の目的

胃癌・大腸癌を臨床病理学的、分子病理学的に解析した結果、MSI を示す胃癌は基本的に分化型腺癌で発生し、進行とともに未分化型癌に移行すること、加齢とともにミスマッチ修復遺伝子のメチル化がみられることを明らかにしてきた。そこで、今回はこの MSI を示す胃癌発生経路における miR 発現のエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを研究の目的とする。また老化の観点から従来言われている遺伝子変異についても検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高齢者胃癌の MSI と組織型との関連解析：464 病変の胃癌切除検体を用い、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織から抽出した DNA を鋳型にして、BAT-25 と BAT-26 の2つの mononucleotide marker を使用して MSI を判定した。その結果と組織型ならびに年齢、性、占居部位、壁深達度、リンパ節転移などの臨床病理学的事項との関連について統計学的に検討した。

(2) 高齢者胃癌の microRNA プロファイリング：高齢者によくみられる充実型低分化腺癌 6 例を含む胃癌手術例 12 例 (男性 10 例、女性 2 例、66~85 歳；MSI 陽性 6 例、MSI 陰性 6 例) を対象として、腫瘍と非腫瘍部粘膜から抽出した total RNA 12 組を用い、Toray 3D-Gene[®] miRNA oligo chip (DNA chip, 1,212 遺伝子；東レ、鎌倉) で網羅的にスクリーニングした。

(3) 高齢者胃癌の microRNA プロファイリングと MSI、組織型との関連：上記で得られた胃癌 microRNA とマイクロサテライト不安定性の結果をクラスター解析した。

(4) 胃癌の遺伝子変化、特に KRAS ならびに BRAF 遺伝子変異について：278 例の胃癌切除検体を用い、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織から抽出した DNA を鋳型にして、KRAS codon 12, 13 と BRAF codon 6000 の変異をシーケンスあるいは polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) で解析した。結果を臨床病理学的事項と統計学的に検討した。

4. 研究成果

(1) MSI と組織型との関連：マイクロサテライト不安定性は 464 病変の胃癌のうち 82 病変 (17.7%) に認められた。MSI は男性 9.6%、女性 27.1% と女性に有意に高率に認められた。MSI は 65~74 歳 8.5%、75~84 歳 18.4%、85 歳以上では 35.3% と加齢とともに増加した。組織型別検討では、充実型低分化腺癌 (por1) 43.0%、乳頭腺癌 (pap) 32.5% が他の組織型に比べ有意に高率であった。進行度と組織型別に MSI の比率を比較すると、早期癌 pap (41.7%)、進行癌 por1 (48.3%) が有意に高率であり、MSI を示す分化型癌が進行とともに未分化型癌に移行する可能性が示唆された (図 1)。

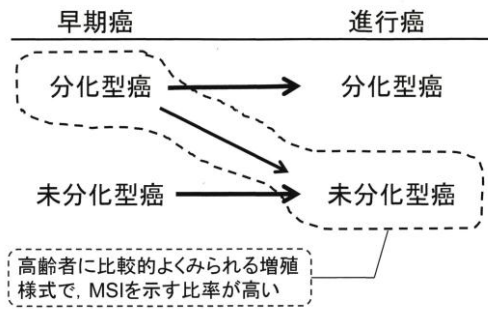


図1 MSIを示す高齢者胃癌の発育に伴う組織型の変化の模式図

(2) 高齢者胃癌の microRNA プロファイリング

非腫瘍性胃粘膜組織と比較して、胃癌組織で 10 種類の miRNAs (miR-106a, 106b, 126, 1290, 106b*, 21*, 10a, 107, 103, 10b) が高発現を示した (average \log_2 rank ratio > 0.5; T/N ratio > 1.4)。一方、9 種類の miRNA (miR-133b, 125b, 125a-5p, 29c*, 143*, let-7a, 28-3p, 100, 193a-5p) は胃癌で低発現を示した (average \log_2 rank ratio < -0.5; T/N ratio < 0.7)。これらの一部は、多くの研究者から同様の報告があるが、異なる変動を示す miRNA も認められた。

(3) 高齢者胃癌の microRNA プロファイリングと MSI、組織型との関連

クラスター解析の結果、胃癌においては miRNA プロファイルと MSI との関連性は認められなかった。Lanza G, et al (Mol Cancer 2007) は MSI 陽性散発性大腸癌における miRNA プロファイルは MSS 大腸癌と比較し、有意差があると報告している。Earle SL, et al (J Mol Diagn 2010) も大腸癌における miRNA プロファイルと MSI 陽性群との関連性を報告している。しかし大腸癌と異なり、胃癌では miRNA プロファイルと MSI との関連性は認められなかった。これは胃癌の多様性に関係しているかもしれない。

また、miRNA プロファイルと組織型との関連性も認められなかった。しかし、por1 では miR-106a, 106b, 125, and 1290 の高発現が、miR-133b, 125b, and 125a-5p の低発現の傾向がみられた。

次に高齢者胃癌の代表的な組織型である por1 の特徴を明らかにする目的で、低分化腺癌における充実型 (por1) と非充実型 (por2) の miRNA プロファイルを比較検討した。充実型低分化腺癌 5 例、非充実型 5 例を対象として、腫瘍と非腫瘍部粘膜から抽出した RNA を用い網羅的にスクリーニングしクラスター解析した。その結果、por1 と por2 とで発現の差異が認められた。por2 で正常粘膜より発現が亢進

し、por1 で低下している代表的な miRNA は、miR-23b, 125b, 497, 29c, 133a, 145, 125-5p, 30a*, 143 であった。この結果から、低分化腺癌には 2 つの亜型にそれぞれ特異な miRNA プロファイルがみられる可能性が示唆された (図 2)。これらの結果をもとに、特に差異の大きかった miRNA に注目し、胃癌の鑑別診断のマーカーになりうるか否かの検討を進める予定である。

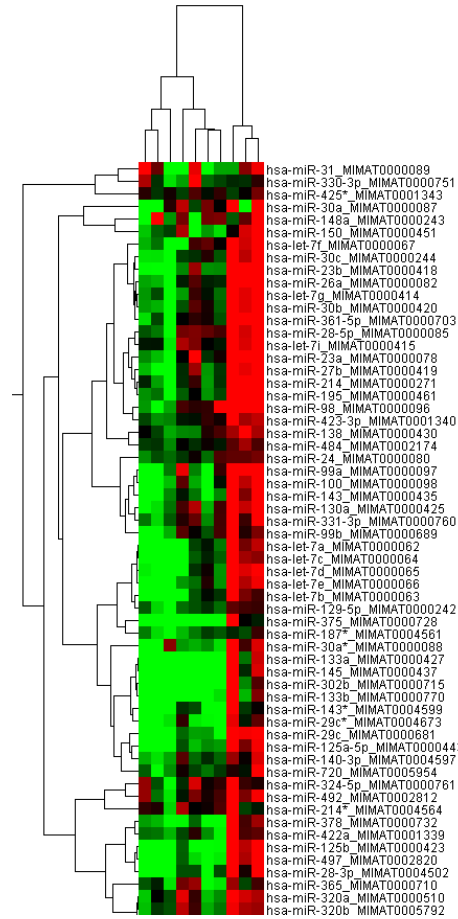


図2 胃低分化腺癌のクラスター解析図
左7例が充実型、右3例が非充実型である。

(4) 胃癌の遺伝子変化、特にKRASならびに BRAF 遺伝子変異について

胃癌 230 病巣のうち KRAS に遺伝子変異が認められたのは 10 例 (4.3%) であった。このうち 6 病巣が codon 12, 4 病巣が codon 13 の変異であった。KRAS 遺伝子変異は高齢者に有意に高頻度で認められた。さらに KRAS 変異はミスマッチ修復系異常のみみられる病巣で高率に認められた。このことより、KRAS は高齢者胃癌の発生に関与する可能性が示唆され、さらなる検討が必要である。一方、BRAF 遺伝子変異に関しては、1 病巣に認められたのみであった。BRAF 変異は胃癌の発生に関与は低いものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

1. Arai T, Sakurai U, Sawabe M, Honma N, Aijda J, Kanazawa N, Kuroiwa K, Takubo K. Frequent microsatellite instability in papillary and solid-type, poorly-differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Gastric Cancer* 2012 Dec 29. [Epub ahead of print] (2013 in press)
2. Iizuka T, Sawabe M, Kaiyo Takubo K, Liu M, Homma Y, Suzui M, Arai T. *hTERT* promoter polymorphism, -1327C>T, is associated with the risk of epithelial cancer. *SpringerPlus* 2013; 2: 249.
3. van Grieken NCT, Aoyama T, Chambers PA, Bottomley D, Ward LC, Inam I, Buffart TE, Das K, Lim T, Pang B, Zhang SL, Tan IB, Carvalho B, Heideman DA, Miyagi Y, Kameda Y, Arai T, Meijer GA, Tsuburaya A, Tan P, Yoshikawa T, Grabsch HI. KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: Results from a large international multicentre study. *Br J Cancer* 2013; 108: 1495-501

〔学会発表〕（計4件）

1. Arai T, Sakurai U, Sawabe M, Honma N, Aida J, Takubo K. Frequent microsatellite instability and absent hMLH1 expression in solid-type poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach. 9th International Gastric Cancer Congress, 2011.4.22, Seoul (Korea)
2. 新井富生, 相田順子, 本間尚子, 下村七生貴, 仲村賢一, 田久保海誉. Relationship between microRNA expression profile and microsatellite instability in gastric carcinomas in the elderly (高齢者胃癌における microRNA 発現プロファイルとマイクロサテライト不安定性との関係) 第70回日本癌学会総会 2011.10.5 名古屋
3. 新井富生, 櫻井うらら, 沢辺元司, 本間尚子, 相田順子, 仲村賢一, 泉山七生貴, 田久保海誉: 高齢者胃癌における microRNA 発現プロファイルとマイクロサテライト不安定性との関係. 第101回日本病理学会総会, 東京, 2012.4.27
4. 新井富生, 櫻井うらら, 本間尚子, 相田順子, 沢辺元司, 田久保海誉. 胃乳頭腺癌と充実型低分化腺癌は高頻度にマイクロサテライト不安定性を示す. 第102回日本病理学会総会, 札幌, 2013.6.6

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ttaggg-rtgp.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井富生 (ARAI TOMIO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号: 20232019

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

泉山七生貴 (IZUMIYAMA NAOTAKA)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・助手

研究者番号: 10158751