

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590429

研究課題名(和文) Serrated pathway大腸癌関連マイクロRNAの同定と治療への展開

研究課題名(英文) Micro RNA expression in serrated pathway and its association with a potential target therapy

研究代表者

三富 弘之(Mitomi, Hiroyuki)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：90181940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：広基性鋸歯状腺腫/ポリープ(SSA/P)は鋸歯状発癌経路における前癌病変に相当し、この経路の早期粘膜内癌病変及び微小浸潤癌病変に相当する粘膜内癌を伴うSSA/P、粘膜下層浸潤癌を伴うSSA/Pを対象とした解析の結果、Wntシグナルの活性化の指標となる  $\beta$ -catenin核内標識率とAXIN2・MCC遺伝子メチル化の頻度が段階的に上昇し、miR21の段階的発現亢進及びmiR20a/93/181bの段階的発現低下が明らかとなった。このことから、これらの候補miRに対するRNA干渉薬や相関のあるメチル化遺伝子の脱メチル化薬のSSA/Pの発生や発癌抑制治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) is considered as an early precursor in the serrated pathway leading to colorectal cancer development. To clarify WNT signaling activation and expression of microRNAs (20a/21/93/181b) in this pathway, we performed  $\beta$ -catenin immunostaining and methylation specific PCR for AXIN2, MCC and secreted frizzled-related proteins in SSA/Ps, SSA/Ps with high-grade dysplasia (SSA/P+HGD) and SSA/Ps with submucosal carcinoma (SSA/P+SM-Ca). Nuclear  $\beta$ -catenin immunolabelings and the methylation of AXIN2 or MCC showed stepwise increment from SSA/Ps through SSA/P+HGD to SSA/P+SM-Ca. A stepwise increment of miR21 and a stepwise decrement of miR20a/93/181b expressions were seen in this sequence. There were significant correlations of those miR expressions with AXIN2 or MCC methylation in this pathway. Our results point toward a potential target therapy of those miRs and methylated genes such as RNA-interference drug or demethylase in malignant progression of SSA/P.

研究分野：医学歯学

キーワード：マイクロRNA 広基性鋸歯状腺腫/ポリープ 鋸歯状発癌経路 大腸ポリープ 遺伝子メチル化

1. 研究開始当初の背景

大腸癌発癌経路には、1980年代から解析されてきた conventional adenoma-carcinoma pathway と2000年以降注目されている新たな serrated adenoma-carcinoma pathway があり、各々にシグナル伝達系の活性化の特徴がある。そこで serrated pathway における premalignant lesion → intermediate lesion → advanced lesion の各段階の microRNA (miR) の profile の特徴を解析し、候補 miR の前癌病変の癌化リスク予測、局所浸潤能等の biomarker としての意義を明らかにし、さらに候補 miR に対する RNA 干渉薬の治療への応用を目指す事を研究開始当初の目的とした。

2. 研究の目的

(1) Serrated pathway の premalignant lesion, intermediate lesion, advanced lesion における miR20a / 21 / 93 / 181b 発現変化の比較を行う。

(2) Serrated pathway の premalignant lesion, intermediate lesion, advanced lesion における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達系の候補遺伝子である  $\beta$ -catenin の免疫染色による核内標識率、AXIN2、mutated in colorectal cancer (MCC)、secreted

frizzled-related protein (SFRP) のメチル化および BRAF 遺伝子変異の変動を解析する。

(3) 最終的に serrated pathway の premalignant lesion, intermediate lesion, advanced lesion における miR20a, 21, 93, 181b 発現の変動と  $\beta$ -catenin 核内標識率、AXIN2、MCC、SFRP のメチル化および BRAF 遺伝子変異の変化との相関を検討する。

3. 研究の方法

(1) 対象

Serrated pathway の premalignant, intermediate, advanced lesion として、それぞれに対応する sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) 25 病変、粘膜内癌合併 SSA/P (SSA/P+HGD) 19 病変、粘膜下層浸潤癌合併 SSA/P (SSA/P+SM-Ca) 13 病変、正常大腸粘膜 10 サンプルの合計 67 サンプルを対象とした。

(2) 方法

$\beta$ -catenin の免疫染色

1 次抗体として  $\beta$ -catenin モノクローナル抗体 (clone 14, BD Bioscience, San Diego, CA, USA) を用い、2 次抗体以降は Envision Kit を用いた。

AXIN2、MCC、SFRP (1,2,4) のメチル化解析ホルマリン固定パラフィン切片から DNA を抽出し、メチル化特異的 PCR 法で解析した。

BRAF 遺伝子変異

ホルマリン固定パラフィン切片から DNA を抽出し、BRAF 遺伝子 exon 15 の変異を direct sequence 法で解析した。

miR20a / 21 / 93 / 181b 発現

ホルマリン固定・パラフィン包埋材料からの RNA を抽出し、real-time PCR 法により miR20a / 21 / 93 / 181b 発現の解析を行った。

4. 研究成果

$\beta$ -catenin の核内標識率

SSA/P (median 2%; interquartile range 0-4%) → SSA/P+HGD (8%; 2-15%) → SSA/P+SM-Ca (8%; 4-22%) と段階的に上昇した。

AXIN2、MCC、SFRP (1,2,4) のメチル化 AXIN2 及び MCC のメチル化の頻度は、SSA/P → SSA/P+HGD → SSA/P+SM-Ca と段階的に上昇した (表 1)。

BRAF 遺伝子変異

BRAF 遺伝子変異の頻度は、SSA/P → SSA/P+HGD → SSA/P+SM-Ca と段階的に低下した (表 1)。

表1. SSA/Pの癌化過程における Wnt/ $\beta$ -catenin系 (AXIN, MCC, SFRP) 及び RAS/RAF/MAP kinaseシグナル伝達系 (BRAF) の変化

	SSA/P	SSA/P +HGD	SSA/P +SM-Ca
<i>Gene methylation</i>			
AXIN2	1 (4%)	9 (64%)	7 (78%)
MCC	4 (15%)	14 (100%)	9 (100%)
SFRP1	25 (93%)	14 (100%)	9 (100%)
SFRP2	26 (96%)	14 (100%)	9 (100%)
SFRP4	22 (81%)	14 (100%)	9 (100%)
<i>Gene mutation</i>			
BRAF	22 (82%)	9 (64%)	4 (44%)

miR20a / 21 / 93 / 181b 発現

miR20a / 93 / 181b は SSA/P → SSA/P+HGD → SSA/P+SM-Ca と癌化の進展に伴って段階的これらの発現が低下したのに対し、miR21 は逆に段階的に発現が亢進した (図 1)。

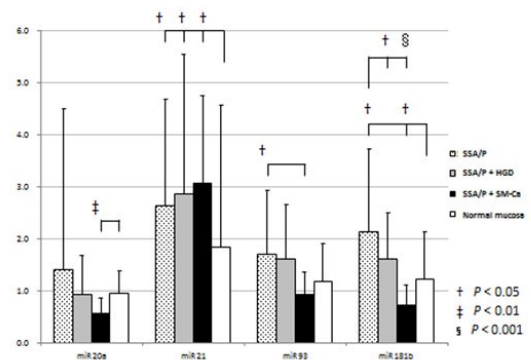


図1 SSA/Pの癌化過程における miR20a / 21 / 93 / 181b発現の変化

Serrated pathway の癌化過程における miR20a / 21 / 93 / 181b 発現の変動と  $\beta$ -catenin 核内標識率、AXIN2、APC、MCC、SFRP メチル化・ BRAF 遺伝子変異の変化との相関

(i) SSA/P → SSA/P+HGD → SSA/P+SM-Ca の癌化過程で、AXIN2 及び MCC のメチル化と miR181b 発現低下との関連性が示唆された (図 2)。

(ii) SSA/P → SSA/P+HGD → SSA/P+SM-Ca の癌化過程で、AXIN2 及び MCC のメチル化と miR21 発現亢進との関連性が示唆された ( 図 2 )

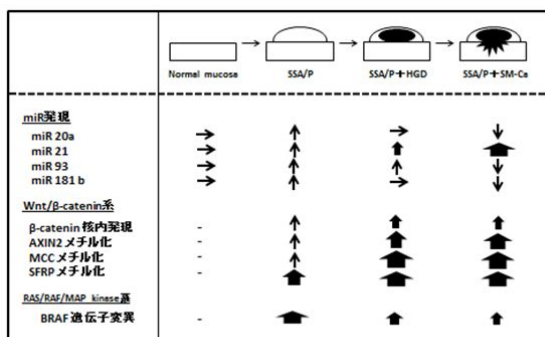


図2 SSA/Pの癌化過程におけるmiR発現の変化とWnt/β-catenin及びRAS/RAF/MAP kinaseシグナル伝達系の変化の相関

## 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 13 件 )

Murakami T, Mitomi H, Saito T, Takahashi M, Sakamoto N, Fukui N, Yao T, Watanabe S: Distinct WNT/β-catenin signalling activation in the serrated neoplasia pathway and the adenoma-carcinoma sequence of the colorectum. *Mod Pathol.* 2015;28:146-58. doi: 10.1038/modpathol.2014.41.

Morimoto T, Mitomi H, Saito T, Takahashi M, Murakami T, Sakamoto N, Yao T, Watanabe S: Distinct profile of HIF1α, PTCH, EphB2 or DNA repair protein expression and BRAF mutation in colorectal serrated adenoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29:1192-9. doi: 10.1111/jgh.12553.

Saito T, Mitomi H, Imamhasan A, Hayashi T, Mitani K, Takahashi M, Kajiyama Y, Yao T: Downregulation of sFRP-2 by epigenetic silencing activates the β-catenin/Wnt signaling pathway in esophageal basaloid squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2014;464:135-43. doi: 10.1007/s00428-014-1538-1.

Okubo T, Saito T, Mitomi H, Takagi T, Torigoe T, Suehara Y, Kaneko K, Yao T: p53 mutations may be involved in malignant transformation of giant cell tumor of bone through interaction with GPX1. *Virchows Arch.* 2013;463:67-77. doi:10.1007/s00428-013-1435-z.

Alkam Y, Mitomi H, Nakai K, Himuro T, Saito T, Takahashi M, Arakawa A, Yao T, Saito M: Protein expression and methylation of DNA repair genes hMLH1, hMSH2, MGMT and BRCA1 and their correlation with clinicopathological parameters and prognosis in basal-like breast cancer.

*Histopathology.* 2013;63:713-25. doi: 10.1111/his.12220.

Hidaka Y, Mitomi H, Saito T, Takahashi M, Lee SY, Matsumoto K, Yao T, Watanabe S: Alteration in the Wnt/β-catenin signaling pathway in gastric neoplasias of fundic gland (chief cell predominant) type. *Hum Pathol.* 2013;44:2438-48. doi: 10.1016/j.humpath.2013.06.002.

Shigaki K, Mitomi H, Fujimori T, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Fujii S, Itabashi M, Kameoka S, Sahara R, Takenoshita S: Immunohistochemical analysis of chromogranin A and p53 expressions in ulcerative colitis-associated neoplasia: neuroendocrine differentiation as an early event in the colitis-neoplasia sequence. *Hum Pathol.* 2013;44:2393-9. doi: 10.1016/j.humpath.2013.06.008.

Nakae K, Mitomi H, Saito T, Takahashi M, Morimoto T, Hidaka Y, Sakamoto N, Yao T, Watanabe S. MUC5AC/β-catenin expression and KRAS gene alteration in laterally spreading colorectal tumors. *World J Gastroenterol.* 2012;18:5551-9. doi: 10.3748/wjg.v18.i39.5551.

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;43:2012-23. doi: 10.1016/j.humpath.2012.02.010.

[ 学会発表 ] ( 計 19 件 )

Murakami T, Mitomi H, Sakamoto N, Ritsuno H, Ueyama H, Matsumoto K, Shibuya T, Osada T, Yao T, Watanabe S: Clinicopathologic characteristics and molecular associations of WNT/β-catenin signal in the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Digestive Disease Week 2015.5.16-19, Washington DC, USA.*

村上敬、三富弘之、坂本直人、立之英明、上山浩也、松本健史、澁谷智義、長田太郎、荻原達雄、寺井毅、八尾隆史、渡辺純夫: SSA/P 併存早期大腸癌の臨床病理学的検討. 第 24 回大腸 IIc 研究会 2014.9.14, 大阪 .

森本崇、三富弘之、齋藤剛、高橋路子、村上敬、坂本直人、八尾隆史、渡辺純夫: 大腸鋸歯状腺腫における HIF1α, PTCH, EphB2 蛋白や DNA 修復遺伝子関連蛋白発現の変化と BRAF・Kras 遺伝子変異. 第 102 回日本病理学会総会, 2013.6.6-8, 札幌.

[ 図書 ] ( なし )

〔産業財産権〕(なし)

〔その他〕(なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三富 弘之 (MITOMI HIROYUKI)  
獨協医科大学・医学部 病理学(人体分子)  
講座・学内教授  
研究者番号：90181940

(2) 研究分担者

齋藤 剛 (SAITO TSUYOSHI)  
順天堂大学・医学部人体病理病態学講座・  
准教授  
研究者番号：80439736