

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590431

研究課題名(和文) スキルス胃癌におけるマイクロRNAによる制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms by micro-RNA in scirrhous carcinoma

研究代表者

倉田 厚 (Kurata, Atsushi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10302689

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)：胃低分化腺癌はスキルス胃癌の形態を呈し、増殖が速く予後不良である。胃癌の浸潤能と細胞形態に関して、上皮間葉移行に関わるmicro RNA (miR)-200cとその標的分子を検出して検討した。胃癌組織検体では、in-situ hybridizationにより、高分化腺癌ではmiR-200c発現が亢進する一方、低分化腺癌では発現低下し、その標的の変動も免疫組織化学により判明した。胃癌細胞株の検討では、形態が類円形の細胞ではmiR-200c発現亢進し、紡錘形細胞では低下する傾向が確認され、qPCR法により標的の変動も確認された。胃癌の分化低下・浸潤・形態変化にmiR-200cの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Poorly differentiated gastric carcinoma usually presents as scirrhous carcinoma, which is highly proliferative with poor prognosis. Concerning invasive ability and morphology of gastric carcinoma, micro-RNA (miR)-200c, which is associated with epithelial-mesenchymal transition, was investigated. In situ hybridization of gastric cancer tissue revealed that expression of miR-200c was enhanced in well differentiated adenocarcinomas, while its expression was decreased in poorly differentiated adenocarcinomas. ZEB1, ZEB2, and E-cadherin, the targets of miR-200c, also varied in accordance with expression level of miR-200c. Investigation of cell lines showed that expression of miR-200c was preserved in rounded cells, while it was down-regulated in spindle cells, with paralleled shifts of the target RNAs and proteins. It was suggested that down-regulation of miR-200c plays a role in epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinoma.

研究分野：病理学

キーワード：胃癌 マイクロRNA 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

胃癌は高分化から低分化まで様々な組織型があり、その原因も人種、ピロリ菌感染、塩分食、Epstein-Barr ウイルスなど様々ものが提唱されている。特に印環細胞癌を含む胃低分化腺癌は我が国で多く、内視鏡検査で見逃されやすく、急速な進行からスキルス胃癌の形態を示し播種性転移を来す予後不良な癌である。胃低分化腺癌は組織学的に癌細胞の孤立性増殖が認められ、E-cadherin の発現低下と関わる (Yasui W et al. Oncol Rep 1995)。E-cadherin 低下に伴う上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) は様々な癌で近年、浸潤・転移能亢進と関係づけられ注目されており、申請者は胸腺腫における fascin、子宮頸癌における L-type amino acid transporter 1 が浸潤性腫瘍で高発現していることを報告したが、これらの発現が EMT の原因か結果かは不明確であった。

一方、miRNA(miR) はノンコーディング RNA のひとつであり、遺伝子の発現を制御する機能を有すると考えられ、近年、癌をはじめさまざまな疾患で注目を浴びている。なかでも miR-200 ファミリーは EMT に関わることが知られている。特に miR-200c は、その発現が ZEB1, ZEB2 を標的とし、これに伴い E-cadherin の発現を上昇させることから、miRNA-200c の発現低下は E-cadherin の低下を介して EMT を促進することが、様々な癌で報告されている。

2. 研究の目的

(1) 胃癌の組織検体における miR-200c およびその標的となる蛋白の発現を検索し、分化度を含めた臨床病理学的因子との関係性を明らかにする。

(2) 胃癌の培養細胞における miR-200c およびその標的となる RNA ないしは蛋白の発現を検索する。

(3) 胃癌の培養細胞に miR-200c のオリゴ核酸ないしはアンタゴ核酸をトランスフェクションさせ、miRNA-200c ないしはその標的の変動を検索する。

これらの研究を通じて、miR-200c およびその標的が、胃癌の分化度や形態変化にどのように影響を及ぼすかを解明し、スキルス胃癌の治療法の基礎開発の進展に寄与する。

3. 研究の方法

(1) 胃癌の組織検体における miR-200c およびその標的となる蛋白の発現検索、臨床病理学的因子との関係性の検討

関連病院より胃切除手術で得られた病理検体組織標本から tissue array を作成し、miR-200c の発現を、in situ hybridization 法にて検討し、miR-200c の標的となる ZEB1 および ZEB2 が制御する E-cadherin の発現を免疫組織化学的に検索する。また、各症例につき、年齢、性、合併症、腫瘍の肉眼分類、

最大径、深達度、リンパ節転移の有無などの臨床病理データを入手する。

(2) 胃癌の培養細胞における miR-200c およびその標的となる RNA ないしは蛋白の発現の検索

胃癌培養細胞株を 8 種類購入する。高分化由来と低分化由来、また原発由来と転移巣由来とで、2x2=4 項目に分類し、各項目に該当する細胞株をそれぞれ 2 種類購入する。これら培養株における、miRNA-200c およびその標的として知られている ZEB1, ZEB2, E-cadherin の定量を qPCR 法にて行う。ZEB1, E-cadherin に関してはウエスタン・プロット法にて蛋白発現も検索する。

(3) 胃癌の培養細胞における miR-200c のオリゴ核酸ないしはアンタゴ核酸のトランスフェクション、その際の miRNA-200c ないしはその標的の変動の検索

miR-200c 発現の低い株に miR-200c のオリゴ核酸ないしはそのプレ核体をトランスフェクションさせ、また miR-200c 発現の高い株に miR-200c のアンタゴ核酸をトランスフェクションさせ、miR-200c ないしはその標的の変動を調べる。また、ウエスタン・プロット法にて、miRNA-200c の標的蛋白の検出を行う。

4. 研究成果

胃癌の組織検体における miR-200c およびその標的となる蛋白の発現検索、臨床病理学的因子との関係性の検討

胃癌の病理検体 99 症例を解析した。その結果、in situ hybridization 法にて検索した miR-200c の発現は、高分化腺癌では亢進し、低分化腺癌では低下する傾向が認められた。miR-200c の発現低下は、免疫組織化学的検索にて ZEB1 の高発現、E-cadherin の低発現と相関し、さらには低年齢とも相関し、スキルス胃癌において miR-200c 発現低下を介した EMT が関与している可能性が示唆された。

胃癌の培養細胞における miR-200c およびその標的となる RNA ないしは蛋白の発現の検索

qPCR 法による 8 種類の培養細胞の検討の結果、miR-200c 高発現株では、ZEB1 および ZEB2 低発現、E-cadherin 高発現であり、逆に miR-200c 低発現株では ZEB1 および ZEB2 高発現、E-cadherin 低発現であった。ZEB1 と E-cadherin の蛋白の発現検討でも同様の結果であった。miR-200c の発現の多寡は、由来組織の胃癌が高分化か低分化かとは相関せず、原発由来か転移由来かとも相関しなかった。代わりに、培養細胞の形態と相関した。すなわち、miR-200c 高発現株は類円形の細胞形態であり、低発現株は紡錘形の細胞形態であった。

胃癌の培養細胞における miR-200c のオリゴ核酸ないしはアンタゴ核酸のトランスフェクション、その際の miRNA-200c ないしはそ

の標的の変動の検索

miR-200c 発現の低い株に miR-200c のオリゴ核酸ないしはそのプレ核体をトランスフェクションさせた結果、ZEB1 および ZEB2 の発現低下、E-cadherin の発現亢進が、ある種の株で認められた。また miR-200c 発現の高い株に miR-200c のアンタゴ核酸をトランスフェクションさせた結果、ZEB1 および ZEB2 の発現亢進、E-cadherin の発現低下が、ある種の株で認められた。細胞の形態変動も一部の株で認められた。今後は、最適な実験条件を検討していく。

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 20 件)

1. Hashimoto H, Kurata A, Fujita K, Shimada H, Nagai T, Horiuchi H, Kuroda M. Ovarian small cell carcinoma of pulmonary type appearing in ante-mortem ascites: An autopsy case and review of the literature. *Hum Pathol Case Rep.* (in press) 査読有
2. Oshiro H, Miura M, Iobe H, Kudo T, Shimazu Y, Aoba T, Okudela K, Nagahama K, Sakamaki K, Yoshida M, Nagao T, Nakaya T, Kurata A, Ohtani O. Lymphatic Stomata in the Adult Human Pulmonary Ligament. *Lymphat Res Biol.* 2014 Dec 19. [Epub ahead of print] 査読有
3. Horita A, Kurata A, Ohno S, Shimoyamada H, Saito I, Kamma H, Kuroda M. Immaturity of smooth muscle cells in the neointima is associated with acute coronary syndrome. *Cardiovasc Pathol.* 2015 Jan-Feb;24(1):26-32. 査読有
4. Hirano K, Uno K, Kuwabara H, Kojima K, Ohno S, Sakurai H, Kamma H, Kurata A. Expression of L-type amino acid transporter 1 in various skin lesions. *Pathol Res Pract.* 2014 Oct;210(10):634-9. 査読有
5. Nakaya T, Morita K, Kurata A, Ushiku T, Igarashi T, Kuroda M, Fukayama M. Multifocal kaposiform hemangioendothelioma in multiple visceral organs: an autopsy of 9-day-old female baby. *Hum Pathol.* 2014 Aug;45(8):1773-7. 査読有
6. Yamada M, Katano H, Yotsumoto M, Hashimoto H, Muramatsu T, Shiotsuka M, Fukutake K, Kuroda M. Unique expression pattern of viral proteins in human herpesvirus 8-positive plasmablastic lymphoma: a case report. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Aug 15;7(9):6415-8. 査読有
7. Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res.* 2014 May 15;74(10):2882-91. 査読有
8. Nakaya T, Kurata A, Hashimoto H, Nishimata S, Kashiwagi Y, Fujita K, Kawashima H, Kuroda M. Young-age-onset pancreatoduodenal carcinoma in Shwachman-Diamond syndrome. *Pathol Int.* 2014 Feb;64(2):75-80. 査読有
9. Yoon JH, Jung SM, Park SH, Kato M, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK, Mamura M. Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. *EMBO Mol Med.* 2013 Nov;5(11):1720-39. 査読有
10. Münstedt K, Estel R, Dreyer T, Kurata A, Benz A. Small Cell Ovarian Carcinomas - Characterisation of Two Rare Tumor Entities. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2013 Jul;73(7):698-704. 査読有
11. Kurata A, Inoue S, Ohno S, Nakatsubo R, Takahashi K, Ito T, Kawasaki K, Kokubo R, Sakai T, Ubukata J, Matsubara S, Muraoka R, Yamazaki J, Hirose T, Hojo M, Watanabe E, Kuroda M. Correlation between number of renal cysts and aortic circumferences measured using autopsy material. *Pathol Res Pract.* 2013 Jul;209(7):441-7. 査読有
12. Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W, Brojigin N, Kaneoka Y, Maeda A, Kumada T, Kawada N, Kubo S, Kuroda M. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis. *BMC Cancer.* 2013 Mar 4;13:99. 査読有
13. Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H. GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nat Commun.* 2013;4:1532. 査読有

14. Kurata A, Kawashima S, Terado Y, Komagata Y, Kaname S, Okano H, Nishiyama K, Hirano K, Kamma H, Arimura Y, Yamada A. AP-VAS 2012 case report: a case of systemic MPO-ANCA-associated vasculitis that demonstrated brain infarction and immunohistochemically MPO-positive capillaries. *CEN Case Rep*. 2013;2:148-153. 査読有
 15. Wu W, Takanashi M, Borjigin N, Ohno SI, Fujita K, Hoshino S, Osaka Y, Tsuchida A, Kuroda M. MicroRNA-18a modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3 during gastric adenocarcinogenesis. *Br J Cancer*. 2013 Feb 19;108(3):653-61. 査読有
 16. Kurata A, Saji H, Ikeda N, Kuroda M. Intracaval and intracardiac extension of invasive thymoma complicated by superior and inferior vena cava syndrome. *Pathol Int*. 2013 Jan;63(1):56-62. 査読有
 17. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther*. 2013 Jan;21(1):185-91. 査読有
 18. Borjigin N, Ohno S, Wu W, Tanaka M, Suzuki R, Fujita K, Takanashi M, Oikawa K, Goto T, Motoi T, Kosaka T, Yamamoto K, Kuroda M. TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Oct 19;427(2):355-60. 査読有
 19. Kurata A. Hygiene hypothesis: why south/north geographical differences in prevalence of asthma and sarcoidosis? *Med Hypotheses*. 2012 Sep;79(3):363-4. 査読有
 20. Malon C, Brachtel E, Cosatto E, Graf HP, Kurata A, Kuroda M, Meyer JS, Saito A, Wu S, Yagi Y. Mitotic figure recognition: agreement among pathologists and computerized detector. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2012;35(2):97-100. 査読有
- [学会発表](計 16 件)
1. Kurata A. Pathology of Takayasu arteritis. In "Vasculitides", IAP2014, 2014 年 10 月 6 日・Bangkok・タイ.
 2. 山田 正俊, 藤田 浩司, 倉田 厚, 黒田 雅彦. 胃癌組織における PD-L1 の発現検討. 第 103 回日本病理学会総会・2014 年 4 月 26 日・広島.
 3. 倉田 厚, 山田 正俊, 橋本 浩次, 藤田 浩司, 大野 慎一郎, 高梨 正勝, 黒田 雅彦. 胃癌細胞株における上皮間葉移行に關与するマイクロ RNA200c とその標的の検出. 第 103 回日本病理学会総会・2014 年 4 月 24 日・広島.
 4. 橋本 浩次, 倉田 厚, 藤田 浩司, 高木 偉博, 嶋田 秀仁, 福島 純一, 堀内 啓, 黒田 雅彦. 全経過 2 か月で急速に死に至った, 両側卵巣神経内分泌腫瘍の 1 剖検例. 第 61 回日本病理学会関東支部学術集会・2013 年 12 月 21 日・東京.
 5. 堀田 綾子, 倉田 厚, 下山田 博明, 菅間 博, 斎藤 生朗, 黒田 雅彦. 剖検症例の冠動脈を用いた肥厚内膜平滑筋細胞の免疫組織化学的検討. 第 18 回血管病理研究会・2013 年 10 月 19 日・札幌.
 6. 山田 正俊, 大野 慎一郎, 藤田 浩司, 倉田 厚, 黒田 雅彦. 前立腺癌における microRNA-200c の発現解析. 第 102 回日本病理学会総会・2013 年 6 月 7 日・札幌.
 7. 橋本 浩次, 山田 正俊, 四本 美保子, 倉田 厚, 黒田 雅彦. 抗 HIV 療法が奏功したにもかかわらずカポジ肉腫が全身転移をきたして死亡した AIDS 患者の 1 剖検例. 第 102 回日本病理学会総会・2013 年 6 月 6 日・札幌.
 8. 倉田 厚, 山田 正俊, 橋本 浩次, 吳偉紅, 那 日蘇, 藤田 浩司, 大野 慎一郎, 高梨 正勝, 黒田 雅彦. 胃癌細胞株における上皮間葉移行に關与するマイクロ RNA とその標的の検出. 第 102 回日本病理学会総会・2013 年 6 月 6 日・札幌.
 9. 堀田 綾子, 倉田 厚, 斎藤 生朗, 黒田 雅彦. 剖検症例の冠動脈を用いた肥厚内膜の免疫組織化学的検討. 第 102 回日本病理学会総会・2013 年 6 月 6 日・札幌.
 10. 倉田 厚, 井上 茂, 黒田 雅彦. 剖検における腹部大動脈径の増大と腎嚢胞数の相関. 第 17 回血管病理研究会・2012 年 10 月 26 日・東京.
 11. 倉田 厚, 吳偉紅, 山田 正俊, 那 日蘇, 藤田 浩司, 大野 慎一郎, 高梨 正勝, 黒田 雅彦. 胃低分化腺癌における in situ hybridization 法と qPCR 法を用いた miRNA-200c 発現低下の意義. 第 4 回日本 RNAi 研究会・2012 年 8 月 30 日~9 月 1 日・広島.
 12. 倉田 厚, 佐治 久, 池田 徳彦, 黒田 雅彦. 右心房内腫瘍を形成した、浸潤性胸腺腫の 1 剖検例. 第 55 回日本病理学会関東支部学術集会・総会・2012 年 6 月 9 日・東京.

13. 倉田 厚 . 衛生仮説は、喘息とサルコイドーシスの地域分布を説明できるか？第 101 回日本病理学会総会・2012 年 4 月 27 日・東京
14. 倉田 厚, 井上 茂, 黒田 雅彦 . 剖検における腹部大動脈径の増大と腎嚢胞数の相関 第 101 回日本病理学会総会・2012 年 4 月 27 日・東京 .
15. 倉田 厚, 呉 偉紅, 山田 正俊, 那 日蘇, 藤田 浩司, 大野 慎一郎, 高梨 正勝, 黒田 雅彦 . 胃低分化腺癌における in situ hybridization 法を用いた miRNA-92a および 200c の発現低下の意義 . 第 101 回日本病理学会総会・2012 年 4 月 26 日・東京 .
16. Kurata A, Kawashima S, Terado Y, Komagata Y, Kaname S, Okano H, Nishiyama K, Hirano K, Kamma H, Arimura Y, Yamada A. A case of systemic MPO-ANCA associated vasculitis that demonstrated brain infarction and immunohistochemically MPO-positive capillaries. The Asia Pacific meeting of vasculitis and ANCA workshop 2012・2012 年 3 月 30 日・東京 .

〔図書〕(計 3 件)

1. 倉田 厚 . 第 7 章 循環障害 . 標準病理学 第 5 版 ,坂本穆彦監修 ,pp 173-207 , 医学書院 , 2015 .
2. 倉田 厚 . 好酸球性肺炎ほか .「病理画像診断これでスッキリ！」,梅澤明弘,黒田雅彦編 , pp 26-31, 34-43, 72-127, 192-199 ,メジカルビュー社 , 2012 .
3. 倉田 厚 . 大血管 . 病理と臨床 第 30 巻 臨時増刊号「病理解剖マニュアル」, 深山正久ほか編 ,pp 199-204 ,文光堂 , 2012 .

〔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 :
 出願年月日 :
 取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕
 ホームページ等

http://www.tokyo-med.ac.jp/molpathol/aboutlab_index/aboutlab_members/members_002.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

倉田 厚 (KURATA ATSUSHI)
 東京医科大学・医学部・准教授
 研究者番号 : 10302689

(2)研究分担者

黒田 雅彦 (KURODA MASAHIKO)
 東京医科大学・医学部・教授
 研究者番号 : 80251304

(3)連携研究者

()

研究者番号 :