

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860240

研究課題名(和文) microRNAから見た早期大腸癌におけるリンパ節転移に関わる分子基盤の研究

研究課題名(英文) Expression of miRNAs predicting lymph node metastasis in early colorectal carcinoma

研究代表者

立石 陽子 (TATEISHI, Yoko)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20644438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜下層浸潤癌(SM癌)では、約10%にリンパ節転移がみられ、所属リンパ節郭清を伴う外科手術が必要となる。我々は、これまでにSM癌のリンパ節転移に関与する組織形態学的特徴を研究してきた経験から、様々な癌のバイオマーカーとなり得ることが期待されているmiRNAに注目した。本研究では、miR-31, miR-21, miR-200c, miR-143について、SM癌を対象としてその発現と形態学的特徴を解析した。miR-31, miR21は非腫瘍と比較して腫瘍において発現レベルが亢進していることが明らかとなった。miR-31は大腸発癌早期に癌化に関わっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lymph node metastasis occurs in about 10% of patients with submucosal invasive colorectal carcinoma. We focused on the submucosal invasive carcinoma and examined the expression of microRNAs to delineate its relationship with clinicopathological features. We reported that the expression of miR-31 was higher in colorectal cancer tissue than in non-tumoral tissue. The up-regulated expression of miR-31 may play an oncogenic role in the early stage of carcinogenesis in colorectal cancers.

研究分野：病理学

キーワード：早期大腸癌 リンパ節転移 microRNA

1. 研究開始当初の背景

進行大腸癌に対する主たる治療法は手術療法および術後補助化学療法であり、粘膜内癌に対する治療法は内視鏡的切除術である。その間の深達度に位置する粘膜下層浸潤癌 (SM 癌) では、約 10% にリンパ節転移がみられ、所属リンパ節郭清を伴う外科手術が必要となるが、90% の症例は内視鏡的切除術による根治が期待される。実際の臨床の場では、大腸 SM 癌のうち手術を必要とする症例を如何に選別するかが、経済的、患者 QOL の立場からも重要である。

Non-coding RNA の発現異常は多くの癌で報告され、新規バイオマーカーとして注目されている。miRNA は様々な遺伝子翻訳を制御することで発癌、浸潤、転移に寄与するとされている。進行大腸癌症例の凍結材料や血液を用いた miRNA 発現プロファイリングからは、大腸癌のスクリーニングや分子標的治療への応用が期待されている (Yamada et al. Clin Cancer Res. 2015)。大腸 SM 癌においても特異的に発現する miRNA を同定し、その働きを明らかにすることができれば、悪性度を予測するバイオマーカーとして臨床への応用が期待される。

miR-31 は、頭頸部癌、乳癌、胃癌、大腸癌など多種の癌における発現変動が報告されている。大腸癌の手術材料を用いた検討でも、TNM ステージが進行するにつれ、miR-31 発現が亢進することが報告されている (Cancer Res. 2008;68:6414-6424)。miR-21 も、TNM ステージの高い癌では高発現で予後不良と報告されている (Schetter AJ. JAMA 2008)。miR-200c が高発現の癌は予後不良 (Xi Y. biomark insights 2006) である他、肝転移巣では高発現 (Hur K. Gut 2013) との報告もなされている。miR-143 は、腺腫および癌において低発現で (Akao Y. Cancer Gene Ther 2010)、低発現の癌は予後不良 (Pichler. Br J Cancer 2012) との報告がある。

しかし、粘膜下層浸潤までに留まる早期大腸癌におけるこれらの microRNA の発現の検出は極めて少ない。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、大腸粘膜下層浸潤癌 (SM 癌) における microRNA の発現を定量し、発現の局在を解析し、さらに臨床病理学的因子との相関を検討することである。

進行大腸癌において予後に相関する microRNA として報告されている miR-21, miR-31, miR-200c, miR-143 の発現を定量し、大腸癌浸潤早期における miRNA の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

2001 年から 2014 年までに、横浜市立大学付属病院および横浜南共済病院の大腸 SM 癌手術症例 71 例を対象とした。症例の内訳は、男性 50 人、女性 21 人、平均年齢 67.4 歳 (35-86 歳)、平均腫瘍径 23.1mm (8-65mm)、右半結腸 24 例、左半結腸 47 例であった。

パラフィン切片から macrodissection により非腫瘍と腫瘍を分離した。RNeasy FFPE kit (Qiagen) を用いて microRNA を抽出し、qRT-PCR にて miR-21, miR-31, miR-200c, miR-143 の発現レベルを定量した。macrodissection にて腫瘍と非腫瘍で発現に有意差の見られた microRNA については、腺腫成分を伴う大腸 SM 癌 5 例を対象として、microdissection を用いて非腫瘍粘膜、腺腫、癌の成分に分け、発現レベルを評価した。Fluorescence in situ hybridization (FISH) により、miR-31 の host gene locus を評価した。

臨床病理学的因子 (組織型、粘膜下層浸潤距離、リンパ管侵襲、血管侵襲、続出の grade、リンパ節転移の有無) と microRNA 発現との相関を解析した。

4. 研究成果

(1) qRT-PCR にて、miR-31 および miR-21 発現レベルは、非腫瘍性大腸粘膜に比して、腫

瘍において有意に高いことが確認された (p<0.0001, p=0.01)。miR-200c および miR-143 の発現レベルは、非腫瘍と腫瘍に有意差は認められなかった。

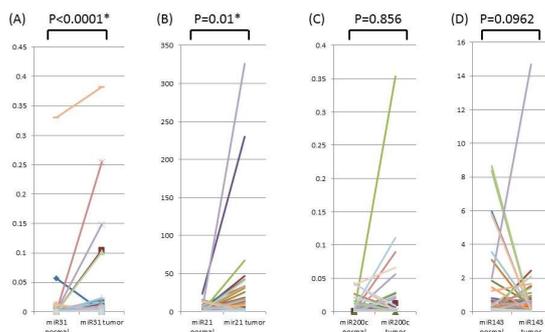


図1. miR-31(A), miR-21(B), miR-200c(C), miR-143(D) expression in 71 pairs of matched normal mucosa tissue and CRC tissues.

(2)腺腫を伴う大腸 SM 癌 5 例中 4 例で、非腫瘍粘膜、腺腫、癌と腫瘍に比例して miR-31 発現レベルが上昇していた。非腫瘍粘膜が腫瘍粘膜よりも miR-31 発現レベルが高かった 1 症例は、macrodissection による検討でも同様の結果が得られており、その結果に矛盾はなかった。

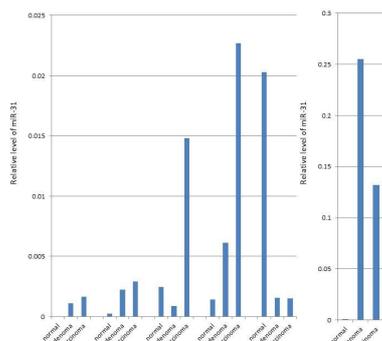


図2. The expression level of miR-31 in 5 cases corrected by laser microdissection.

(3)FISHにて、miR-31を緑、chromosome 9を赤のシグナルとして評価したところ、(a)非腫瘍 (b)腺腫成分(c)癌は、全てmiR31/chromosome 9が0.9となり、遺伝子の増幅は認められなかった。

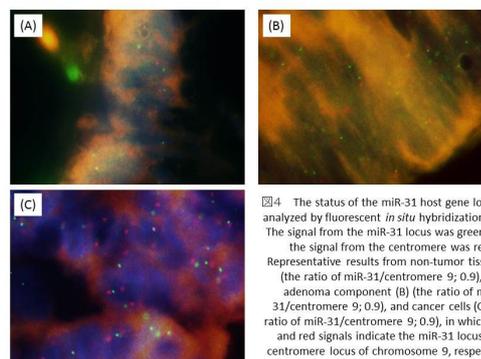


図4 The status of the miR-31 host gene locus was analyzed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The signal from the miR-31 locus was green while the signal from the centromere was red. Representative results from non-tumor tissue (A) (the ratio of miR-31/centromere 9; 0.9), the adenoma component (B) (the ratio of miR-31/centromere 9; 0.9), and cancer cells (C) (the ratio of miR-31/centromere 9; 0.9), in which green and red signals indicate the miR-31 locus and centromere locus of chromosome 9, respectively.

(4)miR-31 は粘膜下層浸潤距離が 4mm 以上、5mm 以上の場合に有意に発現レベルが亢進していた (p=0.037, 0.00873)。しかし、他の臨床病理学的因子との相関は認められなかった。miR-21, miR-200c, miR-143 の発現レベルと臨床病理学的因子との相関は見られなかった。

今回の検討では、大腸 SM 癌においても多くの症例で miR-31 の発現が亢進していることが明らかになった。また、少数例の検討ではあるが、非腫瘍<腺腫<癌と、miR-31 発現が亢進する傾向があり、腫瘍化が進むにつれ発現亢進している可能性が示唆された。また、有意差は見られなかったが、KRAS 変異を有する大腸 SM 癌(1.80E-02)では、KRAS 変異の無い大腸 SM 癌(2.10E-03)よりも miR-31 発現レベルが高い傾向があることも明らかとなっている。miR-31 が RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1)を標的として RAS シグナルを活性化しているという報告もある。miR-31 は KRAS の下流で大腸癌の腫瘍化に関与している可能性もある。

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 7 件)

Yoko Tateishi, Koji Okudela, Hideaki Mitsui, Shigeaki Umeda, Yoko Kojima, Mai Matsumura,

Naomi Kawano, Yoshiaki Inayama, Kenichi Ohashi. The potential role of microRNA-31 expression in early colorectal cancer. *Pathol Int.* 2015; Oct;65(10): 513-8. doi: 10.1111/pin.12334. (査読あり)

Mai Matsumura, Koji Okudela, Yoko Tateishi, Shigeaki Umeda, Hideaki Mitsui, Takehisa Suzuki, Nakayama T, Yoshiaki Inayama, Kenichi Ohashi. Leptomeningeal melanomatosis associated with neurocutaneous melanosis – an autopsy case report. *Pathol Int.* 2015; Feb;65(2): 100-5. (査読あり) doi: 10.1111/pin.12238.

Yoko Tateishi, Masae Takahashi, Shin-ichiro Horiguchi, Nobuaki Funata, Koichi Koizumi, Koji Okudela, Tsunekazu Hishima, Kenichi Ohashi. Clinicopathologic study of intestinal spirochetosis in Japan with special reference to human immunodeficiency virus infection status and species types: analysis of 5265 consecutive colorectal biopsies. *BMC Infect Dis.* 2015; Jan 13;15(1):13. doi: 10.1186/s12879-014-0736-4. (査読あり)

Koji Okudela, Takehisa Suzuki, Shigeaki Umeda, Yoko Tateishi, Hideaki Mitsui, Yohei Miyagi, Kenichi Ohashi. A comprehensive search for microRNAs with expression profiles modulated by oncogenic KRAS: Potential involvement of miR-31 in lung carcinogenesis. *Oncol Rep.* 2014 Oct;32(4):1374-84. doi: 10.3892/or.2014.3339. (査読あり)

Koji Okudela, Yoko Tateishi, Shigeaki Umeda, Hideaki Mitsui, Takehisa Suzuki, Saito Yuichi, Woo Tetsukan, Tajiri Michihiko, Masuda Munetaka, Yohei Miyagi, Kenichi Ohashi. Allelic imbalance in the miR-31 host gene locus in lung cancer--its potential role in carcinogenesis. *PLoS One.* 2014 Jun 30;9(6):e100581. doi: 10.1371/journal.pone.0100581. (査読あり)

Shigeaki Umeda, Masatoshi Tateno, Etsuko

Miyagi, Koji Sakurai, Reiko Tanaka, Yoko Tateishi, Aya Tokinaga, Kenichi Ohashi, Mitsuko Furuya. Uterine tumors resembling ovarian sex cord tumors (UTROSCT) with metastasis: clinicopathological study of two cases. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Feb 15;7(3):1051-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971308/> (査読あり)

Koji Okudela, Katayama A, Woo T, Mitsui Hideaki, Suzuki Takehisa, Tateishi Yoko, Umeda Shigeaki, Masuda M, Kitamura H, Ohashi Kenichi. *PLoS One.* 2014 Feb 4;9(2): e87193 doi: 10.1371/journal.pone.0087193. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

Expressions of oncogenic modulator microRNAs in early colorectal cancer
Yoko Tateishi, Koji Okudela, Hideaki Mitsui, Shigeaki Umeda, Yoko Kojima, Mai Matsumura, Takehisa Suzuki, Kazuteru Watanabe, Naomi Kawano, Yoshiaki Inayama, Kenichi Ohashi 第 105 回日本病理学会総会 2016 年 5 月 13 日仙台国際センター (宮城県仙台市)

Expression of oncogenic modulator miRNAs in early CRC
Tateishi Y, Okudela K, Mitsui H, Umeda S, Suzuki T, Matsumura M, Kojima Y, Watanabe K, Kawano N, Inayama Y, Endo I, Ohashi K. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 9 日名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Exprssion of oncogenic modulator miR-31 and miR-21 are up-regulated in early CRC
Yoko Tateishi, Koji Okudela, Hideaki Mitsui, Shigeaki Umeda, ,Yoko Kojima, Kazuteru Watanabe, Naomi Kawano, Yoshiaki Inayama, Kenichi Ohashi 第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 2014 年 9 月 25 日 (神奈川県横浜市)

早期大腸癌手術症例における microRNA 発現と悪性度の関連 . 立石陽子、奥寺康司、

三井秀昭、梅田茂明、河野尚美、大橋健一
第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 14
日広島国際会議場（広島県広島市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~pathola/custom13.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立石 陽子 (TATEISHI, Yoko)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20644438

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：