

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860248

研究課題名(和文) 肺癌の発生・進展における癌間質での新たなマイクロRNAの異常発現と機能の解析

研究課題名(英文) Study of the abnormal expression and function of stromal microRNAs associated with progression of lung cancer

研究代表者

森田 茂樹 (Shigeki, Morita)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30707021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：MicroRNAアレイの結果や文献を元に、肺癌間質でのmicroRNAの検討を行った。MiR-21及びmiR-199aを主な対象とし、いずれもin situ hybridization (ISH)にて、癌間質の線維芽細胞(cancer associated fibroblast, CAF)で高発現が認められた。miR-21のISHでは癌細胞及びCAFのいずれも浸潤部で高発現を認め、CAFでのmiR-21の高発現が肺腺癌患者の予後不良因子であった。細胞株では、癌細胞及びCAF中のmiR-21とCAF関連蛋白であるcalumeninが相互に働いて、肺腺癌の浸潤を促進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined invasion-associated microRNAs in the stroma of lung adenocarcinoma by microarray analysis of the microRNA after microdissection from invasive and non-invasive part of lung adenocarcinoma. To investigate the significance of each microRNA (mainly miR-21 and miR-199) in cancer associated fibroblasts (CAFs) in the lung adenocarcinoma, in situ hybridization targeting each microRNA was applied to invasive adenocarcinoma. MiR-21 was highly expressed in cancer cells and CAFs, respectively. Lung adenocarcinoma cases with miR-21 high CAFs showed lower survival than those with miR-21 low CAFs. The cell line study suggested that miR-21 in CAFs was a driving force to promote progression of lung adenocarcinoma through the interaction with calumenin which was a novel colon CAF secreted protein.

研究分野：人体病理学

 キーワード：microRNA 肺癌 間質 マイクロダイセクション in situ hybridization 癌関連線維芽細胞 miR-21  
calumenin

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) microRNA と肺癌:

microRNA は mRNA 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ことが近年明らかになり、研究が急速に進歩している。特に癌と microRNA の関わりは注目を集めている。肺癌においても miR-21, miR-155 等複数の microRNA の発現異常や予後との関係が報告され、発生、進展には microRNA が関与している。

### (2) 上皮 (癌細胞) と間質:

肺癌の発生、進展では上皮 (癌細胞) の形態及び遺伝子の変化に加えて、間質の変化が報告されている。形態学的には肺腺癌では中心部の線維化及び癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast, CAF) の出現を伴って、癌の進展、浸潤が見られる。加えて、遺伝子発現の変化としては、肺癌間質の線維芽細胞でミスマッチ修復遺伝子の発現上昇、Cox1 や Smad3 の発現低下が認められ、癌の発生、進展に際しては癌間質における遺伝子発現の変化も重要であると考えられる。

### (3) 間質での microRNA の発現:

癌間質での microRNA 発現に関しては、卵巣癌の CAF での変化や大腸癌及び乳癌で *in situ hybridization* (ISH) を用いて CAF に miR-21 の発現亢進が確認されている。肺癌に関しては、細胞株を用いた検討の報告は認められるものの、癌細胞 (上皮) での報告に比して癌間質での microRNA の変化に着目した研究は少ない。しかし、サイトカインを介した経路や近年報告のあるエクソソームによる細胞間伝達によって、間質での microRNA の発現異常が癌の発生、進展に影響を与えることが想定されている。加えて、肺に関しては肺線維症などの肺の線維化に対して miR-21 及び miR-145 の変化も報告されているが、背景肺の線維化と癌間質での線維化に着目した研究は少ない。

## 2. 研究の目的

肺癌で上皮に比して検討の少ない間質での microRNA の発現と癌の発生や進展との関係について探求する。研究に際してはマイクロダイセクションや *in situ hybridization* (ISH) などの組織形態学的手法を主に用いて、癌間質 (非浸潤部及び浸潤部) で異常発現している microRNA の同定、ISH による癌間質での microRNA の局在とその意義を検証する。また、microRNA の発現と臨床病理学的因子との関係性についても明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

### (1) 肺癌臨床検体:

2014 ~ 2015 年における帝京大学医学部附属病院での肺癌手術検体 20 例から凍結検体を採取し、そのうち品質の良かった 3 例をダイセクションからのマイクロアレイに提出した。また、2001 ~ 2013 年における肺癌手術症例のホルマリン固定後パラフィン包埋

(FFPE) 検体、腺癌 192 例を整理し、各症例の腫瘍部分から 2 か所を打ち抜いて再構成して作成された tissue microarray (TMA) を構築した。27 年度以降は 2005 年 ~ 2008 年における東京大学医学部附属病院での肺癌切除検体 150 例から作成された TMA ブロックを用いて検討を行った。TMA は主に免疫組織化学的検討及び microRNA に対する ISH に使用した。

### (2) 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 (Leica #11505189) 作成は RNA-free の環境で行った。混合型腺癌 (浸潤癌) の凍結検体を用いて、非腫瘍部、癌部 (非浸潤部及び浸潤部) の間質をレーザーマイクロダイセクション装置 (AS LMD, Leica) で、凍結切片より分取し、RNA の抽出を行った。

### (3) MicroRNA マイクロアレイ:

凍結検体から分取された RNA のうち比較的品質の良かった 3 症例を混合し、非浸潤部と浸潤部の microRNA に対して TORAY 社、3D-gene にて解析した。また、肺癌間由来の線維芽細胞株に TGF- $\beta$  を作用させた群とコントロール群から抽出した microRNA についても同様にマイクロアレイでの測定を行った。

### (4) microRNA ISH:

肺癌切除検体からの FFPE 及び TMA に対して Exiqon 社の miRCURY LNA<sup>TM</sup> 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 ISH を行った。miR-21 の陽性シグナル (発現量) の評価は、0 (発現なし)、1+ (低発現)、2+ (中等度)、3+ (高発現) の 4 段階で行った。positive control としては定量的 RT-PCR で miR-21 が高発現であった症例 (2 例、3+ として) を用いた。内因性コントロールとして肺胞マクロファージ (3+)、気管支上皮 (0) を参照し、標準化を行った。尚、LNA U6 snRNA プロブで発現が認められなかった症例は検討から除外した。

### (5) 免疫組織化学的検討:

肺癌切除検体からの FFPE 及び TMA に対して CAF で発現が見られるマーカー (-SMA, calumenin, periostin, podoplanin) に対する免疫組織化学的検討を行った。

### (6) 細胞生物学的検討:

肺癌細胞株 A549、胎児肺線維芽細胞株 MRC-5 及び IMR-90 を用いて検討を行った。肺癌細胞株 (A549) の conditioned media (CM) を用いた線維芽細胞株の変化の観察を行った。また、逆に線維芽細胞株に対する microRNA mimic (miR-21) 導入あるいは導入前後の CM を用いた癌細胞の変化も検討した。それぞれ、RNA 抽出、タンパク抽出を施行して microRNA, mRNA 測定、Western blotting 等を施行した。また、CM を用いた実験では、細胞株の増殖能及び浸潤能の計測も行った。

#### 4. 研究成果

(1) microRNA マイクロアレイによる解析：  
 ダイセクションによる採取後の RNA の品質の良かった 3 症例を混合し、非浸潤部と浸潤部の microRNA に対して TORAY 社、3D-gene にて解析した。アレイ解析の結果、非浸潤部と浸潤部で 2 倍以上の差が見られた microRNA として miR-199a-3p, miR-199b-3p, miR-23c, miR-29c-3p, miR-98-5p, miR-19b-3p, miR-199b-5p, miR-125b-1-3p, miR-129-2-3p, miR-93-3p が認められた(図 1)。また、肺癌間質由来の線維芽細胞株に TGF- $\beta$  を作用させた群とコントロール群から抽出した microRNA について差が見られたのものとしては、miR-4640-5p, miR-6087, miR-21-5p, miR-212-3p, miR-1910-5p, miR-29b-3p, miR-19a-3p などが認められた。さらに比較的発現量の多いもの及び既報での情報をもとに miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-21 について検討を進めた。

	非浸潤部	浸潤部	microRNA
浸潤部>非浸潤部	469	1022	hsa-miR-199a-3p
浸潤部>非浸潤部	126	274	hsa-miR-199b-3p
浸潤部>非浸潤部	210	444	hsa-miR-23c
浸潤部>非浸潤部	67	140	hsa-miR-29c-3p
浸潤部>非浸潤部	76	152	hsa-miR-98-5p
浸潤部>非浸潤部	89	179	hsa-miR-19b-3p
浸潤部>非浸潤部	53	106	hsa-miR-125b-1-3p
浸潤部<非浸潤部	17	4	hsa-miR-129-2-3p
浸潤部<非浸潤部	13	5	hsa-miR-93-3p

※数値は相対値(100以上を網掛け)

図 1 非浸潤部及び浸潤部の間質から分取した RNA を用いた microRNA アレイの結果

(2) microRNA in situ hybridization:  
 microRNA マイクロアレイから得られたものに加えて、文献の情報をもとに miR-93, miR-106b, miR-210 も含めて、各 microRNA に対する probe を用いて検討を行った。miR-106b 及び miR-210 等では、癌細胞に加えて癌間質の線維芽細胞にも染まりが見られたが、やや染色性が弱い傾向であった(TMA では検討せず)。miR-199a-3p, miR-199a-5p についても、染まりが一定しないため、現在条件検討中である。

miR-21 については良好な染色性が得られ、癌細胞及び間質の線維芽細胞のいずれにも陽性シグナルが認められ、腫瘍ごとに上皮、間質で様々な染色パターンが認められた(図 2)が、主に間質での評価を行った。

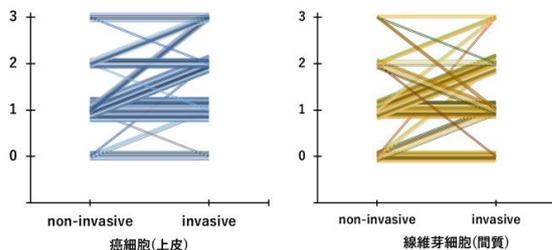


図 2 miR-21 in situ hybridization での陽性シグナルの非浸潤部と浸潤部での変化(左:上皮、右:間質)

上皮、間質いずれも浸潤部に強い発現を認めた。また、上皮と間質の発現は非浸潤部では解離していたが、浸潤部ではより一致していた(Spearman's Rank Correlationで正の相関、 $\rho=0.2275, p=0.0320^*$ )。虚脱瘢痕部分には染まりがなく、周辺の腫瘍に接した線維芽細胞にこの発現が認められる。辺縁付近では、lepidic growthの直下に接する線維芽細胞が線状に染まって見える。尚、全生存率において上皮での発現では、予後に差を見いだせなかったが、間質での検討では 0-2+を低発現、3+を高発現とした場合には予後に有意差が見られる(図 3,  $p=0.0021$ )。

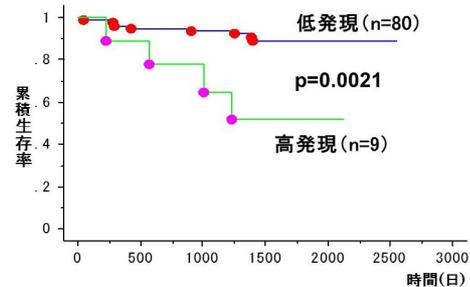


図 3 肺腺癌浸潤部間質における miR-21 発現と全生存期間。

(3) 免疫組織化学的検討 (IHC):  
 miR-21 及びその他の microRNA の染色部位を検討すると、間質の線維芽細胞、特に腫瘍に接する筋線維芽細胞(CAF)に一致して発現が認められるものが多く、 $\alpha$ -SMA 及びその他の CAF 関連蛋白に対する免疫組織化学的検索を行った。結果、いずれも  $\alpha$ -SMA 陽性線維芽細胞に一致した陽性像が認められた(図 4)。

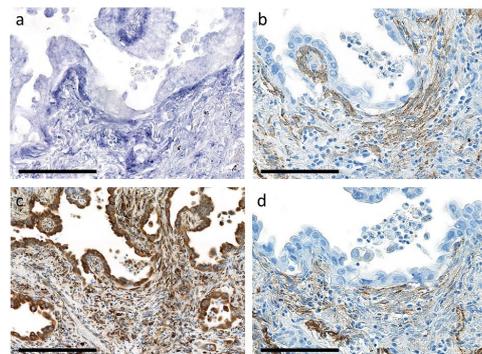


図 4 (a)miR-21 in situ hybridization. (b)  $\alpha$ -SMA, (c)calumenin, (d)podoplanin に対する IHC

(4) 細胞生物学的検討:  
 上記の ISH 及び IHC などの結果から、上皮に接する fibroblast の動きが非浸潤癌から浸潤癌への進展過程に強く関与していると考えて、以後の実験では miR-21 と fibroblast 及び癌細胞の関係を調べた。肺癌細胞株(A549)の conditioned media(CM)中で、正常の肺線維芽細胞株(MRC-5 及び IMR-90)を培養すると TGF- $\beta$  作用時と同様に線維芽細胞株の miR-21 発現が亢進し、形態

の変化が見られることを確認した。miR-21 mimic を導入した線維芽細胞株(過剰発現系)では筋線維芽細胞類似の形態変化及び遊走能の亢進(p<0.01)が見られ、CAF 関連蛋白である calumenin の発現を増加させることを RT-PCR での mRNA 測定、Western blotting で確認した。さらに miR-21 を過剰発現させた線維芽細胞株から得た CM 中では、肺癌細胞株の増殖能及び浸潤能の亢進が観察された。Calumenin を knockdown すると、上記 CM においても肺癌細胞株の増殖能及び浸潤能の抑制が認められ、癌細胞及び CAF 中の miR-21 と calumenin が相互に働いて、肺腺癌における進展及び浸潤を促進していることが示唆された。

#### 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7件)

Takahashi Y, Matsutani N, Morita S, et al. (計7名) Predictors of long-term compensatory response of pulmonary function following major lung resection for non-small cell lung cancer. *Respirology*. 査読有. 2017 Feb;22(2):364-371. DOI: 10.1111/resp.12904

Kanaoka R, Takahashi Y, Morita S, et al. (計6名) Pulmonary artery intramural leiomyosarcoma mimicking pulmonary aneurysm. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 査読有. 2016 Nov;24(9):896-898.

Dejima H, Matsutani N, Imazuru T, et al. (4番目, 計7名) Combined Aortic Resection and Stent Graft Insertion for Local Recurrence of Metastatic Lung Carcinoma Following Stereotactic Radiotherapy: A Case Report. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 査読有. 2016;22(1):52-6. DOI: 10.5761/atcs.cr.15-00079

Aso T, Uozaki H, Morita S, Kumagai A, Watanabe M. Loss of ARID1A, ARID1B, and ARID2 Expression During Progression of Gastric Cancer. *Anticancer Res*. 査読有. 2015;35(12):6819-27.

Dejima H, Morita S, Takahashi Y, et al. (計7名) Case Report A case of invasive Langerhans cell histiocytosis localizing only in the lung and diagnosed as pneumothorax in an adolescent female. *Int J Clin Exp Pathol*. 査読有. 2015; 8(3), 3354-3357.

Uozaki H, Morita S, Kumagai A, et al. (計7名) Stromal miR 21 is more

important than miR 21 of tumor cells for the progression of gastric cancer. *Histopathology*. 査読有. 2014;65(6), 775-783. DOI: 10.1111/his.12491  
Ibrahim R, Matsubara D, Osman Y, et al. (6番目, 計13名) Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. *Human Pathol*. 査読有. 2014; 45(7), 1397-1405. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.02.013

##### [学会発表](計10件)

似鳥純一ら(10名中3番目) 2015 WHO 肺癌組織分類による臨床病理学的特徴および予後因子の検討. 第57回日本肺癌学会学術集会 2016年12月20日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

Terada Y, et al. (7名中3番目) Impact of histologic subtype and spread through air spaces (STAS) in stage III (N2) lung adenocarcinoma by new World Health Organization classification. IASLC 17th World conference on lung cancer. 2016年12月4-7日. Vienna (AUSTRIA)

Nakao K, et al (7名中3番目) A retrospective analysis of patients with small lung adenocarcinoma (≤2cm) by new World Health Organization classification IASLC 17th World conference on lung cancer. 2016年12月4-7日. Vienna (AUSTRIA)

国田朱子, 森田茂樹, 深山正久. MicroRNA-21 induce the cancer associated fibroblast phenotype in lung adenocarcinoma. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6日~8日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Miyata K, et al (6名中2番目) Cytological features of ALK rearranged lung adenocarcinoma. XXXI International Congress of the International Academy of Pathology and 28<sup>th</sup> Congress of the European Society of Pathology 2016年9月25-29日 Cologne (GERMANY)

森田茂樹ら(計6名) 腺癌及び扁平上皮癌成分の混在した肺原発絨毛癌の1例. 第105回日本病理学会総会 2016年5月12日~14日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

森田茂樹ほか(計6名). 10代女性、非喫煙者に発症した Pulmonary Langerhans cell histiocytosis の1例. 第104回日本病理学会総会 2015年4月30日-5月2日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

森田茂樹ほか(計6名). 胸腺癌の術前診断で化学療法後に切除した縦隔の絨毛

癌の一例．第 55 回日本肺癌学会総会  
2014 年 11 月 14-16 日 国立京都国際会  
館（京都府・京都市）  
国田朱子, 森田茂樹, 深山正久．肺腺癌  
腫瘍間質における miR-21 の発現．第 33  
回分子病理学研究会宮城蔵王シンポジ  
ウム 2014 年 7 月 25-26 日 宮城蔵王ロ  
イヤルホテル(宮城県・刈田郡蔵王町)  
Kunita A, Morita S, Fukayama M.  
Expression of miR-21 in cancer  
associated fibroblasts in lung  
adenocarcinoma. the 105<sup>th</sup> Annual  
Meeting of the American Association  
for Cancer Research. 2014 年 4 月 5-9  
日 . San Diego (CA, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

森田 茂樹 (MORITA , Shigeki )  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 30707021

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし