福井大学リポジトリ
UNIVERSITY OF FUKUI REPOSITORY

消化器癌の病理診断及び治療マーカーとなるマイクロRNAの検索(2)

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2010-11-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊藤, 浩史, 廣野, 靖夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/2815

トランスレーショナルリサーチ推進センター

消化器癌の病理診断及び治療マーカーとなるマイクロＲＮＡの検索（２）

研究代表者：伊藤 浩史（医学部、教授）
電話：0776-61-8319、メールアドレス：hiroitoh@u-fukui.ac.jp
共同研究者：廣野 靖夫（医学部、助教）

概　　要	マイクロＲＮＡ（miRNA）は約２２塩基の非常に小さい non-coding RNA で相補的な標的 mRNA の発現制御を担っており、miRNA の発現プロファイリングによって、腫瘍の診断（発生臓器、組織型、分化度など）が、cDNA マイクロアレイによる発現プロファイリング以上に正確にできることが報告されている。本研究では口腔癌および食道癌などの主要な組織型である扁平上皮癌における miRNA 発現をマイクロアレイを用いて検討し、さらに外科手術材料ホルマリン固定パラフィンブロック標本を用いて検定を行った。その結果、miR-205 が種々の臓器の扁平上皮癌や正常重層扁平上皮で高発現しているが、腺癌などの他の組織型の癌や白血病細胞などではほとんど発現していないことが明らかとなり、扁平上皮のマーカーとして極めて有力であることがわかった。また、miR-21 は腺癌と同様に扁平上皮癌でも、正常に比べて有意に発現が亢進しており、miR-205 と miR-21 の発現量を検討することで、扁平上皮癌の分子病理診断が可能であることがわかった。miRNA の発現変化は放射線治療や分子標的薬の治療マーカーとなることも報告されており、病理組織診断に加えて、同じ組織ブロックから miRNA を抽出し発現量を解析することによって、種々の疾患の治療マーカーとなる可能性が示唆された。
関連キーワード	マイクロＲＮＡ、病理組織診断、口腔癌、食道癌、扁平上皮癌

研究の背景

近年分子生物学の目覚しい進歩により、様々な遺伝子変異や異常発現が、癌を含む種々の疾患で報告されている。遺伝子解析技術の進歩は病理学の分野でも分子病理学として、日常病理診断へ応用されつつある。しかしながら、クローナリティー解析や一部の遺伝子の塩基配列を解析することを除き、分子病理診断に応用されている技法は、凍結組織から mRNA を抽出し、RT-PCR で特異的融合遺伝子を証明したり、cDNA のマイクロアレイ解析により疾患特異的な遺伝子発現パターンを解析するという方法が主体で、ホルマリン固定組織からの分子病理診断は mRNA の断片化が著しいため信頼性に乏しく、日常病理診断ではほとんど行われていない。マイクロＲＮＡ（以下 miRNA）は約２２塩基の非常に小さい non-coding RNA で相補的な標的 mRNA の発現制御を担っており、様々な疾患でその発現異常が報告されている。また miRNA の発現プロファイリングによって、腫瘍の診断（発生臓器、組織型、分化度など）が、cDNA マイクロアレイによる発現プロファイリング以上に正確にできることが報告されている。miRNA は非常に小さく安定であり、これ以上断片化されることはなく、ホルマリン固定パラフィンブロックから抽出可能である。また凍結組織と異なり、ホルマリン固定パラフィンブロックは、ルーティンの病理診断に使われており、Hematoxylin Eosin (HE) 染色標本で診断が困難な例に、追加で別の染色をするという程度で気軽に miRNA の抽出が行なえ、病理診断の現場で比較的簡単に応用可能ではないかと考えられる。

研究の目的

上記のような背景の下、本研究では、ホルマリン固定パラフィンブロックから miRNA を抽出し、疾患特異的な miRNA 発現異常、特に消化器を中心とした癌の病理診断マーカー（HE 染色では診断困難な例）や予後・治療の指標となるマーカーmiRNA を検索し、実際にルーティンの病理診断に応用できないか検討することを目的とする。

研究の成果

昨年度までに、２０年前のホルマリン固定パラフィンブロック標本からも定量可能な miRNA を抽出可能であることを明らかにし、口腔癌、食道癌（扁平上皮癌）細胞株と正常口腔、食道上皮細胞株を用いた miRNA 発現の網羅的解析により数種のマーカーmiRNA 候補を同定している。本年度は種々の臓器の細胞株や臨床材料（ホルマリン固定パラフィンブロック標本）を用いて候補となった５種の miRNA についてリアルタイム PCR 法を用いて検証を行った。その結果、全ての扁平上皮癌細胞株および正常重層扁平上皮で miR-205 が最も高発現しており、大腸癌細胞株や血液がん細胞株など非扁平上皮細胞株では検出できる量の発現は見られなかった（図１）。臨床材料を用いて、癌部分と対照非癌部分をレーザーマイクロダイセクション法で miRNA を分取して発現量を解析すると、検索したすべての臓器の扁平上皮癌、対象正常扁平上皮で miR-205 の高発現が見られた他、他臓器の癌と同様に miR-21 は正常扁平上皮に比べ有意に扁平上皮癌で高発現しており、let-7a、mir-16 も他の臓器ではがん抑制性 miRNA とされているが、扁平上皮癌では発現に変化がないか、逆に高発現する傾向にあった（図２）。miR-205, miR-21, let-7a, miR-16, miR-30a-5p の発現を、コントロールとしてすべての細胞で同程度発現しているとされる 5S ribosomal RNA 発現量との比で各々の miRNA の発現量を標準化した後、扁平上皮癌細胞（T）と周囲の正常重層扁平上皮細胞（N）の当該 miRNA 発現量の比（T/N ratio）を求めて統計学的に検討したところ、miR-205 は正常、癌を問わず、扁平上皮で著明に高発現していたが（p>0.05)、癌と正常重層扁平上皮の間で統計学的に有意な発現の差は見られなかった（図３）。一方 miR-21 は正常扁平上皮に比べ有意に扁平上皮癌で高発現していた（p>0.001）（図３）。let-7a、mir-16 も他の臓器ではがん抑制性 miRNA とされているが、扁平上皮癌では発現に変化がないか、有意さは認めないものの逆に高発現する傾向にあった。以上の結果より、miR-205 および miR-21 が口腔癌、食道癌を含む扁平上皮癌の有力な病理診断マーカーとなりえることが示唆された。現在、さらに miRNA マイクロアレイ解析から有力なマーカーとなりえる miRNA を複数同定しており、今後、予後・治療マーカーとしての可能性も追及していく予定である。

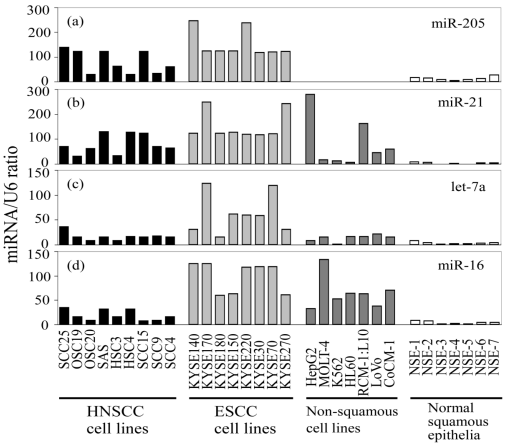

図１：種々の細胞株における miRNA の発現

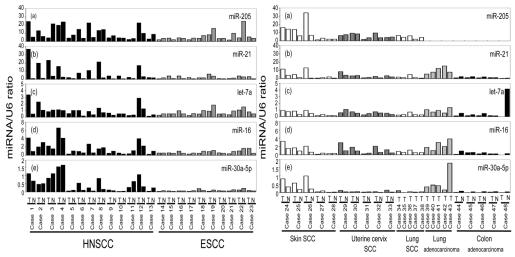

図２：種々の癌組織における miRNA の発現

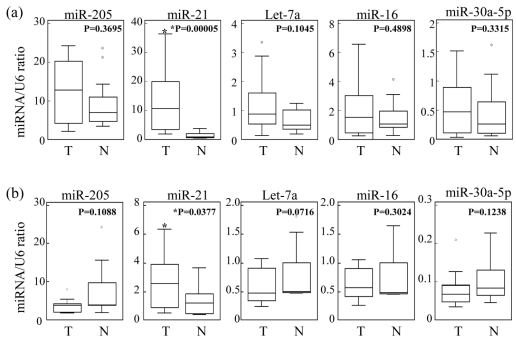

図３：口腔(a)食道(b)癌での miRNA の発現変化

特記事項・発表論文など

「特記事項」

今回の成果は第９８回日本病理学会総会（Mar, 2009,京都)、第６８回日本癌学会総会（Oct, 2009, 横浜）および第３２回日本分子生物学会年会（Dec, 2009,横浜）で発表した。

「本研究に関わる発表論文」

Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K, Itoh H: Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck (HNSCC) and the esophagus (ESCC):miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. Oncol Rep, in press.