

授与番号	甲第 1804 号
------	-----------

論文内容の要旨

Differential expression of microRNA in colorectal cancer: different patterns between isolated gland cancer and stromal cells

(大腸癌における microRNA の発現の違い：分離癌腺管細胞と分離癌間質細胞における発現パターンの差異)

(佐藤綾香, 菅井有, 藤田泰子, 大塚幸喜, 佐々木章, 鈴木拓, 松本主之)

(Pathology International 70 巻 1 号, 2019 年 11 月掲載)

I. 研究目的

大腸癌は世界的にも癌関連死の主な原因であり, 大腸癌の死亡数減少のための多くの努力がなされてきた. 大腸癌ではこれまで多くの分子レベルの異常が指摘され, 分子発癌メカニズムの解明が進んできたが, 最近では癌浸潤部における微小環境の役割が注目されている. 微小環境は癌細胞と周囲の間質で構成されており, 両者の相補的な関係が癌細胞の浸潤や転移を促進することが明らかにされつつある.

MicroRNA (miRNA) は翻訳されない 22 塩基配列ほどの短い non-coding RNA である. 大腸癌の浸潤や転移における miRNA の働きについては熱心に研究されており, 乳癌や肺癌, 膵癌, 大腸癌, 卵巣癌などの癌腫で miRNA の発現異常が高頻度にみられることが指摘されている. miRNA は癌発生において癌遺伝子の発現 (suppressor-miRNA) や癌抑制遺伝子の発現の制御 (onco-miRNA) を介して発癌に積極的に関与していることが指摘されてきた. 従ってこれらの miRNA の発現異常を解析することは癌研究, 癌診療における新しい標的分子の発見に役立つことが期待される.

癌微小環境における間質の要素として種々の細胞があるが, その中でも癌関連線維芽細胞 (CAF) は最も重要な要素となっている. 癌微小環境における癌細胞と癌間質細胞 (CAF) の miRNA の発現異常は癌の浸潤, 転移に重要な役割を担っている可能性がある. これまで癌細胞と CAF を各々分離して検討した miRNA の報告は極めて少なく, 両者の関係性を明らかにすることは大腸癌の分子研究に新しい知見を提供することが期待される.

本研究は腺管分離法で分離した癌腺管細胞と癌間質細胞を用いて癌浸潤部での癌微小環境下における両者の miRNA 発現異常の差異を明らかにすることを目的とした.

II. 研究対象ならび方法

1. 対象・検体

岩手医科大学附属病院で外科切除を行った大腸癌 24 例を対象とした.

1) 分離検体

腫瘍, 正常粘膜から腺管分離法で分離腺管細胞・分離間質細胞を単離し, RNA 抽出に用いた. 一部を HE 標本とし組織像を確認した. 分離癌間質細胞は smooth muscle actin と desmin を, 免疫染色を用いて活性化線維芽細胞であることを確認した [SMA (+)/desmin (-)].

2) 新鮮凍結組織

分離検体採取部の隣接部より組織を採取, RNA 抽出まで -80°C で凍結した.

2. miRNA 解析方法

分離検体・新鮮凍結組織の RNA を抽出し、13 種類の miRNA [hsa-miRNA-19a-3p, hsa-miRNA-21-5p, hsa-miRNA-27a-3p, hsa-miRNA-27b-3p, hsa-miRNA-31-5p, hsa-miRNA-34b-3p, hsa-miRNA-130a-3p, hsa-miRNA-143-3p, hsa-miRNA-186-5p, hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-195-5p, hsa-miRNA-206, hsa-let-7a-5p (以下 hsa-を略す).] を real time-PCR 法で測定、正常検体に対する癌検体の相対定量を行った。統計解析は Wilcoxon matched-pairs signed-rank test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

III. 研究結果

1. 癌検体の miRNA 発現状態

1) 分離癌腺管細胞

- (1) 6 種類が発現上昇した (miRNA-130a-3p, miRNA-143-3p, miRNA-206, miRNA-31-5p, miRNA-27b-3p, miRNA-27a-3p).
- (2) 7 種類が発現減少した (miRNA-21-5p, miRNA-195-5p, miRNA-19a-3p, miRNA-34b-3p, miRNA-186-5p, miRNA-191-5p, let-7a-5p).

2) 分離癌間質細胞

- (1) 3 種類が発現上昇した (miRNA-21-5p, miRNA-31-5p, miRNA-27b-3p).
- (2) 10 種類が発現減少した (miRNA-130a-3p, miRNA-143-3p, miRNA-206, miRNA-195-5p, miRNA-19a-3p, miRNA-34b-3p, miRNA-186-5p, miRNA-191-5p, let-7a-5p, miRNA-27a-3p).

3) 新鮮凍結組織

- (1) 3 種類が発現上昇した (miRNA-31-5p, miRNA-19a-3p, let-7a-5p).
- (2) 10 種類が発現減少した (miRNA-130a-3p, miRNA-21-5p, miRNA-143-3p, miRNA-206, miRNA-195-5p, miRNA-27b-3p, miRNA-34b-3p, miRNA-186-5p, miRNA-191-5p, miRNA-27a-3p).

2. 分離癌腺管細胞と分離癌間質細胞の比較

5 種類の miRNA で有意差を認めた。分離癌腺管細胞で上昇、分離癌間質細胞で減少したのは miRNA-130a-3p, miRNA-143-3p, miRNA-206, 分離癌腺管細胞で減少、分離癌間質細胞で上昇したのは miRNA-21-5p であり、分離癌腺管細胞、分離癌間質細胞ともに減少したのは miRNA-195-5p であった。

3. 分離癌腺管細胞と新鮮凍結組織の比較

7 種類の miRNA で有意差を認めた。分離癌腺管細胞で上昇、新鮮凍結組織で減少したのは miRNA-130a-3p, miRNA-143-3p, miRNA-206, miRNA-27b-3p, miRNA-27a-3p であり、分離癌腺管細胞、新鮮凍結組織ともに減少したのは miRNA-195-5p, miRNA-34b-3p であった。

4. 分離癌間質細胞と新鮮凍結組織の比較

4 種類の miRNA で有意差を認めた。分離癌間質細胞で上昇、新鮮凍結組織で減少したのは miRNA-27b-3p, 分離癌間質細胞、新鮮凍結検体ともに減少したのは miRNA-130a-3p, miRNA-143-3p, miRNA-195-5p であった。

5. 分離癌腺管細胞と分離癌間質細胞の発現状態による分類

分離癌腺管細胞と分離癌間質細胞で有意差のあるものを有意型、有意差のないものを非有意型とした。有意型では発現変動が有意に大きい方で分離癌細胞優勢型と間質細胞優勢型に、さらに発現上昇型と低下型に分類した。非有意型では分離癌細胞と分離癌間質細胞が両方発現上昇したものを発現上昇型、減少したものを発現低下型、分離癌腺管細胞で

発現上昇、分離癌間質細胞で発現減少したものを発現上昇/低下型とした。

- 1) 分離癌細胞優勢有意型は miRNA-130a-3p, 間質細胞優勢有意型は miRNA-206, miRNA-21-5p, miRNA-143-3p, miRNA-195-5p であった。
 - 2) 発現上昇非有意差型は miRNA-27b-3p, miRNA-31-5p, 発現低下非有意差型は miRNA-19a-3p, miRNA-34b-3p, miRNA-186-5p, miRNA-191-5p, let-7a-5p, 発現上昇/低下非有意差型は miRNA-27a-3p であった。
6. 分離検体（分離癌腺管細胞と分離癌間質細胞）と新鮮凍結組織の発現状態
- 分離検体の発現上昇・減少が一致しない群（miRNA-130a-3p, miRNA-21-5p, miRNA-143-3p, miRNA-206, miRNA-27a-3p）、ともに発現上昇の群（miRNA-31-5p, miRNA-27b-3p）、ともに発現減少の群（miRNA-195-5p, miRNA-19a-3p, miRNA-34b-3p, miRNA-186-5p, miRNA-191-5p, let-7a-5p）に分けた。分離検体と新鮮凍結組織での発現状態が異なる miRNA は miRNA-27b-3p, miRNA-19a-3p, let-7a-5p のみであった。

IV. 結 語

分離癌腺管および分離癌間質における miRNA の発現異常は癌浸潤部における miRNA 異常が癌細胞ばかりでなく、癌間質においても起きていることを示しているものと思われた。これらの関係は癌浸潤部（微小環境）でみられる EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) の形成に miRNA が関与している可能性を示唆しているものと思われた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 前沢 千早 (腫瘍生物学研究部門)

副査 准教授 中村 昌太郎 (内科学講座消化器内科消化管分野)

副査 講師 上杉 憲幸 (病理診断学講座)

近年、大腸癌の浸潤や転移における miRNA の働きが注目を浴びている。しかしながら、これまで癌細胞と CAF (cancer associated fibroblast) を分離して検討した報告は極めて少ない。両者の関係性を明らかにすることで大腸癌の分子研究に新しい知見を提供することが期待される。本研究では、大腸癌浸潤部での癌腺管細胞と間質細胞の miRNA 発現異常の差異を検討した。腺管分離法を用いて採取した分離癌腺管、分離癌間質および新鮮検体から採取した組織の RNA を抽出し、real-time PCR 法を用いて 13 種類の miRNA 発現を定量した。大腸癌の癌浸潤部では癌腺管細胞だけでなく、癌間質細胞でも miRNA の発現変動が生じていた。癌腺管細胞と癌間質細胞の miRNA 発現パターンは異なっており、癌間質細胞も癌組織における miRNA の発現異常に重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究により、癌腺管細胞と癌間質細胞の miRNA 発現プロファイルを用いた大腸癌の分類は、癌細胞と癌間質との相互作用における miRNA の役割を理解する上で有用な知見である事が示された。

試験・試問の結果の要旨

研究の科学的、臨床的、社会的意義について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正はないことを確認した。

参考論文

- 1) Comprehensive molecular analysis based on somatic copy number alterations in intramucosal colorectal neoplasias and early invasive colorectal cancers (粘膜内大腸腫瘍と早期浸潤大腸癌における染色体コピー数異常に基づく包括的分子解析)。(菅井 有 他 9 名と共著)
Oncotarget, 9 巻, 33 号 (2018) : p22895-22906.
- 2) Uesugi N, Sugai T, Sugimoto R, Eizuka M, Fujita Y, Sato A, Osakabe M, Ishida K, Koeda K, Sasaki A, Matsumoto T. Clinicopathological and molecular stability and methylation analyses of gastric papillary adenocarcinoma (胃乳頭癌の臨床病理学および分子学的安定性と DNA メチル化解析) (上杉憲幸 他 10 名と共著)
Pathology, 49 巻, 6 号 (2017) : p596-603.