

総説

がんとマイクロRNA
～がんの病理診断及び治療マーカーとなりえるか?～

伊藤浩史

山口大学大学院医学系研究科分子病理学分野 (病理学第二) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : がん, マイクロRNA, 病理診断, 予後診断, 治療マーカー

和文抄録

マイクロRNA (miRNA) は約22塩基の非常に小さいnon-coding RNAで, 転写後翻訳レベルでの遺伝子発現制御を担っており, 多くの腫瘍においてその発現量の変化が報告されている。我々は, 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, 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, miR-205が扁平上皮のマーカーとして極めて有力であること, 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いることを明らかにし, 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を報告した。さらに頭頸部扁平上皮癌の有力な予後関連因子である肝細胞増殖因子(HGF)に着目し, 培養細胞系を用いてHGF刺激前後でのmiRNAの発現変化を検討し, HGFの機能発現に関わるmiRNAの同定を試みた。その結果Epithelial mesenchymal transition (EMT) 等, がんの浸潤転移に関わる機能遺伝子の発現を調節しているmiRNA (miR-200cおよびmiR-27b) を同定し, これらの機能を阻害することで頭頸部癌の進展を阻害できる可能性を示唆した。また, 前立腺癌における各Gleason分類で発現するmiRNAについても検討し, 前立腺癌におけるmiRNAの発現量は個々のGleason pattern (GP) ではなく, 全体としての

悪性度, つまりGleason score (GS) によって変化していること, 特にmiRNA-182の発現量は高リスクの癌に対して有用なマーカーとなり得ることを明らかにした。本稿ではこれら我々の研究成果を中心に, これまでに分かっているがんとmiRNAの関連性, 特に診断, 予後, 治療マーカーとしての可能性について概説する。

はじめに

近年, 分子生物学的手法や遺伝子解析技術の進歩により, 病理学の分野でも, 腫瘍での様々な遺伝子変異や異常発現, 染色体転座の結果生じる特異的融合遺伝子の検出などが広く行われており, 様々な腫瘍の病理組織診断や治療法の選択, 予後診断などに応用されつつある¹⁾。白血病, 悪性リンパ腫, 軟部腫瘍などでは, 遺伝子診断により詳細な分類がなされ, それに沿った分子標的薬の開発が進み, EBMに基づいた治療法の選択が進みつつある^{2, 3)}。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⁴⁾。また, 患者数の多い食道癌 (扁平上皮癌) や胃癌, 大腸癌 (腺癌) な

どの消化器癌や肺癌，前立腺癌などのいわゆる固形がんでは，腫瘍組織からの腫瘍細胞の分取が難しく，病理組織標本からの遺伝子診断による細分類はまだ行われておらず，手術と放射線治療，化学療法，ホルモン療法が比較的漠然と行われているのが現状である。

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いる⁵⁾。線虫ではじめて発見され，動植物に広く保存されており，現在まで300以上のmiRNAが報告されている。ひとつのmiRNAが100以上のターゲット遺伝子の発現を制御していると推測されており，組織特異的，発生段階特異的に発現し，細胞の増殖，分化，アポトーシスなどに重要な役割を果たしていると考えられている^{5, 6)}。また，様々な疾患でその発現異常が報告されており，がんにおいても，その発生，進展に強く関わる事が明らかになってきた。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も報告されており⁷⁾，がんにおけるmiRNAの網羅的解析による詳細な発現プロファイリングおよび実験的な機能解析により，がんの診断，予後予測などに役立つ可能性がある数多くのmiRNAが報告されている⁷⁻⁹⁾。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，ルーチ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。

本稿では，我々のこれまでの研究成果を中心に，これまでに分かっているがんとmiRNAの関連性，特に病理診断，予後，治療マーカーとしての可能性について概説する。

1. miRNA生成の分子メカニズム

図1のように，miRNA遺伝子の初期転写産物(Pri-miRNA)は通常の遺伝子同様RNAポリメラー

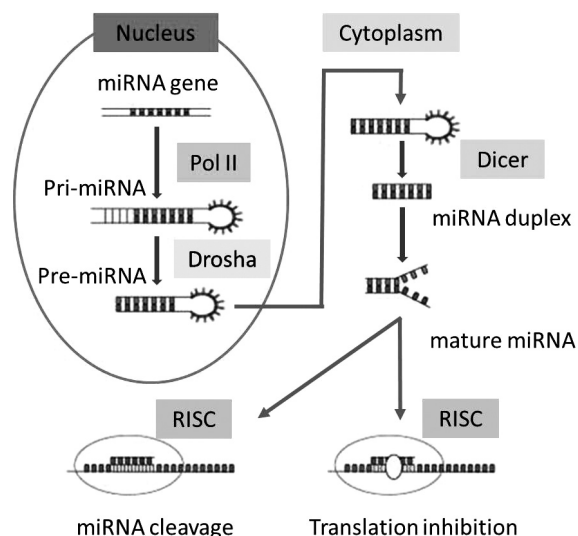


図1 miRNA生成の分子メカニズムとmRNAの翻訳阻害機構のシューマ。

ゼII (Pol II) によってゲノム上のmiRNA遺伝子から転写される。次にPri-miRNAはDroshaと呼ばれる酵素によって70塩基程度のステムループ構造を持つmiRNA前駆体 (Pre-miRNA) にプロセッシングされる。その後，Pre-miRNAは核内から細胞質に移動し，Dicerと呼ばれる酵素によって21~25塩基程度の成熟miRNAにプロセッシングされる。mRNAはRISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれ，ほとんどのmiRNAはターゲット遺伝子のmRNAの3' 非翻訳領域に部分相補的に結合し，ターゲット遺伝子の翻訳を抑制する。一方，一部のmiRNAはターゲット遺伝子mRNAの一部に完全に相補的であり，こうしたmiRNAはターゲット遺伝子の分解を引き起こす。このように，ゲノム上から発生しプロセッシングを受けたmiRNAは，細胞内においてターゲット遺伝子mRNAの抑制的調節因子として機能している^{5, 6)}。

2. miRNAのがん遺伝子，がん抑制遺伝子としての役割

前述のように，がんにおけるmiRNA発現を癌の臓器別，分化度別に詳細にプロファイリングによって検討した報告では，miRNAの発現パターンはがんの発生臓器や分化度によって著明に変化しており，従来のmRNAによるプロファイリングに比べより明確な変化があることが判明した⁷⁾。さらに，

大部分のmiRNAは正常組織に比べがん組織においてその発現が低下しており、多くのmiRNAががん抑制的に機能していることが示唆されている。実際、let-7 miRNAは肺癌において発現が低下しており、重要ながん遺伝子であるRasをターゲットにして発現抑制していることから、let-7ががん抑制遺伝子として機能していることが予想されている¹⁰⁾。またmiR-15, miR-16は慢性リンパ性白血病で発現が欠失、低下しており、抗アポトーシス因子であるBCL-2をターゲットにしていることから、やはりがん抑制的に作用していることが示唆されている¹¹⁾。

一方、一部のmiRNAは正常組織に比べがん組織においてその発現が著明に更新していると報告されている。miR-155はパーキットリンパ腫において著明に発現上昇しており、染色体13番(13q31.3)に位置しているmiR-17-92のmiRNAクラスターはc-mycによってその発現が活性化され、B細胞リンパ腫や肺癌において発現上昇していることが報告されている¹²⁾。

表1は現在までに報告されているがんにおいて発現異常の見られる主なmiRNAをまとめたものである

表1 種々のがんで発現が変化しているmiRNA

癌の種類	発現亢進	発現低下
脳腫瘍	miR-21, -221	miR-128, -181
乳癌	miR-9-1, -10b, 17-5p-21, -21, -29b2, -34, -146, -155, -181b-1, -213	let-7, miR-15a, -16, -125a, -125b, -127, -145, -204
肺癌	miR-17-5p, -17-92, -21, -24-2, -106a, -128b, -146, -150, -155, -191, -192, -197, -199a-1, -203, -205, -210, -212, -214	let-7, miR-9, -26a-1-p, -27b, -29b-2, -32, -33, -30a-5p, -95, -101-1, -124, -124a-3, -125, 125a-p, -126, -140, -143, -145, -181c-p, -198, -192-p, -199b-p, -216-p, -218-2, -219-1, -220, -224
食道癌	miR-21, -93	miR-203, -205
胃癌	miR-21, -24-1, -24-2, -25, 92-2, -107, -191, -214, -221, -223	let-7
大腸癌	miR-17-5p, -20a, -21, 24-1, 24-2, -29b-2, 30c, -31, -32, -96, -106a, -107, -128b, -135b, -155, -183, -191, -221, -223	let-7, miR-34, -127, -133b, -143, -145
肝細胞癌	miR-15b, -18a, -21, 106b, -221, -222, -224	let-7, -101, -122a, -125a, -195, -199a, -200a
膵臓癌	miR-17-5p, -20a, -21, -24-1, -24-2, -25, -29b-2, -30c, -32, 92-2, -100, -106a, -107, -128b, -135b, -146, -155, -181a, -181b-1, -191, -196a, -196b, -199a-1, -212, -214, -221, -223, -301, -376a	miR-139, -142-p, -345, -375
前立腺癌	miR-17-5p, -20a, -21, -25, -30c, -32, -92-2, -100, -106a, -146, -181b-1, -191, -199a-1, -214, -223	miR-15a, -16, -143, -145, -218-2
子宮頸癌	miR-21, -199a	miR-143, -145
白血病	miR-17-92, -155	miR-15a, -16, -143, -145, -192, -213, -220

る⁸⁻¹²⁾。このように一部のmiRNAはがん抑制遺伝子としての役割をもつことが予想されるが、一部のmiRNAはがん遺伝子としてがんの発生、進展を促進することが推測される。

3. 組織以外のmiRNA発現解析とがん診断

miRNAは血液中にcirculating miRNAとして存在していることが明らかにされ、血漿・血清中のmiRNA発現量を定量的RT-PCRで測定することができる。Mitchellらは、転移性前立腺癌患者と健常人からの血清を用いてmiRNA発現量を解析し、miR-141発現の亢進が前立腺癌患者由来の血清で有意に高いことを明らかにした¹³⁾。また、胃癌患者血清中では4つのmiRNA(miR-17-5p, -21, -106a, -106b)の発現量が健常人よりも高く、let-7aは低いことが示唆されている¹⁴⁾。

一方、がん患者の便、尿、喀痰、唾液などを用いたmiRNA発現量解析もいくつか報告されている。たとえば大腸癌患者の便ではmiR-21, miR-92a, miR-135およびmiR-17-92 clusterの発現が高いこと¹⁵⁾、肺癌患者では喀痰中のmiR-21の発現が高いことが報告されている¹⁶⁾。さらに膀胱がん患者の尿ではmiR-96とmiR-183の発現異常がみつまっている¹⁷⁾。このように健常人の血漿・血清、喀痰、尿に比べてがん患者で特異的に発現量が変化している多数のmiRNAが単離されていることから、今後miRNAはがん患者の血漿・血清、喀痰、尿などを用いたがん診断や予後予測のバイオマーカーとなることも期待されている。

4. 頭頸部癌でのmiRNA発現変化

我々は頭頸部癌培養細胞株を用いたmiRNA発現のマイクロアレイによる網羅的解析を行なった¹⁸⁾。さらに病理組織標本(ホルマリン固定パラフィンブロック)を用い、マイクロアレイ解析で候補となった5種のmiRNAについてリアルタイムPCR法で検証を行った。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。臨床材料を用いて癌部分と対照非癌部分をレー

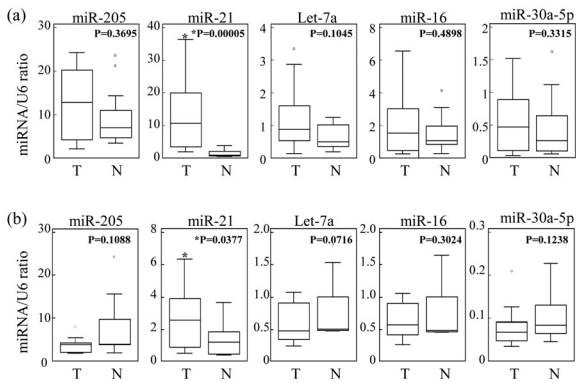


図2 頭頸部扁平上皮癌 (A. 舌癌, B. 食道癌) におけるmiRNA発現変化. T/N比とともに総発現量にも注目. (文献18より引用)

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、対照の正常扁平上皮で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。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。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2)。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。

5. 頭頸部扁平上皮癌におけるHGF刺激によるmiRNA発現変化

次に我々は頭頸部扁平上皮癌培養細胞株HSC3を用いて、肝細胞増殖因子 (HGF) 刺激前後でのHGFの機能発現に関わるmiRNAの発現変化を検討した¹⁹⁾。頭頸部扁平上皮癌細胞株HSC3をHGFで刺激すると、短時間のうちにいくつかのmiRNAの発現が変化することがマイクロRNAマイクロアレイを用いた実験から明らかとなり、これらのmiRNA

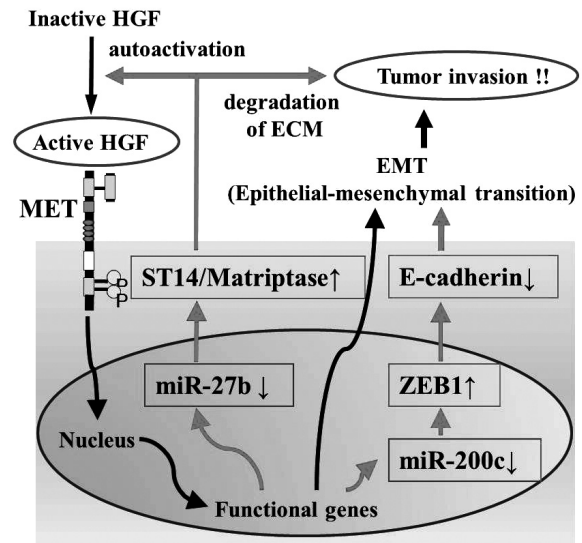


図3 頭頸部扁平上皮癌におけるHGF刺激によるmiRNA発現調節とmiRNAによるHGF機能発現のシエマ. (文献19より引用)

のうちEpithelial mesenchymal transition (EMT) 等ががんの浸潤転移に関わる機能遺伝子の発現を調節しているmiRNA (miR-200cおよびmiR-27b) に注目し、まずこの2つのmiRNAのHGF刺激前後の発現を詳細に検討した。ともにHGF刺激後短時間のうちにその発現が著明に低下し、miR-200cの標的遺伝子であるEMTに関わるZEB1遺伝子の発現増加とその下流のE-cadherinの発現低下、miR-27bの標的遺伝子である癌の浸潤やHGFの活性化に関わるST14/matrilysinの発現増加がmRNAレベル、タンパクレベルで確認できた (図3)。これらの実験結果から、頭頸部扁平上皮癌ではHGF刺激によって直接、間接的にさまざまな遺伝子発現が変化したが、その一部はmiRNAの発現を調節することによって行われていることが明らかになった。したがってこれらのmiRNAを投与することで、HGF下流遺伝子の機能が阻害され頭頸部癌の進展を阻害できる可能性が示唆された。

6. 前立腺癌におけるmiRNA発現解析

我々は前立腺癌における各Gleason分類で発現するmiRNAについても検討を行った²⁰⁾。Laser-captured Microdissection (LMD) 法を用いてホルマリン固定パラフィン標本より正常組織および癌組織をGleason pattern別に採取し、これまで前立腺

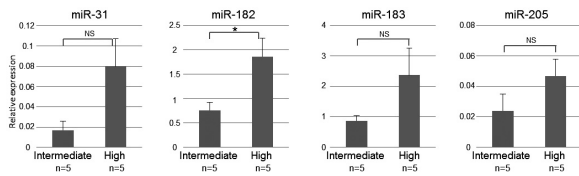


図4 前立腺癌生検標本におけるmiRNA発現の検証 (High riskおよびIntermediate risk別, *は $p<0.05$ で統計的に有意差あり). (文献20より引用)

癌で発現が変化していると報告されているmiR-31, -34c, -96, -182, -183, -205, -221, -222の発現量をreal-time RT-PCR法で定量し比較検討した。その結果、根治的前立腺摘除術の標本での検討では、miR-31, -34c, -205は正常組織に比べ癌組織で有意に低下していた。また同じGleason pattern (GP) を持つもののリスクの異なる (異なるGS) 患者間におけるmiRNA発現量の変化は、同じGleason grade 4であってもmiR-31, -182, -205ではhigh riskほど発現量が有意に多かった。そこで前立腺生検の標本を用いて検証したところ、確かにmiR-182ではhigh riskほど発現量が有意に高いことが明らかになった (図4)。すなわち、前立腺癌におけるmiRNAの発現量は、個々のGleason pattern (GP) ではなく全体としての悪性度、つまりGleason score (GS) によって変化していること、特にmiRNA-182の発現量は前立腺癌のリスクを反映しており、高リスクの癌に対して有用なマーカーとなり得ることが明らかとなった。Gleason分類に基づくmiRNA発現量を生検組織において評価することで、より正確な術前診断が可能となり、同じGP4を含む標本であってもmiRNA-182の発現量が高い時はGS7 (GP4+3 or 3+4) と診断されてもHigh risk groupである可能性を考えて術前放射線療法や術前化学療法が検討されるべきと思われた。

おわりに

がんとmiRNAに関する論文数はこの数年間で飛躍的に増加しており、臨床検体を用いたmiRNA解析により、がん特異的に異常を示すmiRNAが数多く報告されてきた^{8, 9)}。今後、従来の病理組織診断だけではなく、miRNA発現のプロファイリングを組み合わせることによって、より正確ながんの診断、治療指針や予後の判定に役立つ可能性や、miRNA

の発現調節を介した新たながんの治療法開発の可能性が考えられる。またmiRNAは病理組織標本のみならず血漿、血清、喀痰、便、尿などでも解析することが可能なので、より簡便ながん診断・治療・予後マーカーの開発も期待される。

引用文献

- 1) 安井 弥, 仙谷和弘, 大上直秀. がんの分子病理診断の現状と展望. 病理と臨床 2008 ; 26 : 660-664.
- 2) 市村浩一, 佐藤康晴, 高田尚良, 守都敏晃, 吉野 正. 悪性リンパ腫における分子病理診断の役割. 病理と臨床 2008 ; 26 : 690-700.
- 3) 長谷川匡. 軟部肉腫における分子病理診断の役割. 病理と臨床 2008 ; 26 : 701-710.
- 4) 病理診断に役立つ分子生物学. 金井弥栄, 石川俊平, 池田栄二編. 病理と臨床臨時増刊号 Vol.29. 文光堂. 東京, 2011 ; 2-37.
- 5) Lagos-Quintana, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001 ; 294 : 853-858.
- 6) Bartel DP. MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004 ; 116 : 281-297.
- 7) Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Doening JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005 ; 435 : 834-838.
- 8) Tomaru Y, Hayashizaki Y. Cancer research with non-coding RNA. *Cancer Sci* 2006 ; 97 : 1285-1290.
- 9) Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006 ; 6 : 857-866.
- 10) Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005 ; 120 : 635-647.

- 11) Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 ; **105** : 5166-5171.
- 12) He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernandez-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005 ; **435** : 828-833.
- 13) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 ; **105** : 10513-10518.
- 14) Tsuchiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010 ; **102** : 1174-1179.
- 15) Dong Y, Wu WK, Wu CW, Sung JJ, Yu J, Ng SS. MicroRNA dysregulation in colorectal cancer : a clinical perspective. *Br J Cancer* 2011 ; **104** : 893-898.
- 16) Yu L, Todd NW, Xing L, Xie Y, Zhang H, Liu Z, Fang H, Zhang J, Katz RL, Jiang F. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int J Cancer* 2010 ; **127** : 2870-2878.
- 17) Yamada Y, Enokida H, Kojima S, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Yoshino H, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma : correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci* 2011 ; **102** : 522-529.
- 18) 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* 2010 ; **23** : 1625-1633.
- 19) Susuki D, Kimura S, Naganuma S, Tsuchiyama K, Kitamura N, Fujieda S, Itoh H. Regulation of microRNA expression by hepatocyte growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2011 ; **102** : 2164-2171.
- 20) Tsuchiyama K, Ito H, Taga M, Naganuma S, Oshinoya Y, Nagano K, Yokoyama O, Itoh H. Expression of microRNAs associated with Gleason grading system in prostate cancer. *Prostate* 2013 ; **73** : 827-834.

Cancer and MicroRNA as a Diagnostic and Therapeutic Marker

Hiroshi ITOH

Department of Molecular Pathology (Pathology II.), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding small RNAs that regulate cell proliferation and functions by interfering with the translation of target mRNAs. Altered expression of miRNAs is known to induce various human malignancies. We recently reported that miR-205 might be a specific marker miRNA of both normal and malignant squamous epithelia, while miR-21 might be a putative oncogenic miRNA in human head and neck squamous cell carcinoma

(HNSCC), by miRNA microarray analysis. We next confirmed that altered expression of miR-200c and miR-27b directly regulated by hepatocyte growth factor (HGF) might contribute enhanced progressive and invasive characteristics (such as epithelial mesenchymal transition (EMT)) of HNSCC by regulating the translation of HGF-induced functional molecules. We also found that the expression of miR-182-5p depended on the cancer grade (Gleason score (GS)) even in same Gleason's pattern (GP) 4

prostate cancer, and reported that the expression of miRNA associated with Gleason's grading system may contribute to more accurate preoperative cancer risk evaluation. These results suggested the significance of miRNAs as diagnostic, prognostic and therapeutic markers. In this paper, we review the relation of cancer with miRNA expression, and discuss the possibility of miRNAs as histopathological diagnostic, prognostic and therapeutic markers.