

## 論文の内容の要旨

論文題目 肺および消化管に発生するカルチノイド腫瘍の起源・性質の解明  
～microRNA の網羅的発現解析による層別化・特徴的分子の探索

氏名 吉本 豊毅

### 要旨

#### 【背景】

近年、神経内分泌腫瘍（NET; neuroendocrine tumor）の罹患数は世界中で増加しており、疾患としての重要性が非常に高まっている。高分化型の神経内分泌腫瘍であるカルチノイドは、全身に発生しうる腫瘍で、セロトニンをはじめとする様々な生理活性物質を産生・分泌する能力をもつ。組織学的にも、リボン状・索状などの増生を示す形態学的所見と、クロモグラニン・シナプトフィジンなどの神経内分泌マーカー陽性という免疫組織化学的所見が特徴的である。

microRNA は小分子 RNA の一種であり、遺伝子発現の epigenetic な調節を通じて、発生、分化、増殖、形態形成などの生命現象に深く関与している。各種腫瘍での発現解析は現在盛んに行われているが、これまでカルチノイドと microRNA の関係を論じた報告は少ない。

#### 【目的】

本研究の目的は、肺および消化管に発生するカルチノイド腫瘍の性質を microRNA 発現の観点から捉え、各臓器の正常組織、腺癌、小細胞癌などと比較することにより、腫瘍の発生・由来および生物学的性質を明らかにすること、およびカルチノイドに特徴的な microRNA を抽出してその役割・機能を明らかにすることである。

#### 【結果】

##### ①FFPE（Formalin-fixed paraffin-embedded）検体を用いた microRNA の発現解析

本研究では、稀な腫瘍であるカルチノイドの過去の FFPE 検体が microRNA 解析に利用可能かどうか、検証するところから始めた。FFPE 検体と新鮮凍結検体との間で microarray を用いて microRNA 発現の相関を検討した。その結果、一部の microRNA で解離は見られるが、大半の microRNA では良好な相関関係を確認でき、FFPE 検体でも microRNA が保

持されていることを示した。これにより FFPE 検体を用いて検討することの妥当性が確認できた。また解離の見られた microRNA の一群を抽出し、そのうち 3 種の microRNA で qRT-PCR を行ったところ解離を確認できたため、この一群はその後のクラスター解析から除外することとした。同時に validation 目的の qRT-PCR で用いる内在性コントロールの検討・選択も行った。

## ②カルチノイド腫瘍とその他の組織のクラスター解析

次に、カルチノイド腫瘍とその他の組織のクラスター解析を、2 種の異なるアプローチを用いて行った。

4 臓器のカルチノイド腫瘍と正常組織、および肺、胃、直腸の腺癌組織について microRNA の発現パターンの比較検討を行った。階層クラスタリングを行うと、4 臓器のカルチノイドが含まれる一群と、正常組織・腺癌組織が含まれる一群にほぼ分かれた。カルチノイドの群は其中で各臓器ごとに大まかに群を形成した。正常・腺癌組織の群の中では、消化管正常組織と消化管腺癌とが、また肺正常組織と肺腺癌とが同じクラスターを形成していた。NMF consensus clustering という別のアプローチを用いると、2 群または 4 群の分割が妥当との結果であり、階層クラスタリングの分割結果とよく合致するものであった。

肺および消化管のカルチノイドは、各臓器の正常組織や腺癌よりも、他臓器に発生するカルチノイドのほうが microRNA 発現パターンが近いという結果であった。このことはカルチノイドが同じ臓器に発生する腺癌などとは全く別の性格を有する腫瘍であることを示しており、肺、胃、十二指腸、直腸の各臓器のカルチノイドが共通の発生起源をもつことを示唆する所見と考えられた。

別の検討として、肺カルチノイド、肺小細胞癌、肺正常組織、肺腺癌の症例に神経系腫瘍の嗅神経芽細胞腫と神経鞘腫を加えてクラスター解析を行った。階層クラスタリングを行ったところ、大きく 2 群に分かれた。1 群は肺カルチノイドの大半を含むグループで、もう 1 群は肺正常組織、腺癌、小細胞癌の全例を含むグループである。後者はさらに 2 群に大きく分かれており、カルチノイド少数を含む腺癌・小細胞癌の一群と、肺正常組織と神経鞘腫の一群に分割された。

カルチノイドの大半は他の肺組織と異なる一群を形成し、正常組織、腺癌とは異なる性質をもつ腫瘍であることが再確認された。また同じ神経内分泌腫瘍である小細胞癌は全例がまとまって一群を作り、その一群は腺癌などと大きなクラスターを形成したことから、肺小細胞癌は腺癌と発現パターンが近いことがわかった。

この結果は神経内分泌腫瘍の発生における 2 つの異なるプロセスの存在を示唆しており、各臓器の腫瘍から神経内分泌的性格を獲得して発生してくるものと、個々の臓器の特徴が乏しく臓器を超えた共通の性質を有して発生するものがある、とする組織発生の説を裏付けるものと考えられる。

神経芽細胞腫はカルチノイドとクラスターする症例や、腺癌などとクラスターする症例があり、大きな一群にまとまらなかった。

リンパ節転移症例、肺 *atypical carcinoid* 症例、原腸系によるカルチノイドの分類などをクラスター解析の結果と比較して検討したが、*microRNA* 発現パターンによる分割結果とは明瞭に合致しなかった。

### ③カルチノイドに特徴的な *microRNA* の同定と機能解析

各臓器間でカルチノイドと正常組織、あるいはカルチノイドと腺癌を比較し、共通して有意に発現上昇または発現低下している *microRNA* を抽出することで、カルチノイド腫瘍に共通の発現変動が見られる特徴的 *microRNA* を指摘できると仮説を立てた。統計的手法を用いて比較したところ、カルチノイドと正常組織の間で 2 臓器間以上で有意な発現差を認めた *microRNA* は 16 種類、またカルチノイドと腺癌組織の間で 2 臓器間で有意な発現差を認めたものが 6 種類であった。これらの共通項で、かつ発現量の多い *miR-7*, *miR-375* はカルチノイドに特徴的な *microRNA* であると考えられた。これらの高発現は *qRT-PCR* でも確認できた。

我々は *miR-375* に着目し、機能解析を進めた。肺カルチノイドの細胞株に高発現を示すことを確認し、これを *inhibitor* 分子を使って *knockdown* することでその機能を確認することとした。まず、*miR-375* の *knockdown* により増殖が軽度抑えられる結果が得られ、*miR-375* が増殖促進的に働いている可能性が示唆された。次に、神経内分泌形質の発現を調べたところ、そのマーカーであるクロモグラニンとシナプトフィジンは *mRNA* レベルでも蛋白レベルでも *knockdown* による効果は確認できなかった。

### 【結論】

FFPE 検体を用いてカルチノイド腫瘍を含む腫瘍・正常組織の網羅的な *microRNA* 発現解析を行った結果、肺と消化管のカルチノイドは共通の起源をもつことが示唆された。また同じ神経内分泌腫瘍の小細胞癌は、むしろ腺癌などに近い発現パターンをもち、神経内分泌腫瘍は 2 つの組織発生の経路があることが示唆された。またカルチノイドに特徴的な *microRNA* を抽出・同定し、*miR-375* は増殖促進的な機能をもつ可能性が示唆された。