

主論文の要旨

**Extracellular miRNAs as Predictive Biomarkers for
Glypican-3-Derived Peptide Vaccine Therapy Response
in Ovarian Clear Cell Carcinoma**

〔 卵巣明細胞癌に対するグリピカン3ペプチドワクチン
治療効果予測バイオマーカーの開発 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：梶山 広明 教授)

鵜飼 真由

【緒言】

卵巣癌は女性性器悪性腫瘍の中でも最も死亡者数の多い疾患で、罹患数と死亡者数は年々増加傾向にある。卵巣明細胞癌は上皮性卵巣癌の一亜型で、標準治療は手術、化学療法、分子標的薬であるが、化学療法抵抗性のため予後不良である。そのためグリピカン 3 (GPC3) ペプチドワクチンなどの免疫療法が癌治療後の生存率を延長させる効果があるとして注目されているが、治療前の効果予測バイオマーカーがないため、奏功率は限られていた。Micro RNA (miRNA) は体液中に安定して存在し、次世代シーケンサー技術革新により少量の検体からでも定量性のある網羅解析が可能で、がんの早期発見や治療効果予測のバイオマーカーとして様々な報告がなされている。本研究の目的は、GPC3 ペプチドワクチンに対する治療効果予測バイオマーカーとなる血清中 miRNA を特定することである。

【方法】

2010 年から 2016 年の間に名古屋大学医学部附属病院で実施された GPC3 ペプチドワクチンの第 2 相試験の参加者 92 例の中で、手術と術後化学療法の標準治療後に GPC3 ペプチドワクチン単独療法を受けた患者 84 例を対象とした。GPC3 ペプチドワクチン前の段階で寛解期にあった Remission 群 52 例と、進行再発の担癌状態にあった Progression 群 32 例に分けた。各々において基準を満たした Remission 群 14 例と Progression 群 10 例を更に GPC3 ペプチドワクチンの治療効果の有無で Responsive グループと Unresponsive グループに分けて検討を行った (Fig.1)。標準治療後から初回 GPC3 ペプチドワクチン接種までの間に得られた血清サンプルから miRNA シーケンスを行い (Fig.2A,3A)、両群で Responsive グループと Unresponsive グループの差である Log_2 fold change の絶対値が 1 以上の miRNA を同定し、発現量が明らかに増加した候補 miRNA を同定した。候補 miRNA の由来を調査するため、10 例の stage I 卵巣明細胞癌患者の正常卵巣組織と癌組織の miRNA と候補 miRNA を比較検討した。また miRsystem を用いて機能解析を行った。

【結果】

Remission 群では Unresponsive グループで平均年齢が低く、根治術の割合が高い傾向が見られたが、病期や化学療法レジメンでは有意差は認めなかった (Table 1)。血清 miRNA のリード数が 1 万 5 千未満の 1 例を除外した 13 例で解析を行った。ヒートマップと主成分分析の結果、両グループ間で異なるプロファイルを示した (Fig.2B,C)。両グループの miRNA を比較し Log_2 fold change の絶対値が 1 以上、すなわち fold change > 2 の miRNA 32 個と fold change < 0.5 の miRNA 45 個を同定した (Fig.2D,E)。次に Progression 群でも検証を行った。Progression 群 10 例中、ワクチンを 10 回以上接種でき腫瘍縮小効果を認めた患者 3 例を Responsive グループ、病状悪化や Performance Status 低下のため 3-5 回で治療を終了した患者 7 例を Unresponsive グループとした (Table 2, Fig.3B)。血清 miRNA のリード数が 1 万未満の 3 例を除外した 7

例で解析を行った。ヒートマップと主成分分析では **Responsive** グループのプロファイルが近く、ある程度の傾向性が示唆された (Fig.3C,D)。両グループの miRNA を比較し Log_2 fold change の絶対値が 1 以上の **Responsive** グループで上昇した 48 個、減少した 61 個の miRNA を、**Remission** 群の miRNA と照らしあわせた結果、それぞれ 8 個の miRNA が候補にあがった。バイオマーカーとしての利用を想定し、上昇した 8 個の miRNA に着目した (Fig.4A)。その中から両グループ間で明らかに発現量が分かれた miR-375-3p、miR-193a-5p、miR-1228-5p を同定した (Fig.4B,C)。これらの miRNA は高い診断精度を有し、治療効果予測バイオマーカーとして有用であることが示唆された (Fig.4D)。3 つの miRNA の由来を確認するため、卵巣明細胞癌組織と正常卵巣組織の miRNA プロファイルで検証を行った。ヒートマップと主成分分析では癌組織と正常組織では明らかに異なる miRNA プロファイルを示した (Fig.5A,B)。卵巣癌組織で有意に上昇していた miRNA と、**Remission** 群と **Progression** 群の **Responsive** グループで上昇していた miRNA を比較検討したところ、3 つの miRNA は腫瘍由来とは言えない可能性が示唆された (Fig.5C)。3 つの miRNA の機能解析では、インターフェロン (IFN) 経路が関連していた (Fig.5D)。

【考察】

本研究では、GPC3 ペプチドワクチン療法の治療効果予測バイオマーカーとして血清 miR-375-3p、miR-193a-5p、miR-1228-5p を同定し、それらが高い診断精度を有する可能性を示唆した。また 3 つの miRNA は癌組織由来ではなく、IFN 経路に関連していると考えられた。既報によると、miR-375 は頭頸部扁平上皮癌において細胞性免疫反応促進に関与し、前立腺癌、肝細胞癌、大腸癌、乳癌では治療効果予測バイオマーカーとして報告され、miR-375-3p の高値が良好な転帰と関連するとした本研究の結果と一致していた。MiR-193 ファミリーは免疫機能の制御との関連が報告されており、miR-193a-5p の上昇は前立腺癌、膀胱癌、上皮性卵巣癌で薬剤耐性の促進や予後不良因子との関連が報告されていることから、本研究においては免疫機能や化学療法抵抗性の背景を反映している可能性が示唆された。MiR-1228-5p と免疫機能との関連に関しては明らかになっていないが、肺非小細胞癌において全生存期間との関連が報告されている。本研究の限界として、患者数が限られていること、3 つの miRNA の詳細な機能解析を行っていないことがあげられる。これは GPC3 ペプチドワクチンが標準治療ではなく、第 2 相試験の限られた貴重なサンプルから得られたことに起因する。我々は以前、*ex vivo* IFN- γ ELISPOT 分析により、GPC3 ペプチドに対するワクチン誘発免疫反応を実証している。従って、3 つの miRNA は免疫細胞に由来し、患者の免疫状態を反映しているのではないかと考えられるが、これらの miRNA の起源と機能に関しては更なる研究が必要である。

【結語】

血清中 miR-375-3p、miR-193a-5p、miR-1228-5p の発現上昇は、卵巣明細胞癌患者の

GPC3 ペプチドワクチンに対する治療効果を予測できる可能性がある。更に 3 つの miRNA は、癌組織そのものに由来するものではなく、機能解析では IFN 関連経路に関連していることが示唆された。従って 3 つの miRNA バイオマーカーは、患者の免疫活性を反映している可能性があり、がんワクチンを含むすべての免疫関連治療に広く応用できると考えられる。