

主論文の要旨

**Unique miRNA profiling of squamous cell carcinoma  
arising from ovarian mature teratoma: comprehensive  
miRNA sequence analysis of its molecular background**

卵巣成熟奇形腫の悪性転化に特徴的な miRNA 発現プロファイル：  
その分子学的背景の網羅的 miRNA 解析

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：吉川 史隆 教授)

吉田 康将

## 【緒言】

卵巣成熟奇形腫は、頻度の高い卵巣腫瘍の一つであるが、その悪性転化は極めて稀な悪性腫瘍である。本疾患に対する有効な治療方法は確立されておらず、外科的切除不能な進行症例では予後不良とされている。その疾患頻度の低さにより、基礎研究はほとんど行われておらず、成熟奇形腫の悪性転化に関わる分子生物学的特徴は明らかにされていない。

マイクロ RNA(miRNA)は、約 22 塩基の非翻訳性 RNA で、伝令 RNA の発現制御を行っている。また近年では、生理活性をもつ miRNA が細胞外に放出されていることも分かっている。次世代シーケンサーの台頭により、遺伝子解析が飛躍的に進歩したことから、細胞外 miRNA のバイオマーカーとしての利用を目指した研究が注目を集めている。

本研究は、成熟奇形腫の悪性転化の病態に関わる miRNA について検討した初めての報告である。

## 【対象および方法】

2003 年から 2016 年に、当院にて初回手術を行った成熟奇形腫の悪性転化症例全 7 例を対象とした。それらの症例の手術検体のうち、癌と正常（対側卵巣）のパラフィンブロック（FFPE）組織をそれぞれ使用した。さらに、比較対象として、同時期に手術を行った 20 例の成熟奇形腫検体も使用した。組織から RNA を抽出し、miRNA ライブラリーを作成し、網羅的解析を施行した。得られたデータは、アダプタートリミングののち miRbase 21 へマッピングした。その後、RPM 補正により正規化し、解析に用いた。本疾患に特徴的な miRNA を絞り込みは、まず同一症例内で癌組織と正常組織のリード数を比較し、6 症例以上で 1000 リード以上発現変動のあった miRNA を抽出した。さらに癌組織 7 例と成熟奇形腫組織 20 例のリード数を統計学的に比較し、成熟奇形腫の悪性転化に特徴的な miRNA を同定した。

上記解析によって得られた候補 miRNA は、当教室で樹立した患者腫瘍組織移植（PDX）モデルの腫瘍および血漿、手術検体の新鮮凍結組織を用いて検証実験を行った。さらに、既存のデータベースを利用した候補 miRNA の *in silico* の機能解析を行った。

## 【結果】

FFPE 組織からの全 miRNA プロファイルに対する解析の結果、正常卵巣、成熟奇形腫組織では、それぞれ同様な miRNA 発現パターンを示したが、癌組織では症例ごとに多彩な miRNA 発現パターンを示した（Fig.1A&B）。同一症例内で癌と正常組織を比較すると、7 個の発現上昇した miRNA と 8 個の発現低下した miRNA が抽出された（Fig.2A&B）。そのうち、成熟奇形腫組織と比較した結果、癌組織で miR-151a-3p および miR-378a-3p は有意に発現上昇し（ $p=0.046$ 、 $p=0.016$ ）、miR-26a-5p および miR-99a-5p は有意に発現低下していた（ $p\leq 0.001$ 、 $p=0.008$ ）（Fig.2C）。

次に、PDX モデルを用いた検証の結果、癌組織は概ね同様の miRNA 発現パターン

を示し、成熟奇形腫や正常卵巣とは異なる傾向であった (Fig.3A)。また、FFPE の癌組織で発現変動していた 15 個の miRNA は概ね同様に発現変動していた。しかし、症例 7 の手術検体および PDX モデルにおいては、hsa-miR-151a-3p は発現上昇していなかった。さらに、症例 5 の PDX モデルの血中 miRNA は、腫瘍が触知可能となる移植後 3 から 5 週の時点で変動がみられた (Fig.3B&C)。腫瘍の増大に伴い血漿中で増加した miRNA の中には hsa-miR-151a-3p と hsa-miR-378a-3p が含まれていたが、hsa-miR-26a-5p と hsa-miR-99a-5p はいずれの時点においても検出されなかった。また、特に著明に増加していた miRNA は hsa-miR-1246 と hsa-miR-1290 であった。

In silico の解析により、発現変動していた miRNA 群は、発癌に関係する遺伝子群を標的としている可能性が示唆された (Table 1)。

### 【考察】

成熟奇形腫の悪性転化は、希少な卵巣悪性腫瘍であるため、これまで基礎的な研究はほとんどなされていない。数少ない報告によると、免疫染色にて p53 や p16-Rb 経路の異常を検出したとする報告や、ヒトパピローマウイルスの関与を示唆する報告がある。しかし、いずれの報告も小規模であり、本疾患に関わる分子生物学的な特徴はほとんど明らかにされていない。本研究は、成熟奇形腫の悪性転化に関わる miRNA について網羅的に検討した初めての報告である。

本研究では、疾患の希少さより FFPE 組織を用いて、特異的な miRNA を検索することとした。既報によると、FFPE 組織と新鮮凍結組織の miRNA 発現量はよく相関しているとされ、本研究においても正常卵巣組織はほぼ同様の miRNA 発現パターンを示すことが確認されたため、研究手法の正当性を裏付けしているといえる。

FFPE 組織を用いた検討の結果、本疾患において発現上昇している二つの miRNA (miR-151a-3p、miR-378a-3p) と、発現低下している二つの miRNA (miR-26a-5p、miR-99a-5p) を同定した。既報においては、miR-378a-3p は癌種により腫瘍促進的、抑制的の両方の機能が報告されている。miR-151a-3p は、p53 の標的の miRNA の一つとする報告がある。miR-26a-5p および 99a-5p に関しては、多くの報告で腫瘍抑制的な miRNA であると報告されている。すなわち、本疾患のように発現低下している場合は腫瘍促進的に機能し、病態に関与していることが示唆される。しかし、一般的に組織により miRNA の標的遺伝子や機能は異なるため、今後本疾患における miRNA の機能解析が極めて重要であると考えられる。

本研究では、PDX モデルを用いて検証実験を行った。PDX モデルは、遺伝子発現を含めた背景が高い類似性を持つと報告されており、幅広いがん研究において利用され、希少癌の研究にも有用とされている。本研究においては、FFPE 組織で発現変動がみられた miRNA は新鮮凍結組織でも同様に発現変動しており、これらの miRNA の疾患への関与がより示唆された。また、PDX モデルの血中においては、腫瘍の増大に伴い、hsa-miR-1246 と hsa-miR-1290 が劇的に増加していた。これらの miRNA は、マウスの相同体がないため、腫瘍由来である可能性が高い。そして、他の扁平上皮癌患者にお

いても血中に分泌されておりバイオマーカーとなるとする報告もある。また、hsa-miR-151a-3p と miR-378a-3p もマウス血中において増加しており、他癌種においてはバイオマーカーとなるとする報告もある。しかし、PDX モデルにこれらの miRNA は相同体の影響を受けている可能性は否定できない。従って、これらの miRNA が実臨床においてもバイオマーカーとなる可能性はあるが、ヒト血液サンプルを用いた検証が不可欠である。

#### **【結語】**

次世代シーケンサーを用いて、成熟奇形腫の悪性転化の病態に関わる miRNA が同定され、さらに候補の miRNA のバイオマーカーとしての可能性が示唆された。