

氏 名	丸岡 寛
(ふりがな)	(まるおか ひろし)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 87 号
学 位 審 査 年 月 日	令和 5 年 7 月 19 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Cancer-Specific miRNAs Extracted from Tissue-Exudative Extracellular Vesicles in Ovarian Clear Cell Carcinoma (卵巣明細胞癌における組織滲出性細胞外小胞から 抽出した癌特異的 miRNA の同定)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 廣瀬 善信 教授 矢野 貴人 教授 高井 真司

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs) には、miRNA、mRNA、long non-code RNA、タンパク質が含まれており、血管新生、免疫抑制、転移を含む腫瘍形成の様々な側面において、重要な役割を果たす。また、miRNA は多くの生物学的プロセスを制御しており、病的状態においては異常発現しているため、多くの疾患でバイオマーカーとしての可能性が注目されている。卵巣明細胞癌は化学療法抵抗性で、約半数は片側性の子宮付属器腫瘍として発見される。本研究では、卵巣明細胞癌における組織滲出性細胞外小胞 (Tissue-exudative Extracellular Vesicles; Te-EVs) から抽出した癌特異的 miRNA を同定することを目的とした。

《方 法》

1. 患者および組織サンプル

卵巣明細胞癌により根治術を施行した 4 症例より卵巣癌組織および対側正常卵巣組織を採取した。また、卵巣癌切除前後の血液中の EVs を比較するため卵巣明細胞癌 6 症例、コントロールとして子宮内膜異型増殖症 4 症例の血液サンプルを採取した。

2. EVs の回収および確認

組織サンプルを培養し EVs を分泌させ、超遠心法で EVs を回収した。EVs の確認には、電子顕微鏡およびウェスタンブロッティングによるタンパク質発現の解析を用いた。

3. Te-EVs から抽出した miRNA を用いたマイクロアレイによる網羅的な解析

組織サンプルから精製した EVs から total RNA を抽出した。解析には GeneChip Hybridization oven 640、GeneChip Fluidics Station 450、GeneChip miRNA 4.0 および Transcriptome Viewer ソフトウェアを使用した。それにより、Te-EVs において正常卵巣と比較し卵巣明細胞癌で高発現する miRNA を検出した。

4. 血清中の EVs から抽出した miRNA における手術前後の変化に関する比較検討

卵巣明細胞癌患者と子宮内膜異型増殖症患者の血液サンプルから精製した EVs から miRNA を抽出した。血清中の EVs から抽出した miRNA において、手術前と比較し手術後で低下しているかを RT-qPCR 法で評価した。プライマーには、Te-EVs において卵巣明細胞癌で特に高発現していた miRNA の中で特異的なプライマーを作製可能なものを選択し使用した。

《結果》

1. 患者由来培養組織からの EVs の単離

電子顕微鏡により、EVs が回収できていることを確認した。ウェスタンブロット解析により CD9、CD63 および CD81 といった EVs 特異的なタンパク質発現を確認した。

2. Te-EVs の miRNA マイクロアレイ解析

卵巣明細胞癌患者 4 症例において、同一患者の卵巣癌組織および正常卵巣組織から抽出した Te-EVs を比較した。それぞれの検体で 4603 種類の miRNA が検出された。4 症

例のそれぞれで 255 種類、342 種類、90 種類、272 種類の miRNA が正常卵巣と比較し卵巣明細胞癌で 2 倍以上高く発現していた。そのうち 37 種類の miRNA が 4 例全てで共通していた。37 種類のうち 17 種類 (miR-200c-3p、miR-200a-3p、miR-200b-3p、miR-182-5p、miR-203a、miR-200b-5p、miR-183-5p、miR-141-3p、miR-1301-3p、miR-421、miR-30a-5p、miR-30a-3p、miR-21-5p、miR-200a-5p、miR-210-3p、miR-652-3p、miR-330-3p) は正常卵巣と比較し卵巣明細胞癌で 8 倍以上過剰発現していた。

3. 手術前後の血清に含まれる EVs 中の miRNA の比較

卵巣明細胞癌患者 6 症例において、卵巣癌切除前後の血液中 EVs 内の miRNA を比較した。また、コントロールとして子宮内膜異型増殖症 4 症例の血液サンプルを用いた。前述の 17 種類の miRNA のうち、特異的なプライマーを作成可能であった 12 種類の miRNA (miR-200c-3p、miR-200a-3p、miR-200b-3p、miR-182-5p、miR-200b-5p、miR-183-5p、miR-141-3p、miR-30a-5p、miR-21-5p、miR-200a-5p、miR-210-3p、miR-652-3p) について RT-qPCR 法で評価した。卵巣明細胞癌患者の血清中 EVs では 6 種類の miRNA (miR-200c-3p、miR-200a-3p、miR-200b-3p、miR-200b-5p、miR-30a-5p、miR200a-5p) の発現が手術前と比較し手術後に有意な減少を示した。一方で子宮内膜異型増殖症患者の手術前後の血清では、EVs 中の miRNA の発現量に有意な差を認めなかった。

《結 論》

卵巣明細胞癌組織から特異的に分泌される EVs に含まれ、原発巣の摘出により血中で発現低下を認めた miRNA として、miR-200c-3p、miR-200a-3p、miR-200b-3p、miR-200b-5p、miR-30a-5p、miR200a-5p が確認された。これらの miRNA は、卵巣明細胞癌に特異的なバイオマーカーとなる可能性がある。

論文審査結果の要旨

細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs) は、miRNA、mRNA、タンパク質などを内包し運搬しており、癌細胞を含む様々な種類の細胞から放出される小胞である。また、miRNA は多くの生物学的プロセスを制御しており、病的状態においては異常発現していることが多い。卵巣明細胞癌は化学療法抵抗性で、約半数は片側性の子宮付属器腫瘍として発見される。本研究は、卵巣明細胞癌に特異的な miRNA の探索・同定を目的として実験を行った。

申請者らは、卵巣明細胞癌で根治術を施行した 4 症例より卵巣癌組織および対側正常卵巣組織を採取し、組織から EVs を分泌させ、超遠心法で回収した。EVs の確認には Western blot 法および電子顕微鏡を用いた。それぞれの EVs から RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイ解析を施行し、37 種類の miRNA が正常卵巣と比較し卵巣癌で 2 倍以上多く発現しており、中でも 17 種類は 8 倍以上過剰発現していることを確認した。また、卵巣癌切除前後の血液中の EVs を比較するため、卵巣明細胞癌 6 例、コントロールとして子宮内膜異型増殖症 4 例の血液サンプルを採取した。正常卵巣組織と比較して癌組織で特に高発現していた 17 種類の内、12 種類について特異的なプライマーを作成し手術前後の発現量の変化を RT-qPCR 法で評価した。卵巣明細胞癌患者の血清中の EVs では、6 種類の miRNA が手術前と比較し手術後に著しく減少した。一方で、子宮内膜異型増殖症患者の血清中の EVs に含まれる 12 種類の miRNA に関しては、手術前後で有意な発現量の差を認めなかった。以上により、卵巣明細胞癌に特異的な EVs 由来の miRNA として miR-200c-3p、miR-200a-3p、miR-200b-3p、miR-200b-5p、miR-30a-5p、miR200a-5p が確認された。これらの miRNA は、卵巣明細胞癌に特異的なバイオマーカーとなる可能性がある。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23, 15715.

Doi:10.3390/ijms232415715