

氏 名	前田 和也
(ふりがな)	(まえだ かずや)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 1202 号
学位審査年月日	令和2年7月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Serum exosomal microRNA-34a as a potential biomarker in epithelial ovarian cancer (上皮性卵巣癌におけるバイオマーカーとしての血清 エクソソーム中マイクロ RNA-34a)
論文審査委員	(主) 教授 廣瀬 善信 教授 高井 真司 教授 矢野 貴人

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

卵巣癌は進行癌で見つかることが多く、婦人科癌の中でも最も死亡者数が多いことが知られている。適切に治療するためには早期発見と正確な診断が肝要となり、そのために効果的かつ非侵襲的なバイオマーカーが求められている。我々はバイオマーカーとしてマイクロ RNA (miRNA) に注目した。miRNA は 18~25 塩基の小分子 RNA であり、その配列の相補性により標的となる mRNA を認識し翻訳の抑制を引き起こすことで遺伝子発現を制御している。これまでの研究で肝細胞癌において microRNA-34a (miR-34a) が c-Met の発現を抑制し、腫瘍の遊走や浸潤を制御して腫瘍の進展を抑制することが知られており、miR-34a の発現が癌の再発、転移に関連していることが明らかとなっている。細胞外において外因性 miRNA は不安定であるが、内在性 miRNA は長時間安定していると言われて

いる。そこで我々は細胞から分泌されるエクソソームに注目した。エクソソームは血清や腹水など体液に含まれている小胞で、miRNA を内包することで細胞間の情報伝達ツールとして腫瘍進展や制御に関連している。したがって、血清エクソソーム中の miRNA は、卵巣癌の浸潤・転移を予測するバイオマーカーとなる可能性がある。

今回我々は当科で治療を行った卵巣癌患者 58 名の血清から抽出されたエクソソーム中の miR-34a 値を測定し、進行期や組織型などの臨床病理学的情報との関連や既存の腫瘍マーカーである CA125 との関連について検証した。また手術組織検体や卵巣癌培養細胞株の miR-34a 値を測定し、組織型における差異についても検証した。

《方 法》

①検体の採取

大阪医科大学附属病院で 2013 年より 2017 年の間に手術加療を行った上皮性卵巣癌（漿液性癌、明細胞癌、類内膜癌、粘液性癌）の患者 58 名より卵巣癌治療前に血清を採取した。採血と下記実験はヘルシンキ宣言に従って実行され、機関の倫理委員会の承認を得た。実験は各々書面による告知に基づく同意のもとに行われた。

②血清よりエクソソームの抽出・確認

採血血清 10ml を 3000rpm で 30 分間遠心分離し不純物を除去し、 -80°C で保存した。保存血清を超遠心分離装置により 4°C にて 100000rpm で 240 分間遠心し、得られた沈殿を再懸濁後、2nm メッシュフィルターで濾過し、エクソソームを抽出した。抽出物がエクソソームであることを、電子顕微鏡による観察とウェスタンブロット法で確認した。

③エクソソームより miRNA の抽出、miR-34a の解析

採血血清より採取したエクソソームより miRVanaTM miRNA isolation kit[®] (Life Technologies 社) を用いて miRNA を抽出し、quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法を用いて miR-34a の相対的発現量を検体ごとに比較した。qRT-PCR には StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems 社) を用いた。検体ごとに miR-34a 発現量と臨床データとの関連につき解析を行った。

④卵巣癌組織からの miR-34a の抽出と解析

手術にて採取した卵巣癌組織（漿液性癌、明細胞癌、類内膜癌）から miRVana™ miRNA isolation kit®を用いて直接 miRNA を抽出した。miRNA から qRT-PCR 法を用いて miR-34a を検出し、miR-34a の相対的発現量を比較した。

⑤卵巣癌細胞株からの miR-34a の抽出と解析

卵巣癌の培養細胞株（A2780；漿液性癌、RMG-1；明細胞癌、CAOV3；粘液性癌）から miRVana™ miRNA isolation kit®を用いて miRNA を抽出した。miRNA から qRT-PCR 法を用いて miR-34a を検出し、miR-34a の相対的発現量を細胞株ごとに比較した。

《結 果》

①エキソソームの抽出確認

血清を遠心分離し不純物を除去し、超遠心分離装置を用いてエキソソームを採取した。採取サンプルを電子顕微鏡を用いて観察したところ、エキソソームに特徴的な 30-100nm からなる円形の均一な小胞の存在を確認した。さらにウェスタンブロット法を用いて採取サンプルを検証したところ、エキソソームに特異的なマーカータンパク質である CD63 の発現を確認した。以上より採取サンプルがエキソソームであることが示唆された。

②進行期および再発の有無と血清エキソソーム中 miR-34a の発現の関連

卵巣癌患者 58 名より採取した血清のエキソソーム中 miR-34a を測定し、その相対的発現量を比較した。患者のフォローアップの中間値は 52 ヶ月であり、患者平均年齢は 57.9 歳であった。卵巣癌初期癌（I-II 期）（n=25）では、進行癌（III-IV 期）（n=28）と比較し、血清エキソソーム中 miR-34a 値は有意に高値であった（ $P<0.05$ ）。またリンパ節転移のある症例（n=21）と比較し、リンパ節転移のない症例（n=37）では血清エキソソーム中 miR-34a 値は有意に高値であった（ $P<0.05$ ）。

次に血清エキソソーム中 miR-34a 値と再発との関連の有無について検討した。術後 3 年以内に再発のない症例（n=37）では、術後 3 年以内に再発のある症例（n=21）と比較し

て、血清エクソソーム中 miR-34a 値は有意に高値であった ($P<0.05$)。

③血清エクソソーム中 miR-34a と組織型との関連

血清エクソソーム中 miR-34a 値と卵巣癌の組織型および進行期に関連があるかを検討した。漿液性癌では初期癌 ($n=5$) と進行癌 ($n=17$) における血清エクソソーム中 miR-34a 値に有意差は見られなかった ($P=0.427$)。一方、非漿液性癌では初期癌 ($n=21$) は進行癌 ($n=9$) と比較し、血清エクソソーム中 miR-34a 値は有意に高値であった ($P<0.05$)。さらに、明細胞癌において初期癌 ($n=10$) は進行癌 ($n=5$) と比較し、血清エクソソーム中 miR-34a 値は有意に高値であった ($P<0.05$)。

④CA125 と血清エクソソーム中 miR-34a の相関関係

CA125 は卵巣癌におけるバイオマーカーとして、他の骨盤内腫瘍との鑑別のために広く用いられている。一方、CA125 は月経中や子宮内膜症性卵巣嚢胞など良性疾患でも上昇することが知られており、卵巣癌に特異的なマーカーにはなり得ていない。そこで我々は、血清 CA125 と血清エクソソーム中 miR-34a との相関関係について調べた (Pearson 関数)。結果、血清 CA125 値と血清エクソソーム中 miR-34a 値に有意な相関関係は見られなかった。

⑤卵巣癌組織および卵巣癌細胞株における miR-34a 発現量の比較

卵巣癌組織においては、明細胞癌での miR-34a 発現レベルが漿液性癌や類内膜癌より有意に高かった。また、卵巣癌細胞株においても HMG-1 (明細胞癌) の miR-34a 発現が A2780 (漿液性癌) や CAO3 (粘液性癌) より有意に高かった。

《結 論》

血清エクソソーム中 miR-34a は卵巣癌の初期例やリンパ節転移陰性例で有意に高値を示し、また術後無再発症例においても有意に高値を示した。このことから miR-34a は再発・転移リスクにおけるバイオマーカーとなる可能性が示唆された。現在の卵巣癌治療は、リンパ節郭清を含めた可及的腫瘍減量術と術後の抗癌化学療法が標準となっており、高侵襲的である。再発や転移リスクの低い症例を miR-34a により抽出できれば、リンパ節郭清

や抗癌剤の省略により、低侵襲な治療を選択できる可能性がある。また、既存の卵巣癌バイオマーカーである CA125 との相関関係がなかったことから、血清エクソソーム中 miR-34a は CA125 とは独立したバイオマーカーになり得ることが示唆され、相補的に診断精度を高めることが期待される。

論文審査結果の要旨

申請者は難治性卵巣癌を正確に診断し適切な治療戦略を策定するため、血清エクソソーム中マイクロ RNA-34a (miR-34a) が有用なバイオマーカーとなり得るかについて検討した。以前よりマイクロ RNA が悪性腫瘍の進展や抑制に関与していることが知られていたが、特に miR-34a が腫瘍の進展を抑制することに着目した。また、細胞外で外因性 RNA は不安定であるが、内在性 RNA は安定していることより、申請者はマイクロ RNA を内包するエクソソームにも着目した。エクソソームは血清や腹水など体液に含まれる小胞で、様々なタンパク質やマイクロ RNA を内包し、細胞間の情報伝達ツールとして腫瘍進展や制御に関連している。本研究では、患者血清よりエクソソームを抽出し、その miR-34a 量を qRT-PCR を用いて測定することで、進行期や組織型などの臨床病理学的情報との関連について検証した。また、卵巣癌手術組織検体や卵巣癌培養細胞株由来の miR-34a 発現量を測定し、組織型における差異についても検証した。

血清エクソソームの miR-34a 量を測定し卵巣癌初期癌と進行癌を比較したところ、初期癌で有意に miR-34a 値が高かった。次にリンパ節転移の有無について比較したところ、転移のない群で有意に高かった。さらに miR-34a 値が高い群では再発が有意に少なかった。これらの傾向は一般的に予後が悪いとされる明細胞癌で顕著であった。また、卵巣癌組織と卵巣癌細胞株においても、明細胞癌由来のものでの miR-34a 発現量が他組織由来のものより有意に高かった。さらに、miR-34a は既存の卵巣癌のマーカーである CA125 と相関を認めなかった。

申請者の研究により、miR-34a は再発・転移リスクにおけるバイオマーカーとして臨床応用できる可能性が示唆された。現在、卵巣癌の標準治療（リンパ節郭清を含めた可及的腫瘍減量術と術後の抗癌化学療法）は高侵襲的であるが、再発や転移リスクの少ない症例を抽出することで、リンパ節郭清や抗癌剤の省略により、低侵襲な治療を行える可能性がある。また、miR-34a は既存の卵巣癌マーカーである CA125 とは独立した卵巣癌バイオマーカーとして、相補的に診断精度を高めることが期待される。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2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)

Journal of ovarian research 13(1): 47, 2020 Apr

doi: 10.1186/s13048-020-00648-1