

氏 名	中村 奈津穂
(ふりがな)	(なかむら なつほ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1169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1項該当
学位論文題名	The differential expression of miRNAs between ovarian endometrioma and endometriosis-associated ovarian cancer (子宮内膜症性卵巣嚢胞と子宮内膜症関連卵巣癌の miRNA 発現解析)
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》

子宮内膜症から卵巣癌が発生することは、近年よく知られるようになってきたが、卵巣癌の発生母地としての子宮内膜症がどのような性格をもっており、どのようにして癌が発生するのかといったメカニズムに関しては、まだ明らかではない。

一方で、microRNA (miRNA) が介する転写後発現調節は、癌において細胞増殖および細胞分化、アポトーシスなどを制御していることが知られている。卵巣癌においては近年 miR-141、miR-200a、miR-200c の発現が有意に上昇しているなどの報告があるが、その機能は不明である。また、子宮内膜症でも miRNA が疾患の潜在的なバイオマーカーであることが示されている。例えば、miR-141、miR-200a、miR-200c が子宮内膜症患者で上昇し、miR-125b-5p は子宮内膜症の診断マーカーになり、miR-125b-5p を miR-451a また

は miR-3631-5b と組み合わせることで子宮内膜症の診断率が改善することが報告されている。しかし、子宮内膜症性卵巣嚢胞と子宮内膜症関連卵巣癌に関連する miRNA の報告は少なく、子宮内膜症性卵巣嚢胞と子宮内膜症関連卵巣癌患者の血清における miRNA を比較した報告はまだない。本研究では、子宮内膜症性卵巣嚢胞と子宮内膜症関連卵巣癌患者の miRNA を比較検討することで、子宮内膜症関連卵巣癌の発生を制御している miRNA を同定することを目的とした。

## 《方 法》

### 1. 血清および腹水サンプルの採取

血清および腹水サンプルは、2016年11月から2018年9月までの間に、大阪医科大学附属病院において卵巣癌または子宮内膜症性卵巣嚢胞の外科的治療を受けた患者から採取した。卵巣癌患者においては、組織学的に同側卵巣に子宮内膜症の病巣を伴う卵巣癌があることを確認した。血清サンプルは、手術の麻酔導入時に採取し、腹水サンプルは手術開始直後に採取した。血性腹水や洗浄腹水は対象から除外し、血清および腹水サンプルは、抗凝固剤は使用せず、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。

### 2. miRNA プロファイリング、RNA 抽出と qRT-PCR

子宮内膜症関連卵巣癌および子宮内膜症性卵巣嚢胞のそれぞれの 5 症例からの血清サンプルを用いて、miRNA マイクロアレイプロファイリングを行った。miRNA マイクロアレイは GeneChip miRNA 4.0 アレイを用いて行った。

miRNA マイクロアレイで発現差を認めた miRNA をターゲット miRNA とし、血清、腹水サンプルでターゲット miRNA の発現量の測定を行った。血清、腹水サンプルから miRNA を抽出し、qRT-PCR にてターゲット miRNA の発現量を測定した。ターゲット miRNA の発現量と、臨床病理学的因子との比較を行った。

### 3. 細胞培養と miRNA 過剰発現、発現抑制実験

不死化子宮内膜症上皮細胞株 (EMOsis cc/TERT) を用いて、miR-486-5p の過剰発現、発現抑制を行った。過剰発現には Pre-miR miRNA Precursor/hsa-miR-486-5p (コントロールとして Pre-miR miRNA Precursor Negative Control) を transfection した。発現抑制には mirVana miRNA inhibitor/hsa-miR-486-5p (コントロールとして mirVana miRNA Inhibitor Negative Control) を transfection した。

Proliferation assay および Wound-healing assay では、miR-486-5p を過剰発現あるいは発現抑制した細胞株とコントロール群を比較し、増殖能、浸潤能を確認した。

## 《結 果》

1. 血清および腹水サンプルは、子宮内膜症関連卵巣癌 7 例、子宮内膜症性卵巣嚢胞 34 例の合計 41 例より採取した。子宮内膜症関連卵巣癌の病理組織の内訳は、類内膜腺癌が 4 例、明細胞腺癌が 3 例であった。年齢、腫瘍径、CA125 値、CA19-9 値は子宮内膜症性卵巣嚢胞群と比較し、子宮内膜症関連卵巣癌群において有意に高値であった。
2. miRNA マイクロアレイにより、発現差を認める 51 個の miRNA が検出された。その中から、子宮内膜症関連卵巣癌と子宮内膜症性卵巣嚢胞の 2 群間で発現量に比較的に明確な差があり、かつ解析に必要なプローブが入手可能な 5 つの miRNA (miR-92a, miR-486-5p, miR-4484, miR-6821-5p, miR-7108-5p) をターゲット miRNA とした。

miRNA マイクロアレイに提出した 10 症例 (子宮内膜症関連卵巣癌 5 例、子宮内膜症性卵巣嚢胞 5 例) を含む全症例において、血清、腹水中の 5 つのターゲット miRNA の発現量の測定を qRT-PCR にて行った。その結果、血清、腹水とも miR-486-5p の発現量は、子宮内膜症性嚢胞群より子宮内膜症関連卵巣癌群で有意に高値であった。

また、血清、腹水とも miR-486-5p 量は子宮内膜症の重症度 (rASRM score) と有意に相関していた。初発群と再発群を比較したところ、再発群で血清 miR-486-5p 量が有意に高値であった。子宮内膜症関連卵巣癌群は子宮内膜症性卵巣嚢胞群と比較し年齢、腫瘍径、CA125 値、CA19-9 値が有意に高いが、それらの項目と miR-486-5p 発現量との間に有意差は認めなかった。

3. Proliferation assay では、miR-486-5p を過剰発現させた EMOsis cc/TERT の増殖能は、コントロール群と比較し有意に高かった。一方で、発現抑制した EMOsis cc/TERT においては、コントロール群と比較し増殖能が有意に低かった。同様に、Wound healing assay では、miR-486-5p を過剰発現させた EMOsis cc/TERT の浸潤能は、コントロール群より有意に高く、発現抑制した EMOsis cc/TERT では、コントロール群より浸潤能が有意に低かった。

#### 《結 論》

miR-486-5p は、子宮内膜症関連卵巣癌の発生、および子宮内膜症の重症度を予測する非侵襲性バイオマーカーとなる可能性が示唆された。しかし、今回の検討では症例数が少なく、卵巣癌の組織別の検討や予後の検討ができていない。今後、miR-486-5p の機能解析を含めたさらなる検討が必要である。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

子宮内膜症から卵巣癌が発生するが、そのメカニズムは未だ明らかではない。一方で、microRNA (miRNA) は癌において細胞増殖および細胞分化、アポトーシスなどを制御していることが知られている。本研究は、子宮内膜症関連卵巣癌の発生のメカニズムを解明するために、子宮内膜症性嚢胞および子宮内膜症関連卵巣癌の miRNA 発現を解析し、子宮内膜症関連卵巣癌の発生を制御している miRNA を同定することを目的としたものである。

申請者は、子宮内膜症関連卵巣癌 7 例、子宮内膜症性卵巣嚢胞 34 例から手術時に血清、腹水を採取し、血清中 miRNA のマイクロアレイ発現解析から 5 つのターゲット miRNA (miR-92a, miR-486-5p, miR-4484, miR-6821-5p, miR-7108-5p) を決定した。次いで、血清、腹水中のターゲット miRNA 量の測定を qRT-PCR 法を用いて行った。その結果、血清、腹水とも、miR-486-5p 量が子宮内膜症性嚢胞群より子宮内膜症関連卵巣癌群で有意に高値であった。また、血清、腹水の miR-486-5p 量は子宮内膜症の重症度 (rASRM score) と有意に相関していた。さらに、不死化子宮内膜症上皮細胞株 (EMOsis cc/TERT) を用いて miR-486-5p の過剰発現、発現抑制を行い、増殖能、浸潤能を確認した結果、過剰発現させた細胞株では増殖能、浸潤能とも有意に上昇し、発現抑制した細胞株では増殖能、浸潤能とも有意に低下した。以上の知見は、miR-486-5p が子宮内膜症の進行や卵巣癌の発生に関与している可能性を示すものであり、それら一連の病変における miR-486-5p 発現の非侵襲的バイオマーカーとしての臨床応用も期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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)

Journal of Ovarian Research 13(1): 51, 2020 May

doi: 10.1186/s13048-020-00652-5