

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592499

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた子宮体部漿液性腺癌の網羅的トランスクリプトーム解析

研究課題名(英文)Comprehensive transcriptome analysis of uterine papillary serous carcinoma using next generation sequencer.

研究代表者

羽根田 健 (HANEDA, Ken)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：10622433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体部漿液性腺癌(UPSC)は、類内膜腺癌に比較して初期であっても筋層浸潤・リンパ節転移など伴うことが多く、婦人科悪性腫瘍の中でも極めて予後の悪い疾患の1つである。しかしながらUPSCの発生・進展のメカニズムに関してのいまだ詳細は明らかになっていないのが現状である。本研究では次世代シーケンサーおよびマイクロアレイを用いてUPSCからの網羅的なトランスクリプトーム解析を行い、組織および血清中特異的トランスクリプトームを解析することでUPSCの解明を試みた。本成果は将来のUPSCの理解と分子標的治療や新規バイオマーカー開発への応用に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Uterine papillary serous carcinoma (UPSC), unlike type I endometrial cancer, represents myometrial invasion and lymph node metastasis, even in the early stage of uterine cancer. It has been characterized by a high recurrence rate and a poor prognosis in gynecological malignant tumors. However, the occurrence and development mechanisms of UPSC are still unknown. Thus, in this study, we focused on the UPSC transcriptome. By using next-generation sequencing technology and DNA microarray technology, we attempt to analyze the specific transcriptome in tissues and serum to understand the molecular mechanisms and signaling pathways controlling the development. This study provides a perspective on the expression profile of UPSC, which will be a contribution in the molecular target therapy and a novel biomarker discovery in the future.

研究分野：産婦人科学

キーワード：漿液性子宮体がん マイクロRNA 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

がん特異的な発現を示す microRNA (miRNA) は数多く報告されているが、これらのうちの一部の miRNA は癌やその他の疾患の早期発見あるいは診断に有用であると注目を浴びている。近年、我々のグループも子宮体部漿液性腺癌 (UPSC) において、いくつかの miRNA が異常発現していることを報告している。しかしながら未だに多くの miRNA は同定されておらず、また、表現型への実際の作用機序も不明な点が多いことから、癌特異的全 RNA (mRNA, miRNA, lincRNA 等) の網羅的解析の必要性が提唱されている。子宮体部内膜癌は主に類内膜腺癌 (type1)、明細胞腺癌および漿液性腺癌 (UPSC) (type2) に分類される。UPSC は、1982 年に初めて報告されて以降、その発生・悪性化についてはほとんど解明されておらず、その他の内膜癌と比較しても浸潤・転移が著しく非常に予後が不良である。そこで、多角的な癌特異的全 RNA の網羅解析から、UPSC の発生・進展機序を解明し、バイオマーカーを同定しようとの着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 子宮体部漿液性腺癌 (UPSC) 検体の病理学的評価および RNA 抽出

婦人科病理専門医と婦人科腫瘍専門医が病理カンファレンスを行い正確な病理診断を行い、実際の臨床検体から次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンスに利用可能なクオリティーの RNA を抽出する方法の確立を目的とした。

(2) 次世代シーケンサーを用いた UPSC 患者検体のトランスクリプトーム解析

UPSC 臨床検体においての新規の癌特異的な異常を同定するため癌特異的全 RNA (mRNA, miRNA, lincRNA 全てを含む) がトランスク

リプトーム) の網羅的解析をすることを目的とした。

(3) 血清 miRNA のプロファイリング解析
血液中には安定的に miRNA を含む核酸成分が存在することが知られている。近年様々な疾患において血液中 miRNA などの核酸をすることで検出することで非侵襲的なバイオマーカーに応用できるとして注目を浴びている。そこで次世代シーケンサー解析で見出された核酸が UPSC 患者血液中に存在するか、簡易かつ高感度で解析できるマイクロアレイを用いて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 子宮体部漿液性腺癌 (UPSC) 検体の病理学的評価および RNA 抽出

データの精度は、UPSC 患者症例ごとに正確な組織型を判定する事が重要であることから婦人科病理専門医と婦人科腫瘍専門医が定期的に病理カンファレンスを行い慎重かつ正確に病理診断を行った。UPSC と診断された症例はさらに年齢、進行度、転移の有無などのパラメーターを考慮した後、症例を絞って RNA 抽出を行った。手術の際検体が摘出された後婦人科腫瘍専門医が病変部を確認、適当と思われる部分を直ちに液体窒素内で急速冷凍、次に -80℃ 冷凍庫に保存した。術後の病理カンファレンスで UPSC と確定診断された症例のみ、検体より高純度の total RNA の抽出を行った。RNA のクオリティーはバイオアナライザー (アジレント・テクノロジー社) を用いて確認した。

(2) 次世代シーケンサーを用いた UPSC 患者検体のトランスクリプトーム解析

術後の病理カンファレンスで UPSC と確定診断された症例のみ、高純度での total RNA を抽出できる方法の確立を検討した後に、次世代シーケンズ解析を行うため HiSeq (イル

ミナ社)とイオンプロトン(バイオテクノロジー社)の方式の違う両者のどちらが適しているか検討した。

(3) 血清 miRNA のプロファイリング解析
血清中 miRNA のプロファイリング解析は患者血清の5症例のプール検体を用い、子宮頸癌 CIS 患者血清を正常血清群とし発現プロファイリングを比較することで行った。miRNA 抽出はエクソソームを含む血清中の RNA 抽出法で行い高感度の miRNA 発現解析用のマイクロアレイ(東レ社、3D-Gene DNA チップ)を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 子宮体部漿液性腺癌(UPSC)検体の病理学的評価および RNA 抽出

本研究におけるデータの精度は、UPSC 患者症例ごとに正確な組織型を判定する事が重要である。当施設では婦人科病理専門医と婦人科腫瘍専門医(計 15 名以上)が定期的に病理カンファレンスを行い慎重かつ正確に病理診断を行うシステムが整っており、ここで UPSC と診断された症例はさらに年齢、進行度、転移の有無などのパラメーターを考慮した後、症例を絞って行った。手術の際検体が摘出された後婦人科腫瘍専門医が病変部を確認、適当と思われる部分を直ちに液体窒素内で急速冷凍、次に-80 冷凍庫に保存した。UPSC と確定診断された症例の検体より抽出された total RNA は RNA シークエンスに用いるクオリティを有していた(RIN>7)。

(2) 次世代シーケンサーを用いた UPSC 患者検体のトランスクリプトーム解析
当施設には HiSeq2500 と Ion Proton といった原理の異なる2台の次世代シーケンサーが既存する。一度に処理する検体数が少ない場合、Ion Proton の方がコスト面において有利

であること。また、シーケンスクオリティにも問題が無かったことから、UPSC 患者検体のトランスクリプトーム解析は Ion Proton で行うこととした。

(3) 血清 miRNA のプロファイリング解析

UPSC 患者血清から RNA 抽出を行い、それらを用いて高感度マイクロアレイによって miRNA 発現解析を行った。その結果、正常血清群の発現を対象として UPSC 患者血清において miR-3164、miR-3119、miR-96 等の発現上昇および miR-106a、miR-17、miR-130a 等の発現減少が確認された。現在各 miRNA の細胞機能の解析と共に、candidate target gene について次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を実施中である。ただし本検討では症例数が少なくプール血清であるため今後は症例数を増やし臨床病理組織学的相関や組織でのトランスクリプトームの結果などとの詳細な比較・検討を加える必要があると考える。

(4) 研究成果のまとめと今後の展望

本研究において UPSC 検体の病理学的評価および RNA 抽出を行い、2種類の次世代シーケンサーを用いて機種選定をすることができた。しかしながら UPSC は非常に稀な疾患であるため今回用いることができた症例はごく僅かであり十分な統計学的パワー(検出力)が得られなく、次世代シーケンサーで得られた Data は膨大であり現在解析進行中である。今後は早急にデータ解析を進めると同時に症例数を増やして統計学的に有意な UPSC 特異的な異常を見出すこと、またそれらが血清から検出可能かどうか検討する必要があり、結論は今後さらに詳細な解析を行った後に直ちに報告する予定である。本研究は UPSC 患者における次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析の研究

であり、今後 UPSC の発癌・進展メカニズムの解明や新規のバイオマーカー開発に重要な意義をもつ成果であったと考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Suzuki F, Nagase S, Suzuki K, Oba E, Hiroki E, Matsuda Y, Akahira J, Nishigori H, Sugiyama T, Otsuki T, Yoshinaga K, Takano T, Niikura H, Ito K, Sasano H, Yaegashi N.

Decreased Expression of 14-3-3 is Predictive of Poor Prognosis for Patients with Human Uterine Papillary Serous Carcinoma.

Tohoku J Exp Med

査読有 (2013) 231 : 193-199

[学会発表] (計 2 件)

鈴木史彦、永瀬智、佐藤いずみ、宇都宮裕貴、海法道子、徳永英樹、伊藤潔、新倉仁、高野忠夫、渡部洋、笹野公伸、八重樫伸生
ABC トランスポーターからみた子宮体部漿液性腺癌の薬剤獲得耐性メカニズム

第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

2014/4/20

鈴木史彦、永瀬智、佐藤いずみ、宇都宮裕貴、新倉仁、渡部洋、笹野公伸、八重樫伸生

子宮体部漿液性腺癌に対する miR-101 を用いた分子標的治療の可能性

第 13 回日本婦人科がん分子標的研究会

皆生グランドホテル天水 (鳥取県米子市)

2014/3/15

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

羽根田 健 (HANEDA, Ken)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号 : 10622433

(2) 研究分担者

鈴木 史彦 (SUZUKI, Fumihiko)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 20400343

鈴木 吉也 (SUZUKI, Kichiya)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授

研究者番号 : 30422116