

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790349

研究課題名(和文) 腫瘍間質及び嚢胞内容液中のマイクロRNAに着目した卵巣明細胞腺癌研究

研究課題名(英文) Role of microRNA in cystic fluid of ovarian clear cell adenocarcinoma

研究代表者

前田 大地 (Maeda, Daichi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30585500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣腫瘍の嚢胞内容液中のマイクロRNA濃度を世界に先駆けて測定した研究である。その結果、明細胞腺癌の前駆病変である内膜症性嚢胞の内容液において濃度が高かったマイクロRNAとしてmiR-21, miR-141, miR-16, miR-181a, let7aが同定された。この中でmiR-21とmiR-141は明細胞腺癌の嚢胞内容液中において内膜症性嚢胞内よりも高い濃度で分布していた。この結果から、miR-21、miR-141は明細胞腺癌の発生、進展の過程で嚢胞内に分泌されてくるマイクロRNA(明細胞マーカー)であると推定された。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in evaluating microRNAs in the cystic fluid of ovarian neoplasm. miR-21 and miR-141 were more abundant in the cystic fluid of ovarian clear cell adenocarcinoma in comparison with their precursor lesion, endometriotic cyst. This finding suggests that miR-21 and miR-141 may play a significant role in the tumorigenesis of ovarian clear cell adenocarcinoma. Furthermore, they may be useful diagnostic markers.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：卵巣明細胞腺癌 嚢胞内容液 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

### 卵巣明細胞腺癌研究の重要性：

近年の研究によって、卵巣癌はその組織型ごとに発生母地や腫瘍化に關与する遺伝子変異、有効な抗癌剤の組み合わせなどが異なることが明らかになってきた(Kuo et al., 2008)。中でも卵巣明細胞腺癌は日本人に特に多い卵巣癌の組織型で、他の組織型に比べて化学療法抵抗性で予後不良である(Sugiyama et al., 2000)ことから、その病態解明や治療法の確立は日本の婦人科腫瘍研究の重要な課題とされてきた。また、組織型特異的な治療が模索されている現状では、術前診断や病勢の把握といった観点から、卵巣癌の中でも明細胞腺癌に特異的な癌バイオマーカー(血清腫瘍マーカーなど)の同定が強く望まれている。

### 卵巣明細胞腺癌とその発生母地である内膜症性嚢胞の組織学的特徴：

明細胞腺癌は子宮内膜症、特に内膜症性嚢胞を背景として生じてくるものが大部分を占め、従ってその約80%が嚢胞状の腫瘍を形成する(Maeda et al., 2011)。内膜症との関連は漿液性腺癌や粘液性腺癌といった他の組織型ではまず見られない特徴である。内膜症性嚢胞は一層から数層の円柱上皮細胞に裏打ちされており、周囲間質にはリンパ球、組織球の浸潤やヘモジデリン沈着を認める。そして、繰り返す出血を反映して、内容液は血液成分を豊富に含む。明細胞腺癌は淡明な胞体を有する腫瘍細胞の増殖に特徴づけられる腺癌で、腫瘍の増殖、浸潤に伴って laminin 5 や type IV collagen を含む特徴的な硝子化間質が誘導されることが知られている。なお、明細胞腺癌の嚢胞内容液は血性のものが主体だが、粘液性や漿液性に近いものも多く見られる。

### 卵巣明細胞腺癌の発癌過程：

近年、PIK3CA 遺伝子や chromatin remodeling に関わる ARID1A 遺伝子の変異

が、卵巣癌の中で明細胞腺癌に高頻度に認められることが報告された(Jones et al., 2011)。また、明細胞腺癌の発生母地である内膜症性嚢胞の内容液中の鉄による酸化ストレスが腫瘍化を促進しているという仮説も唱えられている(Yamaguchi et al., 2010)。しかし、明細胞腺癌の発癌において各遺伝子変異が果たす役割の多くは未解明である。また、現状では卵巣明細胞腺癌の嚢胞内容液や内膜症性嚢胞内容液に含まれる蛋白やマイクロRNA等の分析をした報告はない。

**マイクロRNAと卵巣明細胞腺癌：**マイクロRNAは20塩基長ほどの非翻訳単鎖RNAであり、メッセンジャーRNAに対して抑制的に作用することで生体の発生分化、恒常性維持に必須である。近年、マイクロRNA研究は急速に進歩しており、とりわけ癌とマイクロRNAのかかわりは注目を集めている。卵巣癌の組織型間の比較の結果、特に明細胞腺癌において miR-30a、miR-486-5p といったマイクロRNAの発現亢進が起きていることが示されており(Wyman et al., 2009)、明細胞腺癌に特異的なマイクロRNA異常は確実に存在すると考えられる。

### 分泌型マイクロRNAと卵巣病変の嚢胞内容液を解析する意義：

マイクロRNAは、主にエクソソームとよばれる分泌顆粒に含有される形で、血液をはじめとする多くの種類の体液中に安定に存在していることが判明してきている(Fleischhacker et al., 2007)。これらのマイクロRNAは**分泌型マイクロRNA**と総称され、癌の発見、分類、診断、治療効果判定に有用な癌バイオマーカーとして注目されている。また、分泌型マイクロRNAは、種々の細胞に取り込まれ、細胞の生態に影響を及ぼすことが知られている。卵巣内膜症性嚢胞の内容液と明細胞腺癌の嚢胞内容液、それぞれに特異的に含まれる分泌型RNAを解析することで、明細胞腺癌の発生、進展に關与する分泌型マイクロRNAや血清腫瘍マーカーの候補となりうる分泌型マイクロRNAの探索が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

内膜症性嚢胞から明細胞腺癌へと悪性化する過程で、嚢胞内容液中で濃度が変化するマイクロRNAを**解析する**。代表的な卵巣良性嚢胞性病変である漿液性嚢胞腺腫を対照とし、内膜症性嚢胞のマイクロRNA発現を比較検討

することで、内膜症固有のマイクロ RNA 異常 (内膜症マーカー) を同定する。さらに、明細胞腺癌以外の卵巣癌 (漿液性腺癌など) を対照とし、明細胞腺癌のマイクロ RNA 発現を比較検討することで、明細胞型という組織型に特異的なマイクロ RNA 異常 (明細胞マーカー) を同定する。

内膜症性嚢胞と明細胞腺癌の嚢胞内容液に含まれる分泌型マイクロ RNA について、上記 3 マーカーを主軸とした幅広い解析を行うことで、卵巣明細胞腺癌の発癌に關与する分泌型マイクロ RNA と明細胞腺癌のバイオマーカーとなりうる分泌型マイクロ RNA を同定する。

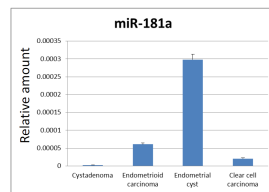
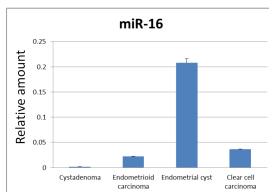
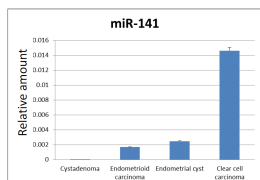
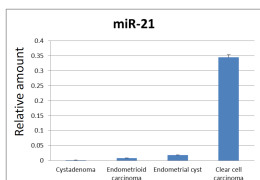
### 3. 研究の方法

外科手術によって摘出された卵巣の中で嚢胞状を呈していたものに関して小切開を加えたり、針で穿刺してその内容液を採取した。内容液に含まれる細胞成分を除く目的で、3500 回転で 5 分間×2 回遠心を行い、上清を -20 で冷凍保存した。

卵巣明細胞腺癌、類内膜腺癌、内膜症性嚢胞、漿液性嚢胞腺腫、それぞれの嚢胞内容液の蓄積が済んだ段階で、quantitative real time PCR 法を用いて主要なマイクロ RNA に関して嚢胞内容液中の濃度測定を行った。

### 4. 研究成果

対照群として設定した漿液性嚢胞腺腫と比較して内膜症性嚢胞の内容液において濃度が高かったマイクロ RNA として miR-21, miR-141, miR-16, miR-181a, let7a が同定された。これらは「内膜症マーカー」として捉えられる。この中で miR-21 と miR-141 は明細胞腺癌の嚢胞内容液中において、内膜症性嚢胞内のそれぞれ約 15 倍、7 倍の濃度で分布していた。この結果から、miR-21、miR-141 は明細胞腺癌の発生、進展の過程で嚢胞内に分泌されてくるマイクロ RNA (明細胞マーカー) であると推定された。類内膜腺癌の嚢胞内容液中には let7a が多く含まれており、類内膜腺癌のマーカーとして let7a が重要である可能性が示唆された。興味深いことに、miR181a、miR-16 は内膜症性嚢胞内に比較して明細胞腺癌、類内膜腺癌では濃度が低くなっており、悪性化に伴って分泌量が減少するマイクロ RNA と判断された。



### 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 3 件)

Wu RC, Ayhan A, Maeda D, Kim KR, Clarke BA, Shaw P, Herman Chui M, Rosen B, Shih IM, Wang TL.

Frequent somatic mutations of the telomerase reverse transcriptase promoter in ovarian clear cell carcinoma but not in other major types of gynecologic malignancies.

J Pathol. 2014 Mar;232(4):473-81.

Halimi SA, Maeda D, Shinozaki-Ushiku A, Koso T, Matsusaka K, Tanaka M, Arimoto T, Oda K, Kawana K, Yano T, Fujii T, Fukayama M.

Claudin-18 overexpression in intestinal-type mucinous borderline tumour of the ovary.

Histopathology. 2013 Oct;63(4):534-44.

Maeda D.

Pathogenesis of the Endometriosis-Related Ovarian Neoplasms

Curr Obstet Gynecol Rep (2014) 3:1-8.

[学会発表](計 3 件)

The 17th Taiwan-Japan-Korea Joint Meeting for Gynecological Pathology, October 17<sup>th</sup>, 2013, Seoul, Korea

Maeda D and Fukayama M

Slide conference, Session 2, J-2.

A case of endocervical adenocarcinoma in association with benign gastric-type glandular proliferation.

The 8<sup>th</sup> Asia Pacific IAP congress, September 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>, 2013, Busan, Korea.

Maeda D and Fukayama M.

Slide seminar

A solid and cystic ovarian mass in 33-year-old female

The 103rd USCAP annual meeting

March 5th, 2014, San Diego, USA.

[Poster presentation]

Maeda D, Mikami Y and Fukayama M.

Utility of claudin-18 immunohistochemistry for detecting benign endocervical glandular lesions exhibiting gastric differentiation (so-called lobular endocervical glandular hyperplasia)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田大地 ( Daichi Maeda )

研究者番号：30585500

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：