

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：11401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25861466
研究課題名(和文) ヒト卵巣奇形腫の発生機転とその臨床応用について

研究課題名(英文) Copy number variation analysis in mature teratoma

研究代表者
佐藤 敏治 (Sato, Toshiharu)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70636183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：奇形腫患者の配偶子の質の形態学的評価及びRNA定量は2年では検体が集まらず、施行できなかった。

奇形腫患者より摘出した標本は18症例30検体に達した。奇形腫候補遺伝子の網羅的解析として、CNV解析を行った。奇形腫に関連するDNA欠失や3コピー以上の増加は認められなかった。奇形腫にみられるほとんどのUPDは、奇形腫発生の過程である減数分裂時の異常の結果として生じることが示唆された。奇形腫の染色体はUPDの領域の割合により3タイプに分類された。この3タイプの違いと、奇形腫の再発リスクとの間に相関は認められなかった。しかし、腫瘍径と相関する傾向があり、腫瘍の発育速度にUPDが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We were not able to conduct the morphologic evaluation of the quality and mRNA analysis of the gamete of patients with ovarian teratoma because of lack of ovary and surplus egg specimens in two years.

We got the 30 ovarian teratoma specimens from 18 patients. As exhaustive analysis of the teratoma candidate gene, we conducted copy number variation (CNV) analysis. Deletion or copy number increase more than 3 copies was not found in ovarian teratoma DNA. Almost all copy number variation found in ovarian teratoma is uniparental disomy (UPD), and it seems occur as a result of abnormal meiosis that was a process of the teratoma development. The chromosomes of the teratoma were classified in three types by the ratio of region of UPD. The correlation was not found between these three types and recurrent risk of the ovarian teratoma. However, we reveal the correlation between tumor diameter and UPD type, and it was suggested that UPD was involved in the growth rate of tumor.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：ヒト卵巣奇形腫 単為発生

1. 研究開始当初の背景

ヒト奇形腫とは内胚葉・外胚葉・中胚葉の3胚葉組織の混在からなる腫瘍で、病理組織学的に良性の成熟奇形腫と悪性の未熟奇形腫とに分類される。再生医療におけるヒトiPS・ES細胞移植で発生し問題となる奇形腫は未熟奇形腫であるが、成熟奇形腫も0.2～1.4%に悪生化(Comerci et al. Obstet Gynecol 1994)をみとめ、いずれの奇形腫の発生も完全に制御しなければならない。

動物実験モデルでは、単為発生を起こした卵胞卵より奇形腫が高頻度に発生する。LT/Svとその関連種のマウスでは卵胞卵が高率に自然単為発生し、高頻度(37-52%)に卵巣奇形腫が発生することが知られている。この特性は戻し交配の研究結果から常染色体優性遺伝すると考えられている(Eppig et al. Cancer Research 1996)。一方で高率に自然単為発生しても、卵巣奇形腫を発生しない種もあることより、単為発生は奇形腫発生の最初の鍵にすぎない(Eppig et al. Cancer Research 1996)。LT/Svマウスの遺伝子マップ解析では1、6、9番染色体上の変異が単為発生に関連していると示唆されている(Lee et al. 1997, Everett et al. 2004)。吉田らは6番染色体上に、精子のもつPLCZ1(Phospholipase C zeta 1)と呼ばれる分子がコードされており、これを卵子を含む全身で発現させた遺伝子改変マウスを作成したところ、卵子が単為発生し、卵巣奇形腫を形成した。単為発生胚の着床も頻繁に起きたが、子宮内での腫瘍形成はみられなかった(Yoshida et al. Development 2007)。これらのことより、卵巣奇形腫発生には卵胞卵の単為発生に加えて、卵巣内の顆粒膜・莢膜細胞や間質細胞との相互作用が必要であることが示唆される。

一方、ヒト奇形腫は性腺(精巣、卵巣)から発生するものが多い。卵巣の成熟奇形腫細胞は二倍体で、核型は正常の46XXを示す(Ulbricht et al. Mod Pathol 2005)。分子遺伝学的検討でも卵巣の成熟奇形腫はホモ接合性であることから、正常の胚細胞に由来すると考えられており、ヒト奇形腫でも単為発生が原因と想定されている(Ulbricht et al. Adv Anat Pathol 2004)。ヒト奇形腫の原因遺伝子解析はほとんどなされていないが、ヒト胚性腫瘍(EC)細胞やES細胞では研究が多くなされている。ECまたはES細胞が奇形腫を形成するためには少なくとも2つの特性が必要である。1つ目は分化多能性である。胚において分化多能性が維持されるためには、Oct3/4、Sox2そしてNanog(Mitsui et al. Cell 2003)といった転写因子が必須である。2つ目の特性は“形質転換状態”である。初期胚において分化多能性は数日間だけしか維持できない。腫瘍を形成するためには細胞は形質転換し、分化多能性を長期間維持する必要がある。ヒト胚性幹細胞(ES)細胞はマウ

ス胎児由来の線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast: MEF)と共培養することにより分化多能性が維持される。しかしその働きをもつMEFの分泌因子はまだ特定されていない。以上のことから、ヒトにおいても、卵巣奇形腫発生には卵胞卵の単為発生に加えて、卵巣内の顆粒膜・莢膜細胞や間質細胞との相互作用が必要であることが示唆される。

2. 研究の目的

ヒトiPS細胞やヒト胚性幹(ES)細胞は疾患の治療に飛躍的な進歩をもたらす可能性を秘めているが、移植による奇形腫発生が問題となり臨床応用の壁となっている。奇形腫発生の制御のため、ヒトiPS・ES細胞の研究分野ではた奇形腫発生機転の解明が世界的に試みられている。一方でヒト奇形腫症例から奇形腫発生機序を研究した報告はほとんどない。我々はヒト卵巣奇形腫の発生の遺伝学的背景、臨床的経過(若年発症や再発症例とそれ以外)の違いを検討し、摘出標本より、原因遺伝子をDNA microarrayにて解析後、その局在を免疫染色にて確認し、形態学的所見(組織内の卵子の核相など)との関連を検討し、患者より得た新鮮卵の臨床的解析(不妊期間や単為生殖発生率など)と遺伝子解析することで、遺伝的側面と臨床的側面よりヒト奇形腫の発生機転および自然史を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

過去に秋田県内にて卵巣成熟奇形腫の診断で手術を施行され、初回手術より10年以上経過を観察できた患者を対象とする。患者を年齢ごと単発群および再発群に分類する。手術にて患者より摘出された卵巣または奇形腫標本を用い、ヒト奇形腫発生の候補遺伝子の解析をする。奇形腫患者の配偶子は、通常の臨床で行われている生殖補助技術を用い採取する。採取された配偶子は形態学的評価とRNA定量による評価を行う。

以上より蓄積された候補遺伝子の情報をもとに奇形腫発生のメカニズムに迫る。候補遺伝子の抑制または過剰発現したヒト卵子を用い、体外培養後の単為発生率を検討する。更に本研究終了後の「奇形腫形成モデルの研究」へのステップアップへ向けての下地を整える。

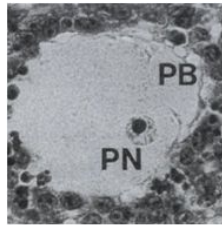
研究対象：初回手術から再手術までの平均が9年(Yoshikata et al. 2006)と報告されているため、対象は初回手術から10年、経過を観察できた症例のみとする。標本は腹腔鏡下または開腹下に摘出された卵巣より核出された腫瘍標本、正常部分も含めた全卵巣摘出標本を使用する。配偶子は当科にて体外受精用に採取された余剰卵を

用いる。

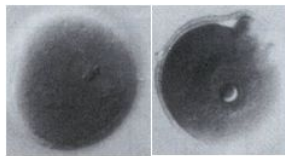
1-1: 奇形腫患者の摘出卵巣の遺伝子解析
奇形腫患者の摘出卵巣のパラフィンブロックをマイクロダイゼクションし、QIAGEN RNeasy FFPE kit にて mRNA を抽出し RT-PCR 後、DNA microarray 法にて、発症年齢、孤発群か再発群か、家族歴の有無で、それぞれの遺伝子の発現パターンの違いを検討する。再発群の症例は希少であり 5 例程度を目標とする。

1-2: 奇形腫患者の摘出卵巣における遺伝子の mRNA および蛋白の局在の検討
摘出卵巣のパラフィンブロックより組織プレパラートを作成する。mRNA の局在を確認するため、DIG にて標識した RNA プローブを用い *in situ* ハイブリダイゼーション法を行う。蛋白の発現の局在の確認には酵素抗体を用いた免疫染色を行う。それでも局在が釈然としない場合、1-1 にもどりマイクロダイゼクションした標本にて再検討する。もしくは 2-2 で得られた配偶子を標本とし蛍光抗体を用いた免疫染色を行う。

2-1: 奇形腫患者の配偶子の質の検討(形態学的評価)
摘出卵巣のパラフィンブロックより組織プレパラートを作成し、H-E 染色にて正常卵巣部分の卵胞卵の形態学的評価(右図)を行う。単為発生の所見、すなわち metaphase 期卵の増加と前核の形成(下図)が認められるか検討する。生殖補助技術にて採取した卵の、metaphase 期卵の発生頻度を形態学的に検討する。またその後の培養にて単為発生卵の発生率、受精率を検討する。

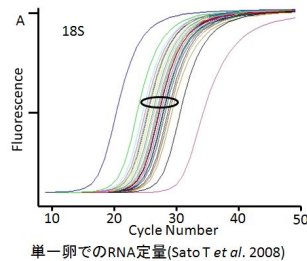


卵胞卵の単為発生
PN: 前核 PB: 極体



Metaphase II の卵胞
単為発生し前核を認める卵胞

2-2: 奇形腫患者の配偶子の質の検討 (RNA 定量)
生殖補助技術にて採取した単一卵から QIAGEN RNeasy micro Kit にて RNA を抽出し、TaqManProbe 法にて原因遺伝子の mRNA の定量を行う



単一卵でのRNA定量(Sato T et al. 2008)

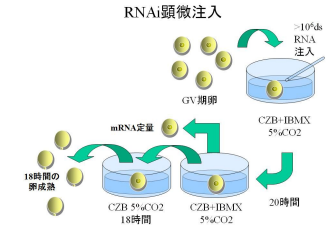
(Sato et al. Mammalian Ova Res 2008). 奇形腫患者群と正常群にて mRNA の差がないか検討する。奇形腫既往のある患者群および正常群の女性より得られた余剰卵子は、当院倫理員会で承認済の「卵巣卵子採取に関する説明と同意」を得た場合のみ使用する。

3: 候補遺伝子の抑制または活性化による奇形腫発生の検討

奇形腫発生の原因となる候補遺伝子が絞られた場合、siRNA を用いた候補遺伝子のノックダウン、またはマイクロインジェクションを用いた遺伝子の過剰発現をおこしたヒト卵子を、体外培養し単為発生率を検討する。この研究に使用する卵子は生殖補助技術にて得られた余剰卵子または、子宮体がん手術時摘出卵巣からの採取された卵子を用いる。当院倫理員会で承認済の「卵巣卵子採取に関する説明と同意」を得た患者の卵子のみを使用する。

3-1: 候補遺伝子の siRNA による抑制
siRNA を TaKaRa バイオ株式会社の合成受託にて作成する。

右図の如く候補遺伝子 siRNA のマイクロインジェクションと卵成熟を行う(右図)。その後の *In vitro* での卵子の単為発生率を形態学的に検証する。蛋白の発現は *In vitro* translation kit にて作成したそれぞれの蛋白をウェスタンブロッティングにて確認する。それぞれの抗体を用いて免疫組織化学で確認する。



3-2: 候補遺伝子の過剰発現
候補遺伝子の GFPcRNA プローブを作成し、マイクロインジェクションする。しかし、通常の胚性遺伝子の抑制や過剰発現の実験と異なることは、**未受精卵である**ということである。ほとんどの胚性遺伝子の翻訳は少なくとも受精後であるため、導入した遺伝子が未受精卵では蛋白に翻訳されない可能性がある。従って、*c-mos* などの単為発生を抑制している遺伝子・蛋白の抑制と、癌遺伝子などの過剰発現または癌抑制遺伝子の抑制の組み合わせることが、奇形腫発生に必要であると予測される。研究方法としては以下の 2 つを考えている。
a) 3-1 と 3-2 の方法を組み合わせる
b) 当教室の寺田より報告されている方法でヒト卵子の単為発生誘起を行い、3-2 を行う

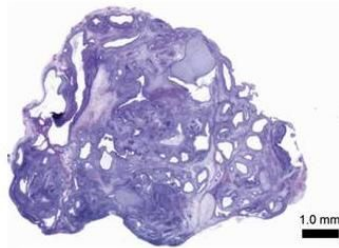
本研究ではヒト卵子を用いた研究であるため、過剰発現させるトランスジェニックの手法は使用できない。

3-3: 上記操作によるヒト奇形腫形成能の検討

上記 3-1、3-2 により操作された卵を体外培養し、単為発生率を形態学的に検討する。有意に単為発生率の増加をみとめた場合、その卵の奇形腫形成能を評価する。現在のところヒト卵子を用いた奇形腫形成モデルは存在しないため、新たな形成モデルを確立する。

in vitro におけるヒト奇形腫形成モデルの作成

現在臨床で用いられている胚の体外培養法では胚盤胞期胚までしか发育しない。単為発生した卵子が、奇形腫形成の指標である三胚葉成分への分化が確認できるまで培養系の確立が必要である。また排卵された単為発生卵は着床しても奇形腫を形成しない (Yoshida *et al.* Development 2007) ことより、卵巣小片や顆粒膜細胞・線維芽細胞などとの共培養方法を新たに確立する。

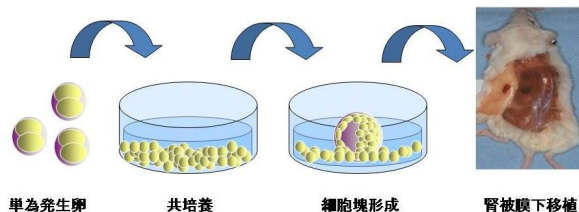


ヒトES細胞から発生した奇形腫 (M. William *et al.* 2007)

in vivo におけるヒト奇形腫形成モデルの作成

上記にて奇形腫形成した細胞塊を NOG マウスの腎被膜下に移植し (下図) 奇形腫形成能を検討する。現在のところ、胚性幹細胞の移植でも 5×10^5 の細胞が生着率を上げるために必要であるため、同等かそれ以上の細胞塊を培養し移植する予定である。

ヒト奇形腫形成モデルの作成



4. 研究成果

奇形腫患者の配偶子の質の形態学的評価および RNA 定量では、奇形腫再発群での正常卵巣の標本が、また奇形腫既往のある生殖補助医療を受けている女性の余剰卵が 2 年間では得られなかったため、今後の検討課題とする。

昨年度から今年度にかけて、奇形腫患者より摘出した標本は 18 症例 30 検体に達した。奇形腫候補遺伝子の網羅的解析として、まず CNV 解析を行った。いずれも新鮮凍結標本が採取できたため、それらより DNA を抽出後、イルミナ社の

HumanOmniExpressExome-8 アレイにて CNV 解析を行った。奇形腫の染色体はほとんど全てが Uniparental disomy (UPD) のもの、UPD をみとめないもの、いずれもみとめる混合型、の 3 タイプに分類された。奇形腫孤発群と奇形腫再発群では上記 CNV タイプとの相関は認められなかった。しかし、腫瘍径と相関する傾向があり、UPD は腫瘍の増殖能に関連することが示唆された。また同一症例より得られた複数の奇形腫でもそれぞれタイプが異なることがあり、奇形腫にみられるほとんどの UPD は、奇形腫発生の過程である減数分裂時の異常の結果として生じることが示唆された。しかし奇形腫再発群 1 例と胚細胞腫瘍合併症例にコピー数の増加領域を、また UPD をみとめないものでも、同一症例より得られた複数の奇形腫間で共通する UPD をみとめる領域があった。また CNV 以外に、メチル化・SNP・RNA の解析中である。以上より得られた候補遺伝子を、RNA 安定化保存液および凍結中の検体より mRNA を抽出し、発現量に差があるか検討する。さらに昨年度に一部の組織から消化法にて単離・培養した腫瘍細胞を用いて、候補遺伝子と細胞多能性の関係性を評価中である。

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 2 件)

*すべて査読あり

Shinizu D, Sato N, Sato T, Makino K, Kito M, Shirasawa H, Kumagai J, Terada Y (2015) Impact of adjuvant chemotherapy for stage I ovarian carcinoma with intraoperative tumor capsule rupture. *J Obstet Gynaecol Res.* 41:432-439

DOI: 10.1111/jog.12551

Sugawara T, Sato N, Shimizu D, Sato T, Makino K, Kito M, Tamura D, Kato A, Terada Y (2015) Efficient Screening strategy for Lynch syndrome in Japanese endometrial

Cancer. 235:117-125

DOI: 10.1620/tjem.235.117

〔学会発表〕(計0件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤敏治 (Sato Toshiharu)
秋田大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40636183