

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18215

研究課題名（和文）希少絨毛性疾患PSTTとETTの新規診断法および治療法の開発と悪性化機構の解明

研究課題名（英文）Development of new diagnostic and therapeutic methods and the elucidation of the mechanism of malignant transformation for rare chorionic diseases PSTT and ETT

研究代表者

茅橋 佳代（Kayahashi, Kayo）

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：80724195

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：PSTT患者から採取した腫瘍組織に対して網羅的RNA解析を行い、既存の分子標的治療薬の候補分子を同定した。一方、腫瘍組織のSingle cell全ゲノム解析を行った結果、腫瘍進展に関わるゲノム変化がいくつかピックアップされたため、同部に対するPathway解析などを通じて、癌化ならびに腫瘍進展因子を同定した。

今後、腫瘍細胞の全ゲノム解析から得られたデータから、該当遺伝子のノックアウトまたは症例と同様の変異をCRISPR/Cas9ゲノム編集法でEVT前駆細胞の細胞性栄養膜細胞をh-TERT導入で不死化したSwan71細胞に順番に導入して癌化を誘導する方針である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PSTTとETTの病他院は不明な点が多く残されており、手術以外の有効な治療法は確立していない。今回腫瘍組織のSingle cell全ゲノム解析を行った結果、腫瘍進展に関わるゲノム変化がいくつかピックアップされたため、同部に対するPathway解析などを通じて、癌化ならびに腫瘍進展因子を同定した。これらはPSTTやETTの悪性化機構の解明につながる可能性があり、学術的意義がある。

また既存の分子標的治療薬の候補分子を同定したことで、今後早期に既存の治療法を応用できる可能性があり、社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：Microarray RNA analysis was performed on PSTT tumor tissues. We were able to identify candidate molecules for existing molecular-targeted therapies. On the other hand, as a result of single cell whole genome sequence analysis of PSTT tissue, some genomic changes related to tumor progression were picked up. Furthermore, oncogenesis and tumor progression factors were identified through Bioinformatic analysis. In the future, from the data obtained from the whole genomic single cell analysis, knockout of the relevant gene or mutation similar to the case will be introduced by CRISPR / Cas9 genome editing method into immortalized EVT precursor cells in order to induce oncogenesis or tumor progression.

研究分野：産科婦人科

キーワード：PSTT ETT single cell analysis

1. 研究開始当初の背景

絨毛性疾患は胎盤の主要構成細胞である栄養膜細胞(トロホプラスト)が異常増殖をきたす疾患であり、その種類としては胎盤の絨毛を形成する合胞体・細胞性栄養膜細胞からなる胞状奇胎、侵入奇胎、および絨毛癌、ならびに絨毛外栄養膜細胞(EVT)に由来する胎盤部トロホプラスト腫瘍(PSST)と類上皮性トロホプラスト腫瘍(ETT)に分類されている。臨床的には絨毛癌と悪性の経過をとるPSST、ETTが問題となるが、大部分の腫瘍が非自己の細胞(胎児)に由来する点で一般臓器の悪性疾患と大きく異なる。また、一般的に化学療法に感受性が高いとされている絨毛癌の中に化学療法抵抗性の予後不良例があり、PSSTやETTが含まれている可能性も示唆されるなど、診断の難しさが問題となっている。

絨毛癌は分娩・流産などのあらゆる妊娠に続発し、hCGが特異的腫瘍マーカーとして臨床応用されており化学療法が著効する特徴を有する。一方でPSSTは極めて稀な絨毛性疾患であり、胎盤着床部の絨毛外栄養膜細胞(EVT)に類似した腫瘍細胞が子宮平滑筋束や平滑筋線維を押し分けるように増殖し、子宮外病変や転移を有する症例では手術療法に多剤併用化学療法を併用しても生存率は30~50%と低値である。またETTは更に稀な疾患であり、悪性の経過を辿る症例では極めて予後不良である。しかしながら世界においてもRNA発現アレイ、SNPアレイ、次世代シーケンサーでの解析や発がんに関する遺伝子変異も報告されておらず、PSSTとETTはその本質的な病態の解明がないまま有効な治療法が確立していないのが現状である。

2. 研究の目的

金沢大学附属病院でPSST症例とETT症例を研究開始前3年半の間に経験した。我々はPSSTとETTの希少性、進行例・再発例では極めて予後不良な経過を辿ることを鑑み、何れの症例も網羅的なRNA発現解析、DNA変異解析やタンパク発現解析が可能な臨床検体ライブラリを保管している。そこで腫瘍のRNA発現解析から新たな診断マーカーの提示や既存の分子標的薬剤による新しい治療法の確立、さらにDNA解析から得られた情報をもとにPSSTとETTの癌化機構を解明することを目指して本研究を申請した。

3. 研究の方法

< RNA発現解析による既存の分子標的治療の標的分子の検索と新たな治療法の提案 >

PSST患者から採取した腫瘍組織に対して網羅的RNA解析を行い、既存の分子標的治療薬の標的となる分子のRNA発現を検討する。またそれらのRNA発現をRT-PCRで確認後、候補分子を選択する。RNAの発現が確認できた分子については、病理検体を用いて抗体による免疫組織染色法にて蛋白発現とその様式を観察する。

< 腫瘍組織の網羅的DNA変異解析によるPSSTとETTの悪性化の責任遺伝子の推定と検証 >

PSSTとETTのそれぞれの組織と正常組織から抽出したDNAを次世代シーケンサーでエクソームシーケンス解析し、発がん機構や増悪機構に関わる候補となる遺伝子変異を選択する。該当遺伝子のノックアウトまたは症例と同様の変異をCRISPR/Cas9ゲノム編集法でEVT前駆細胞の細胞性栄養膜細胞をh-TERT導入で不死化したSwan71細胞(米国エール大学Gil Mor博士より供給)に順番に導入して癌化を誘導する。

一方で一般的ながん抑制遺伝子(p53, PTEN, RB, p16, MSH2, APC, TSC)あるいはがん遺伝子(Src, Myc)についても、それぞれCRISPR/Cas9を用いた欠損、または野生型あるいは遺伝子産物が持続的活性化している変異体(KrasG12D, myr-Akt)の過剰発現についても追加検討し、Swan71細胞の悪性細胞への形質転換を試みる。

4. 研究成果

< RNA発現解析による既存の分子標的治療の標的分子の検索と新たな治療法の提案 >

PSST患者から採取した腫瘍組織に対して網羅的RNA解析を行ったところ、既存の分子標的治療薬の候補分子を同定することができた。Microarrayによる網羅的RNA発現の解析データから既存の分子標的治療薬の標的となる分子のRNA発現の検討を行った。またそれらのRNA発現をRT-PCRで確認後、候補分子の選択を行った。RNA発現の確認ができた分子については、病理検体を用いて抗体による免疫組織染色法にて蛋白発現とその様式を観察したところ、いくつかの候補を得ることができた。

< 腫瘍組織の網羅的DNA変異解析によるPSSTとETTの悪性化の責任遺伝子の推定と検証 >

PSTT と **ETT** のそれぞれの組織と正常組織から抽出した **DNA** を次世代シーケンサーでエクソームシーケンス解析する計画については、半分父方由来の遺伝情報を含む特性から、通常のがん組織解析とは異なる解析の立案が必要であった。より解析精度を上げる目的で、腫瘍組織の **Single cell analysis** を目指し、条件検討を行った結果、腫瘍の **single cell isolation** に成功した。**Single cell** 全ゲノム解析を行った結果、腫瘍進展に関わるゲノム変化がいくつかピックアップされたため、同部に対する **Pathway** 解析などを通じて、癌化ならびに腫瘍進展因子を同定した。今後、腫瘍細胞の全ゲノム解析から得られたデータから、該当遺伝子のノックアウトまたは症例と同様の変異を **CRISPR/Cas9** ゲノム編集法で **EVT** 前駆細胞の細胞性栄養膜細胞を **h-TERT** 導入で不死化した **Swan71** 細胞に順番に導入して癌化を誘導する方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------