

特別講演



婦人科癌における腫瘍マーカーとしての
血清中 miRNA
Serum microRNAs as biomarkers for
gynecologic cancers

西 洋 孝
Hiroataka NISHI

東京医科大学産科婦人科学分野
Department of Obstetrics and Gynecology

【要旨】 microRNA (miRNA) は直接タンパク質をコードしない 20-25 塩基長前後の短鎖 RNA であり、標的遺伝子の 3' 非翻訳領域中の相補的配列に結合したり、直接 mRNA に結合しその翻訳を抑制することで、さまざまな生命現象を調節することが知られている。miRNA は血液中でも安定的に存在し、その発現パターンががんを含む種々の疾患で変化することが報告されており、診断・治療に関するバイオマーカーとしても有望視されている。一方、婦人科領域の主な悪性腫瘍は子宮頸癌、子宮体癌および卵巣癌であるが、子宮頸部扁平上皮癌の SCC、そして卵巣漿液性腺癌の CA125 を除き有用な腫瘍マーカーが存在しない。そこで、子宮頸癌、子宮体癌および卵巣癌患者の血液を対象に、分子生物学的手法を用いて miRNA の発現解析を行い、バイオインフォマティクスによりその標的遺伝子を探索し、これらのメカニズムや相互関係を検討することとした。まず microRNA Array を用いて miRNA 発現の網羅的解析を行い、腫瘍マーカー候補となる miRNA を同定した。これらを realtime RT-PCR 法で選別したが、in silico 解析により子宮頸癌の腫瘍マーカー候補である miR-100 が ubiquitin specific peptidase (USP) 15 を制御していると思われた。USP15 はパクリタキセルの抗がん感受性に与るが、realtime RT-PCR 法やウェスタンブロット法により、低酸素が miR-100 の発現を亢進し USP15 mRNA とタンパクの発現を抑制することを見出した。また、レポーターアッセイにより、USP15 が miR-100 の標的遺伝子であることが確認できた。低酸素により子宮頸癌の悪性度が増強されることが知られているが、低酸素による miR-100 の発現亢進が子宮頸癌におけるパクリタキセル耐性に寄与することが示された。今回見出された miRNA は、各々の腫瘍のバイオマーカーとなりうることを示され、これらの値や既存の腫瘍マーカー値を組み合わせることにより、婦人科癌の診断や治療の効果判定の一助となると思われる。

はじめに

1980年代より、がん（悪性新生物）は日本人の主な死亡原因の第1位を占め、少子高齢化とともにその割合は増加している¹⁾。近年、日本人の2人に1人ががんに罹り、3人に1人ががんで死亡しており、早期発見、早期治療の必要性が増している。今までに種々のがんにおいて、遺伝子レベルでの解析がなされ、様々な分子標的治療薬の開発が行われているが、治療成績の飛躍的向上に結びつくような鍵となる遺伝子は見つかっていない。ところで、近年ゲノム情報発現系における新たな調節・制御分子として miRNA が注目されている。miRNA は直接タンパク質をコードしない 20-25 塩基長前後の短鎖 RNA であり、標的遺伝子の 3' 非翻訳領域中の相補的配列に結合することでその発現を抑制したり、直接 mRNA に結合しその翻訳を抑制することで、さまざまな生命現象を調節することが知られている²⁾。特にがんとの関連においては、がん遺伝子を分解しがん抑制遺伝子のように働く miRNA や、逆にがん抑制遺伝子を分解しがん遺伝子のように作用する oncogenic miRNA の存在も明らかになってきた。また、従来細胞質内のみ存在すると考えられていた miRNA が、エクソソームとよばれる細胞内小器官から血液中に分泌されていることが分かってきた³⁾。一般に、血清中には RNase が存在するため、血中に入った RNA は速やかに分解されることが知られているが、この血液中の miRNA は安定的に存在し、その発現パターンががんを含む種々の疾患で変化することが報告されている。そして、miRNA はさまざまな疾患の診断・治療に関するバイオマーカーとしても有望視されている。

がんにおけるバイオマーカーは腫瘍マーカーであるが、その歴史は古く、世界で最初の腫瘍マーカーは 1948 年に骨髄腫患者の尿中から発見された「ベンスジョーンズ蛋白」である⁴⁾。1963 年には Abelev らにより肝臓癌マウスの血中から AFP が、1965 年には Gold らにより大腸癌組織から CEA が発見され、1970 年代の「モノクローナル抗体」作製技術の確立により、これら腫瘍マーカーの測定系の安定化がなされた⁵⁻⁷⁾。良い腫瘍マーカーの特徴は、特異性が高いこと、感度が良いこと、そして測定が簡便であることであり、その意義は、① がんの早期発見、② がんの治療効果判定、③ がん治療後の経過観察

(再発モニター) である。

婦人科領域の主な悪性腫瘍は子宮頸癌、子宮体癌および卵巣癌である。本研究では、これら婦人科悪性腫瘍患者の血液を対象に、分子生物学的手法を用いて miRNA の発現解析を行い、バイオインフォマティクスによりその標的遺伝子を探索し、これらのメカニズムや相互関係を検討する。そして、子宮頸癌、子宮体癌および卵巣癌の早期発見、治療効果の判定や再発診断に結びつく新しい腫瘍マーカーの開発への足がかりを追求する。

子宮頸癌と miRNA

世界的に最も頻度の高い婦人科悪性腫瘍は子宮頸癌であるが、子宮頸癌の組織型は大きく扁平上皮癌と腺癌の2種類に分類される。子宮頸部扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして SCC が知られているが、前癌病変である子宮頸部内腫瘍 (CIN) や早期子宮頸癌ではその値が上昇しない⁸⁾。SCC 値の高くない進行子宮頸癌症例も珍しくない。また、子宮頸部腺癌には特定の腫瘍マーカーが存在しない。子宮頸癌の腫瘍マーカーとなりうる miRNA を同定できれば、その早期発見に寄与できるのみならず、治療効果の判定や再発診断の重要なツールとなる。

研究方法

インフォームドコンセントを得て採取された子宮頸癌 8 例および健常者 8 例の血清から total RNA を抽出し、それらを Hy3/Hy5 の 2 色にて蛍光標識を行い、Exiqon 社の miRCURY LNA microRNA Array を用いて miRNA 発現の網羅的解析を行った。1,223 の miRNA のうち 3 倍以上の発現の差異を認めた子宮頸癌新規腫瘍マーカー候補となる miRNA は、miR-483-5p、miR-1246、miR-1275 および miR-1290 の 4 種であった。インフォームドコンセントを得て、健常群 (N 群) 34 例、子宮頸部上皮内腫瘍群 (CIN 群) 64 例、子宮頸癌群 (CC 群) 47 例から血液を採取し、total RNA を抽出後、各 miRNA の相対的発現量を realtime RT-PCR 法にて定量解析した。また、過去の文献から子宮頸癌組織における miRNA の発現量に差異のある miR-21、miR-34a、miR-100、miR-143 についても同様に realtime RT-PCR 法にて定量解析した。各 miRNA 発現量の ROC 曲線からカットオフ値を設定し、血清中の各 miRNA の発現と臨床病理学的因子および予後との関連について検討した (図 1)。

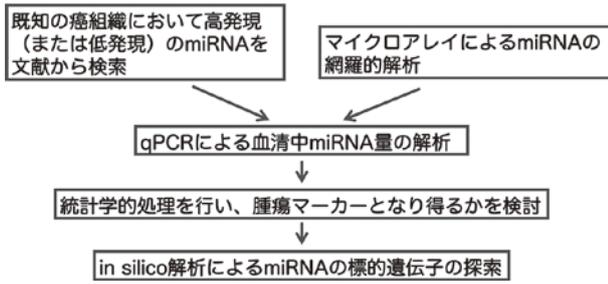


図1 研究方法のフローチャート

miR-100 について in silico 解析 (miRNA BLAST 解析) を行い、その標的遺伝子を探索し、ubiquitin specific peptidase (USP) 15 が候補として見出された。USP15 はパクリタキセル感受性遺伝子として単離され、caspase-3 の安定化に寄与することが報告されている⁹⁾。低酸素状態は、子宮頸癌の化学療法や放射線療法に対する感受性を低下させ、その悪性度を増やすことが知られているが、子宮頸癌細胞株を低酸素に暴露させ miR-100 および USP15 の発現を調べた。具体的には、子宮頸癌細胞株 HeLa を通常酸素濃度と低酸素下 (1%O₂) に 24 時間培養し、RNA およびタンパク質を抽出した。miR-100 と USP15 mRNA の発現を realtime RT-PCR 法により検討し、USP15 タンパクの発現は western blot 法にて確認した。次に、3'UTR を含む USP15 遺伝子配列をルシフェラーゼコンストラクトに組み込み、低酸素暴露および miR-100 の強制発現系の影響をルシフェラーゼアッセイにより調べた。また、miR-100 の強制発現系における HeLa に対するパクリタキセルの感受性の変化を、増殖能とアポトーシス検出をもって検討した。

成果と結論

血清中 miR-483-5p、miR-1246、miR-1275、miR-1290 の発現量は、子宮頸癌患者において有意に亢進していた (図2)。また、臨床進行期とも相関性が認められた。miR-100 の発現量は子宮頸癌患者において有意に低下しており、リンパ節転移の有無を含め臨床進行期と相関性が認められた。さらに、無増悪生存期間とも相関し、予後の予測マーカーとなる可能性が示された (図3)。特に、miR-100 は、CIN ではその発現量に変化が認められず、子宮頸癌の早期診断を可能とするバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

子宮頸癌細胞株 HeLa を低酸素に暴露させたところ、低酸素により miR-100 の発現は亢進し、USP15

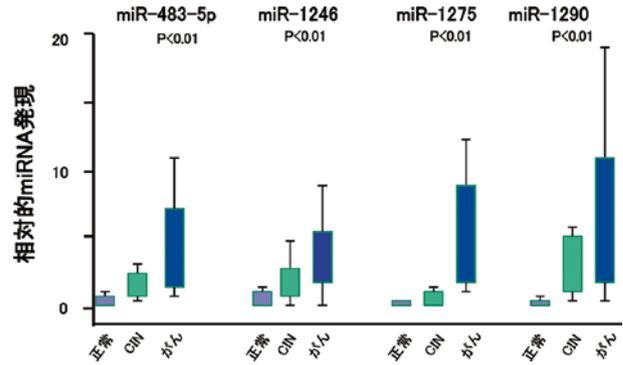


図2 子宮頸癌における各 miRNA の発現
健常者に比べ子宮頸癌において各 miRNA の発現が亢進していた。(Kruskal Wallis 検定)

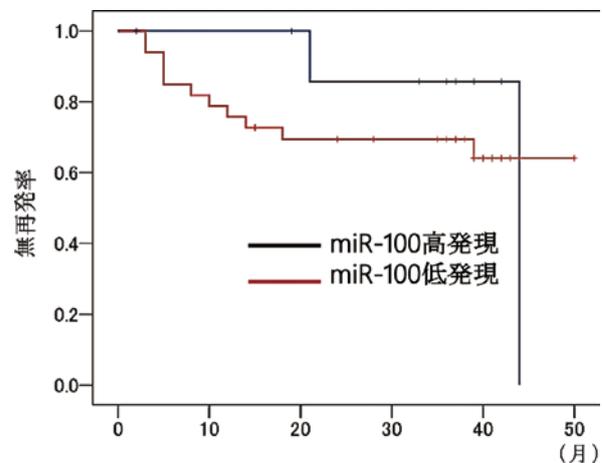


図3 miR-100 による Kaplan-Meier 生存曲線
miR-100 が低値の場合、無再発生存率が低下した。(p = 0.0396)

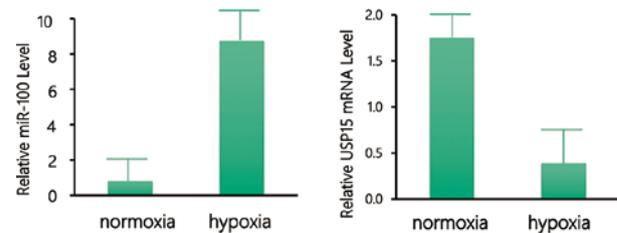


図4 低酸素が miR-100 を亢進し、USP15 の発現を抑制する
HeLa 細胞を低酸素に暴露すると、miR-100 の発現は亢進し USP15 の mRNA 発現は低下した。

mRNA とタンパクの発現は有意に減弱した (図4)。また、低酸素はルシフェラーゼ活性を抑制した (図5)。HeLa は miR-100 強制発現系ではパクリタキセルに耐性を示し、アポトーシスを抑制した (図6)。低酸素によりがんの悪性度が増強されることが知られているが、低酸素による miR-100 の発現亢進が、パクリタキセル耐性に寄与することが示された。難

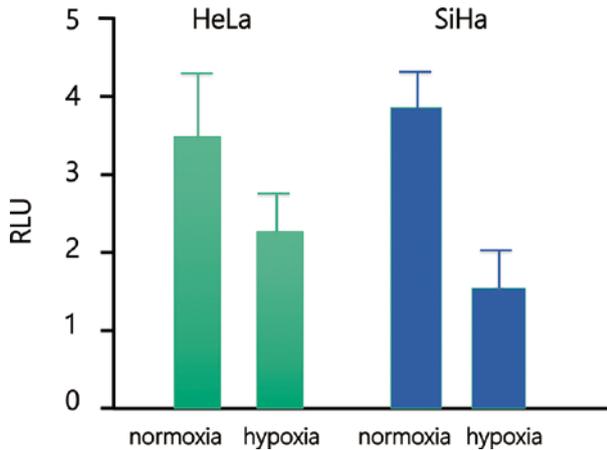


図5 低酸素がUSP15の翻訳を抑制する
HeLa細胞を低酸素に暴露するとルシフェラーゼ活性が減弱した。

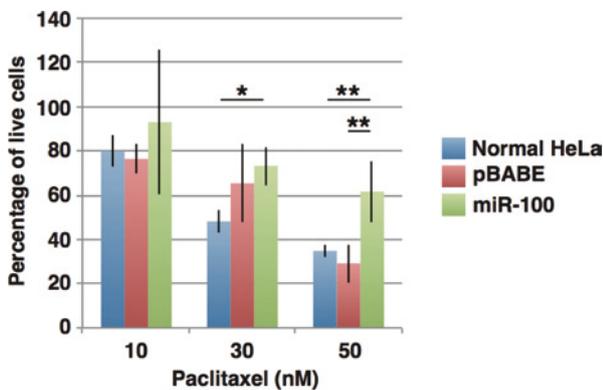


図6 miR-100がパクリタキセルに対する抵抗性を増す
HeLa細胞においてmiR-100を強制発現させると、パクリタキセルに対する感受性が低下し生存細胞が増えた。

治性のパクリタキセル耐性婦人科がんの治療に、miR-100やUSP15を用いたプレジジョン医療や分子標的治療が有用であるかもしれない。

子宮体癌と miRNA

欧米など先進国に多いとされる子宮体癌は本邦においても近年著しく増加し、年間の発症件数は子宮頸癌を越えた¹⁰⁾。子宮体癌は、早期に診断、治療が行われた場合は予後良好だが、進行例では予後は不良となる。早期診断のために子宮内膜細胞診が行われているが、陰性例の約5%に癌が検出され、陽性率も約70-80%と決して満足すべきレベルではない。臨床の現場では、子宮内膜細胞診を行う際に疼痛を伴うことや施行困難例もしばしば見られる。腫瘍マーカーとしてはCA125、CA19-9やSTNなどが用いられているものの、I期子宮体癌に対する陽

性率は各々30%以下であり、3者によるコンビネーションアッセイでも陽性率は50%程度と、スクリーニングとしての意義が乏しい状態である。そのため、より低侵襲で有効な子宮体癌の早期診断法の確立が望まれている。

研究方法

インフォームドコンセントを得て採取された子宮体癌8例および健常者8例の血清からtotal RNAを抽出し、それらをHy3/Hy5の2色にて蛍光標識を行い、Exiqon社のmiRCURY LNA microRNA Arrayを用いてmiRNA発現の網羅的解析を行った。1,223のmiRNAのうち3倍以上の発現の差異を認めた子宮体癌新規腫瘍マーカー候補となるmiRNAは、miR-633、miR-556-5p、miR-1275、miR-Plus-G1079-5pおよびmiR-4306の5種であった。インフォームドコンセントを得て、健常群(N群)14例、子宮内膜増殖症群(EH群)4例、子宮体癌群(EMC群)34例から血液を採取し、total RNAを抽出後、各miRNAの相対的発現量をrealtime RT-PCR法にて定量解析した。各miRNA発現量のROC曲線からカットオフ値を設定し、血清中の各miRNAの発現と臨床病理学的因子および予後との関連について検討した。

成果と結論

miR-633、miR-556-5p、miR-1275、miR-Plus-G1079-5pおよびmiR-4306の5種のうち、血清中miR-1275、miR-4306の発現量は、子宮体癌患者において亢進しており、また、臨床進行期と相関性が認められた(図7)。血清中のmiR-1275、miR-4306は子宮体癌のバイオマーカーになり得る。しかし、miR-1275は、子宮頸癌においてもその発現量は亢進しており、特異性が低い。

卵巣癌と miRNA

卵巣癌の腫瘍マーカーとしてCA125やHE4が用いられているが、早期診断には不向きである。これまで卵巣癌検診の手段として超音波検査や血清CA125の測定等が試みられてきたが、現在まで卵巣癌の死亡率の軽減が証明されるような有効な検診法は見出されていない¹¹⁾。また、卵巣癌の腫瘍マーカーを探索するためにさまざまな試みがなされ、多くの研究成果が発表されているが、未だCA125に優る腫瘍マーカーの発見には至っていない。上皮性卵巣癌は、主に漿液性癌・明細胞癌・類内膜癌・粘

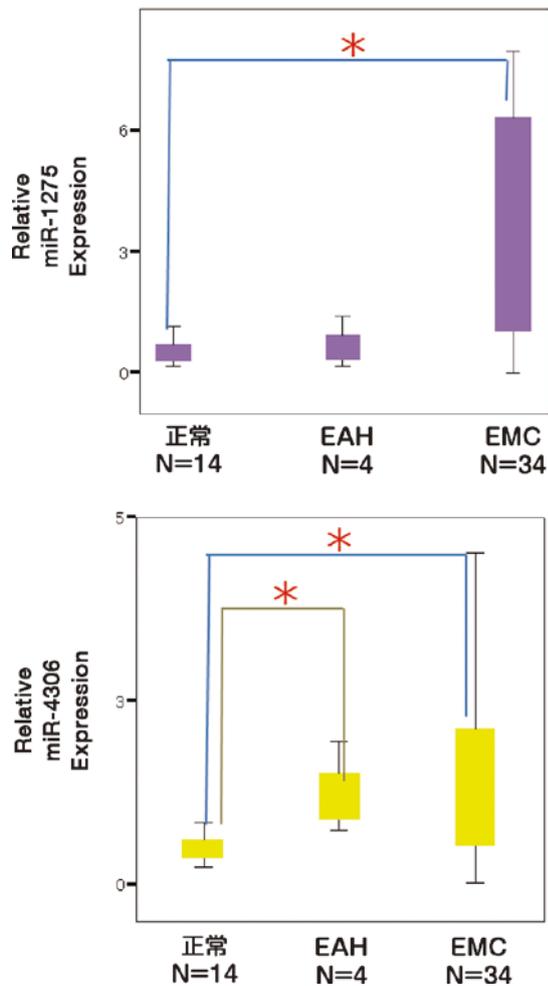


図7 子宮体癌における各 miRNA の発現
健常者に比べ子宮体癌において各 miRNA の発現が亢進していた。(*Mann-Whitney 検定: $P < 0.05$, EAH: 子宮内膜異型増殖症、EMC: 子宮体癌)

液性癌の四種の組織型に分類されるが、中でも明細胞癌は欧米に比べ本邦に多く悪性卵巣腫瘍全体の約 1/4 を占め、化学療法に対する抵抗性と再発率から悪性度の高い予後不良な疾患であると考えられている¹²⁾。CA125 は卵巣癌患者の約 8 割に陽性を示すが、中でも漿液性癌、類内膜癌で高頻度に陽性を示す。しかし、明細胞癌や粘液性癌ではあまり上昇せず、これらの早期診断は難しい。このため、予後不良であることで知られている卵巣明細胞癌に対する低侵襲で早期診断を可能にする特異的腫瘍マーカーの開発が必要であり、それを可能とする血清 miRNA の探索・同定を試みた。

見出された血清 miRNA を抽出し測定することによって、卵巣明細胞癌の診断・治療に関するバイオマーカーとなり得るか否かを検討し、早期発見、治療効果判定や再発のフォローに繋がることを期待す

る。

研究方法

インフォームドコンセントを得て採取された卵巣明細胞癌、子宮内膜症および同年代の骨盤臓器脱患者または健常者から 10 ml の末梢血液検体を採取し、total RNA を抽出した。それらを Hy3/Hy5 の 2 色にて蛍光標識を行い、Exiqon 社の miRCURY LNA microRNA Array を用いて miRNA 発現の網羅的解析を行った。この結果見出された miRNA について、realtime RT-PCR 法にて定量解析した。そのうえで、それぞれの miRNA 量を卵巣明細胞癌・子宮内膜症・正常群間で統計学的に解析し、単独ないしコンビネーションアッセイにおいて感度・特異度に優れたバイオマーカーとなるかの確認を行った。卵巣明細胞癌群で、治療によるそれぞれの血清中 miRNA 量の変化を統計学的に解析し、治療の効果判定に有用であるかを検討する。それぞれの miRNA に関し in silico 解析を行い、卵巣明細胞癌発生・進展に関わる候補標的遺伝子を探索・同定し、その相関性を分子学的手法によって解析し確認する。

成果と結論

1,223 の miRNA のうち 3 倍以上の発現の差異を認めた卵巣明細胞癌新規腫瘍マーカー候補となる miRNA は、miR-146a、miR-191、miR-484、miR-574-3p であった。in silico 解析により、miR-146a の標的遺伝子の候補として AT-rich interactive domain-containing protein (ARID1A) が見出された。ARID1A はクロマチンリモデリングに関わる遺伝子であるが、卵巣明細胞癌において高頻度に変異を生じていることが知られている¹³⁾。

本邦では卵巣明細胞癌の卵巣悪性腫瘍に占める割合が高く、発生母地として考えられている良性疾患である卵巣子宮内膜症性嚢胞との鑑別も重要と考えられる¹²⁾。子宮内膜症との鑑別が可能となれば、外科的治療ではなく薬物療法を希望する患者にとっての福音となる。

おわりに

代表的な婦人科領域の悪性腫瘍である子宮頸癌、子宮体癌および卵巣癌について、その血清中 miRNA の発現解析を行い、バイオインフォマティクスによりその標的遺伝子を探索した。それぞれの癌腫における新しい腫瘍マーカー候補としての miRNA が見出されたが、早期発見、治療効果の判

定や再発診断に結びつく腫瘍マーカー開発のために、今後も研究を重ねていきたい。

稿を終えるにあたり、共同研究者の教室の永光雄造先生、佐々木徹先生、高見澤重篤先生、徐文達氏、東京医科大学分子病理学教室の黒田雅彦教授、大野慎一郎先生、東京医科大学医学総合研究所の大屋敷純子教授、梅津知宏先生に感謝申し上げます。

文 献

- 1) <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai17/dl/h7.pdf>
- 2) Kanekura K, Nishi H, Isaka K, Kuroda M: MicroRNA and gynecologic cancers. *J Obstet Gynaecol Res* **42**: 612-617, 2016
- 3) Mori A, Nishi H, Sasaki T, Nagamitsu Y, Kawaguchi R, Okamoto A, Kuroda M, Isaka K: HLA-G expression is regulated by miR-365 in trophoblasts under hypoxic conditions. *Placenta* **45**: 37-41, 2016
- 4) Bernier GM, Putnam FW: Monomer-Dimer Forms of Bence Jones Proteins. *Nature* **200**: 223-225, 1963
- 5) Abelev GI: Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res* **14**: 295-358, 1971
- 6) Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* **122**: 467-481, 1965
- 7) Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975
- 8) Nagamitsu Y, Nishi H, Sasaki T, Takaesu Y, Terauchi F, Isaka K: Profiling analysis of circulating microRNA expression in cervical cancer. *Mol Clin Oncol* **5**: 189-194, 2016
- 9) Xu M, Takanashi M, Oikawa K, Tanaka M, Nishi H, Isaka K, Kudo M, Kuroda M: USP15 plays an essential role for caspase-3 activation during Paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **388**: 366-371, 2009
- 10) Yamagami W, Aoki D: Annual report of the Committee on Gynecologic Oncology, the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. *J Obstet Gynaecol Res* **41**: 1861-1869, 2015
- 11) Henderson JT, Webber EM, Sawaya GF: Screening for Ovarian Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* **319**: 595-606, 2018
- 12) Sugiyama T, Okamoto A, Enomoto T, Hamano T, Aotani E, Terao Y, Suzuki N, Mikami M, Yaegashi N, Kato K, Yoshikawa H, Yokoyama Y, Tanabe H, Nishino K, Nomura H, Kim JW, Kim BG, Pignata S, Alexandre J, Green J, Isonishi S, Terauchi F, Fujiwara K, Aoki D: Randomized Phase III Trial of Irinotecan Plus Cisplatin Compared With Paclitaxel Plus Carboplatin As First-Line Chemotherapy for Ovarian Clear Cell Carcinoma: JGOG3017/GCIG Trial. *J Clin Oncol* **34**: 2881-2887, 2016
- 13) Jones S, Wang TL, Shih IeM, Mao TL, Nakayama K, Roden R, Glas R, Slamon D, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Papadopoulos N: Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* **330**: 228-231, 2010