

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 蠣崎 文彦

### 学位論文題名

Studies on the role of MicroRNA-296-3p in the malignant transformation and liquid biopsy for the metastasis in head and neck cancer

(頭頸部がんにおける悪性転化に関する MicroRNA-296-3p の役割および転移に関するリキッドバイオプシーの研究)

**【全体の緒言】**頭頸部がんは最近 20 年で治療技術の向上に関わらず、生存率が著しくは向上していないのが現状である。がんでは miRNA の発現の増減や特定の遺伝子変異が確認されていることから、それらに関して頭頸部がんでも検討を施行した。

### 第一章 鼻腔内反性乳頭腫の悪性転化に関する MicroRNA-296-3p の役割

**【緒言と目的】**内反性乳頭腫(inverted papilloma:IP)は鼻副鼻腔に発生する良性腫瘍であり、その 5-15%は扁平上皮がん(Squamous cell carcinoma:SCC)に悪性転化する。IP から SCC への悪性化の過程は不明である。MicroRNA(miRNA)は 19-22 ヌクレオチドの小さなタンパクをコードしない RNA で遺伝子を制御しており、ヒトでは 1500 種類以上の miRNA が同定されており、その一部は発がんに関係すると報告されている。頭頸部領域では miRNA は SCC 組織で異常発現しており、発がんや薬剤耐性に関係するとされる。IP の悪性転化におけるメカニズムとそれに関する miRNA が制御するがん遺伝子の観点からその役割を同定することを目的とした。

**【対象と方法】**計 25 名の患者から鼻腔乳頭腫 36 検体を採取した。年齢の中央値は 64.7 歳(範囲 39-93 歳)であった。ホルマリン組織から DNA を回収しクオリティチェックを行い、754 種類の miRNA に関して Taqman アレイを用い、data assist というソフトウェアを用い解析を施行した。miRNA ミミックとインヒビターとネガティブコントロールを SCC25 細胞にトランスフェクトさせ、48 時間以上経過後回収した。タンパク濃度を標準ブラッドフォードアッセイで定量し、SDS-PAGE で分離しニトロセルロースメンブレンに移し、phosphatase and tensin homolog (PTEN), p21 と  $\beta$ -Actin でインキュベートし、その発現をウエスタンブロット法で評価した。腫瘍組織は 4-mm の厚みで薄切し、脱パラフィン化、脱水し、内在性のペルオキシダーゼ活性を抑制した。スライドをヒト PTEN と p21 の特異的モノクローナル抗体でインキュベートし、その後二次抗体でインキュベートした。ナガタ法に基づき免疫組織化学染色の評価を行った。

### 【結果】

#### 1. IP と SCC 細胞における miRNA の発現の差

IP と SCC 各 5 検体、計 10 検体から miRNA を確認した。754 種類の miRNA の解析を施行し、miR-296-3p が SCC では 23 倍の変化を示した。miR-296-3p はまた同患者の SCC と IP では 76 倍の差を示した。miRNA は様々な遺伝子を制御しており TargetsScan 6.2 を用い解析を行った結果 PTEN が miR-296-3p のターゲット遺伝子の一つであることがわかった。

#### 2. 頭頸部扁平上皮癌細胞における miR-296-3p のターゲットである PTEN 遺伝子

コンピュータ解析により PTEN 遺伝子が miR-296-3p の標的遺伝子であり、その潜在的な標的的部位である 3'非翻訳部位が明らかとなった。miR-296-3p が PTEN を陰性制御しているかに関し検討するために、頭頸部扁平上皮がん細胞株である SCC25 に miR-296-3p、コントロール、ネガティブコントロールをトランスフェクトさせた。トランスフェクト後には、PTEN 遺伝子の発現は減少した。その一方で、miR-296-3p はサイクリン依存性キナーゼである p21 を減少させなかった。

#### 3. IP と SCC における PTEN および p21 の発現と臨床病理学的特徴との相関

IP 17 検体と SCC19 検体に対し PTEN と p21 の免疫組織化学染色を施行した。IP と SCC が共存している検体は 12 検体あり、そのうち IP 部分は 11 検体を使用し、SCC 部分は 12 検体

使用した. IP 単独の検体は 6 検体, SCC 単独の検体は 7 検体であった. PTEN の発現は主に腫瘍細胞の細胞質で確認され, その陽性検体は, IP では 17 検体中 13 検体 (76.4%) であり, SCC では 19 検体中 4 検体 (21.0%) と統計学的有意差を認めた ( $p=0.0005$ ). p21 陽性検体は IP では 17 検体中 11 検体 (64.7%) であり, SCC では 19 検体中 3 検体 (26.3%) ( $p=0.0086$ ) と統計学的有意差を認めた.

#### 【考察】

悪性化の過程で miRNA の発現は変化し, miR-296-3p は PTEN の発現を減少させたが, p21 は減少させなかった. SCC では IP と比較して PTEN と p21 の発現は少なかった. miR-296-3p は PTEN 遺伝子を制御することにより悪性転化する過程において重要な役割を果たしていると考えられた. コンピュータ解析では miR-296-3p には 64 種類の標的遺伝子があることが明らかとなり, それらが IP の悪性転化における浸潤転移に関与すると考えられた. その他の miRNA の発現も悪性化の過程で変化しており, より包括的な生物学的分子的な研究が必要であると考えられた.

#### 【結論】

IP の悪性化では miRNA の発現が変化し, miR-296-3p は SCC で過剰発現し, PTEN の発現を制御していた. このことから悪性腫瘍の遺伝子変異の状況を治療に応用することが有用であり, 低侵襲の方法で確認することができれば, がん克服の一手となりうると考えられ, 第二章では血液試料から遺伝子変異を検討した.

### 第二章 固形がんにおける Liquid biopsy に関する検討

#### 【緒言と目的】

リキッドバイオプシーは血液などの液性試料を用いて, がんの診断や再発のモニタリングを行う方法である. 低侵襲で疼痛が少ないことが利点であり, Circulating tumor cells (CTC) と circulating tumor DNA (ctDNA) を対象とした. これらの非侵襲的な方法を用いて回収した DNA から腫瘍細胞の遺伝子変異を次世代シーケンサー (Next generation sequencing: NGS) を用いて解析する方法を確立することを目的とした.

#### 【対象と方法】

再発または切除不能消化管がん (大腸 11 名, 食道 8 名, 胃 1 名) と Stage III 以上の進行頭頸部がん患者 13 名の計 33 名を登録した. 年齢の中央値は 62 歳 (範囲 42–80 歳) であった. 大腸がんは事前に原発の KRAS 遺伝子変異 (codon 12, 13 の変異) を確認した. CTC は CTChip-Spiral を用い回収し, REPLI-g Single Cell Kit を用い全ゲノム増幅を行った. CTC の細胞数は免疫組織化学染色によるサイトケラチン陽性細胞でカウントした. ctDNA, 正常細胞の遺伝子の背景として buffy coat, また使用できる患者からは原発からも DNA を回収し, NGS (Ion PGM) を用いその遺伝子変異を Ion Reporter を用いて解析した.

#### 【結果】

3-133/mL の CTC が回収された. CTC は 33 検体中 10 検体で遺伝子変異を確認し, 全 38 変異中 Missense 変異が 27 検体 (71%) であった. 頭頸部がんでは 3 検体に変異を確認した. ctDNA は 33 検体中 16 検体で遺伝子変異を確認し, 全 49 変異中 Missense 変異が 36 検体 (74%), Synonymous が 11 検体 (22%), Nonsense 2 検体 (4%) であった. 最も変異が見られたのは TP53 の変異で 9 検体であった. 頭頸部がんでは 4 検体 (31%) に遺伝子変異を認めた. 大腸がんでは 3 検体 (27%) に KRAS 変異を認め, 原発と同部位の変異の検体もあれば変異が異なるものもあった.

#### 【考察】

CTC と ctDNA では遺伝子変異が異なっており, ctDNA を出しやすい腫瘍細胞と CTC の性質が異なっている可能性や回収 CTC の中に遺伝子変異が少なかった可能性が考えられた. ctDNA は CTC と比較して変異の検出率が高く, キットを用い簡便に回収できることから, 現時点では ctDNA の方が liquid biopsy としては有用であると考えられた. また, CTC ctDNA と原発では遺伝子変異が異なっていたが, 治療の介入により原発巣あるいは転移巣の遺伝子変異が変化したと考えられた.

#### 【結論】

CTChip-Spiral system を用いて, 固形がん患者より CTC, ctDNA の遺伝子変異を NGS を用いて確認した.

#### 【全体の結論】

第一章では, 良性と悪性病変の間で miRNA や PTEN 遺伝子の発現量に違いを認め, 今後は網羅的な検索が必要と考えられた.

第二章では, CTChip-Spiral® system を用いて, 固形がん患者より CTC, ctDNA の遺伝子変異を NGS を用いて確認し, 今後は臨床応用のために研究が必要と考えられた.