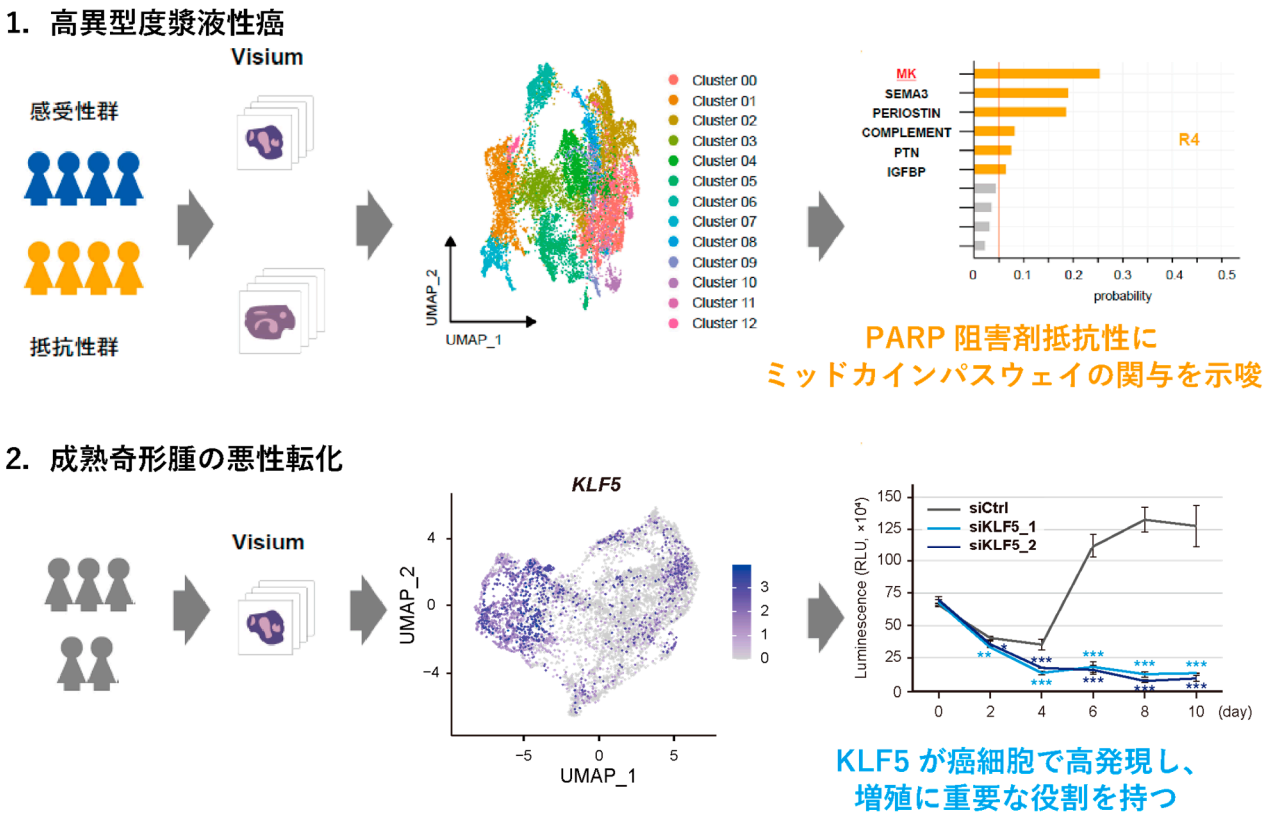
161　卵巣明細胞がんの微小環境がもたらす治療抵抗性の解明	吉田　康将

【目的】卵巣癌は、様々な組織型が知られており、異なる分子生物学的背景および臨床症状を呈する。従って、組織型毎に研究を進める必要があり、希少な組織型では十分に研究は行われていない。また、PARP 阻害剤の臨床応用により卵巣癌治療の転換点を迎えている。PARP 阻害剤により、卵巣癌全体では患者の予後改善が期待されるが、個人レベルでみると、効果不良症例も経験する。本研究においては、空間的トランスクリプトーム解析に基づいて、PARP 阻害剤抵抗性の高異型度漿液性癌と、成熟奇形腫の悪性転化の病態に迫ることを目的としている。

【方法】卵巣高異型度漿液性癌 8 症例と卵巣成熟奇形腫の悪性転化 5 例に対して、10X Genomics 社の Visium により空間的トランスクリプトーム解析を行った。卵巣高異型度漿液性癌の解析においては、PARP 阻害剤の奏功例 4 例と非奏功例 4 例で比較を行い、治療抵抗性に関わる因子を検索した。成熟奇形腫の悪性転化においては、癌細胞のみに着目した解析を行い、同定された因子に関して、当研究室で樹立した細胞株を用いて機能解析を行った。

【結果】高異型度漿液性癌の 8 例のデータを統合し、遺伝子発現をもとにしてクラスターに分類し、癌細胞を多く含むスポットと間質細胞を多く含むスポットを同定した。そして、PARP 阻害剤の関与が示唆される因子として、ミッドカインパスウェイが同定された。成熟奇形腫の悪性転化においては、癌細胞を多く含むスポットの特徴として、KLF5 が発現上昇していることが見いだされた。細胞株を用いた解析においても、KLF5 の発現抑制により、細胞増殖は著明に抑制され、アポトーシスが誘導される結果が得られた。従って、空間的トランスクリプトーム解析により、2 種類の卵巣癌における新たな知見がもたらされた。

空間的トランスクリプトーム解析に基づく病態解明



161. 卵巣がんの微小環境解析に基づく治療抵抗性の解明

吉田　康将

名古屋大学 大学院医学系研究科 産婦人科学

Key words：空間的トランスクリプトーム解析，卵巣高異型度漿液性癌，成熟奇形腫の悪性転化

緒　言

卵巣癌は、多彩な組織型を呈することが知られており、組織型毎にその分子生物学的背景は大きく異なる。従って、組織型毎に研究開発を進める必要がある。本研究においては、卵巣がんの中から、最も頻度の高い高異型度漿液性癌および成熟奇形腫の悪性転化に対して､空間的トランスクリプトーム解析による病態解明を行った。第一に、高異型度漿液性癌においては、*BRCA1* 遺伝子もしくは *BRCA2* 遺伝子の変異を特徴とする遺伝性乳がん卵巣がん症候群が注目を集め、*BRCA1/2* 遺伝子変異やそれに伴う相同組換修復欠損（HRD）を有する卵巣がんに対して、PARP 阻害剤（オラパリブ、ニラパリブ）が承認された。PARP 阻害剤の臨床応用により卵巣がん治療は大きな転換点を迎えているが、PARP 阻害剤の臨床応用から 5 年以上が経過し、PARP 阻害剤投与後の再発症例も徐々に散見されている。従って、PARP 阻害剤の抵抗性が今後の課題と考えられる。そこで、本研究においては、第一に高異型度漿液性癌における PARP 阻害剤の抵抗性に関わる因子について、解析を行った。一方で、成熟奇形腫の悪性転化は、希少卵巣がんの一種であり、その病態については大部分が未解明である。そして、標準的な化学療法は未確立のため、進行症例は予後不良とされている。本研究においては、成熟奇形腫の悪性転化に対しても、病態解明を行い、その治療抵抗性に関わる因子を同定することも目的としている。

方法および結果

1. 高異型度漿液性癌

名古屋大学医学部附属病院において、2018 年以降にオラパリブ維持療法を施行された卵巣高異型度漿液性癌症例を対象とした。病理診断に使用した FFPE 組織より、10X Genomics 社の Visium を用いて空間的トランスクリプトームを行うこととした。VisiumFFPE 専用スライドガラスは、特殊な加工がされているため、組織が剝がれやすいという特徴がある。また、FFPE 組織上では、RNA の分解が想定される。VisiumFFPE においては、遺伝子特異的なプローブを用いるため、200 塩基以上の RNA の割合が高いことが求められる。そこで、まず組織の接着テストと RNA の品質を確認し、解析に用いる 8 例を抽出した（オラパリブ奏功群 4 例、オラパリブ非奏功群 4 例）。10X Genomics 社のプロトコールに沿って、Keyence 社の BZ-X700 で HE 染色画像を取得し、ライブラリー調製を行った。そして、Illumina 社の HiSeq でシーケンスを行い、得られた Fastq ファイルを 10X Genomics 社の SpaceRanger ソフトウェアおよび R 環境の Seurat パッケージ等にて解析を行った。

まず、8 症例のデータを統合し、遺伝子発現をもとにして各スポットをクラスターに分類した（図 1a）。そして、癌細胞を多く含むスポットと、間質細胞を多くスポットに二分した（図 1a、1b）。そして、Cell Chat ソフトウェアを用いて、間質スポットから癌スポットへ寄与度の高い細胞間伝達経路を同定した。その結果、ミッドカインパスウェイ（MK）の寄与度が高い症例は、オラパリブ非奏功群では 3 例であったのに対し、オラパリブ奏功症例では 1 例のみであった（図 1c）。従って、個人差はあるものの、MK がオラパリブの感受性に影響を与えている可能性がある。

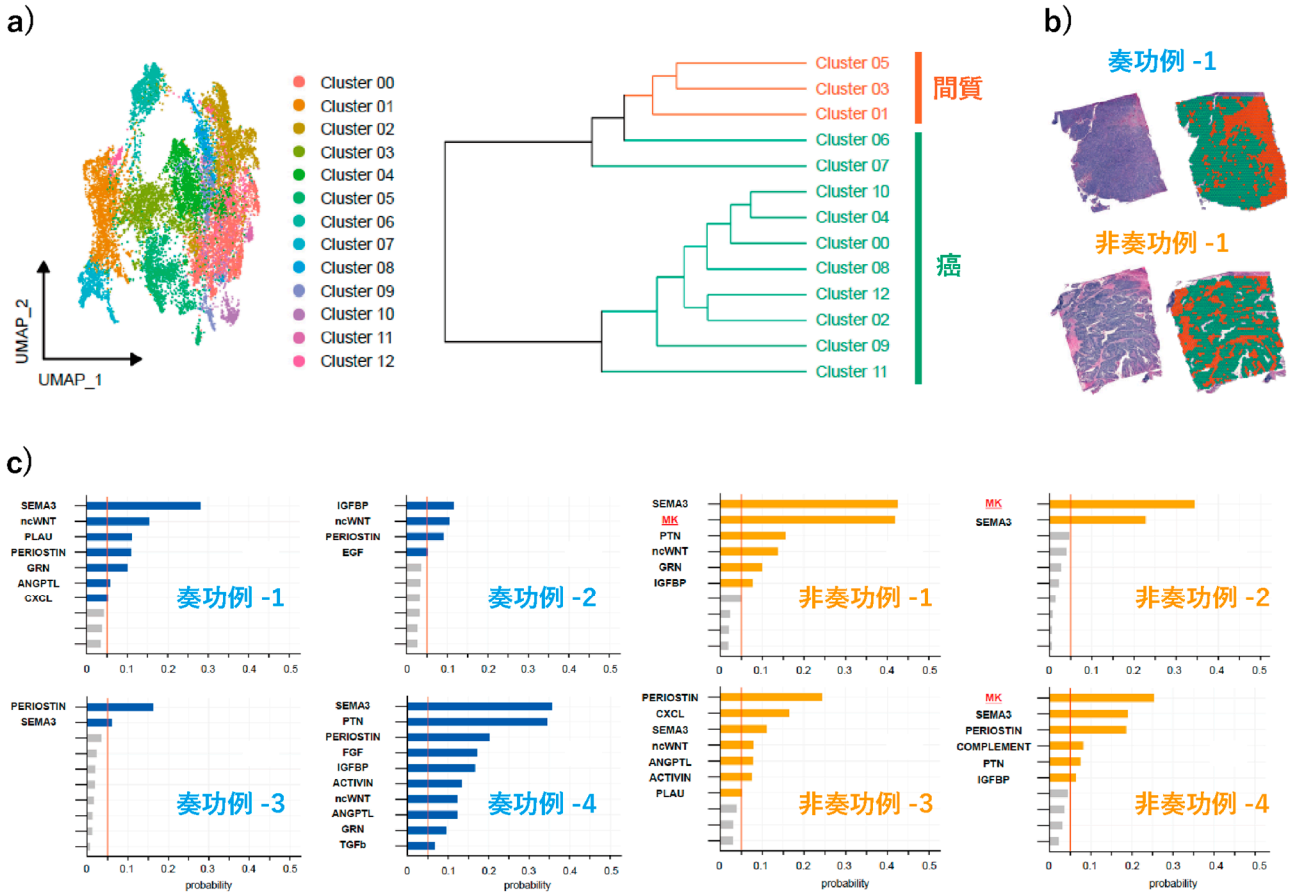


図 1. 卵巣高異型度漿液性癌に対する空間的トランスクリプトーム解析

a) 8 症例の UMAP プロットおよびクラスタリング。

b) 代表症例の HE 染色およびアノテーション。

c) 乾漆部から癌部への寄与度の高い細胞間伝達経路。MK: ミッドカイン、赤線：Probability＝0.05。Probability は、R 環境の CellChat パッケージを用いて算出した。

2. 成熟奇形腫の悪性転化

名古屋大学医学部附属病院と国立がん研究センターバイオバンクより計 5 例の症例を抽出し、その新鮮凍結組織を解析に用いた。なお、1 症例は 2 切片解析したため、5 症例 6 切片を解析に使用した。10X Genomics 社の Visium のプロトコールに沿ってライブラリー調製を進め、MGI Tech 社の DNBSEQ-G400 を用いてシーケンスを行った。得られた Fastq ファイルと画像より、SpaceRanger ソフトウェア、R 環境の Seurat パッケージを用いて解析を行った。

5 症例 6 切片を解析に使用したが、そのうち 2 症例は、ほとんどがん細胞が含まれなかったため、解析より除外した。そして、残りの 3 症例 4 切片のデータを統合し、UMAP でプロットし、遺伝子発現をもとにアノテーション行った（図 2a）。がん細胞を多く含むスポットについて解析を進め、がん細胞で高発現している KLF5 を同定した（図 2b）。

次に、当研究室においては、成熟奇形腫の悪性転化由来の patient-derived xenograft（PDX）モデル及び、PDX モデルから細胞株（NOSCC-1）の樹立に成功している。そこで、その NOSCC-1 細胞を用いて、KLF5 の機能解析を行った。KLF5 に対する siRNA を用いて、KLF5 の発現を抑制させたところ、NOSCC-1 の増殖は著明に抑制された（図 2c、d）。また、KLF5 の発現抑制によりアポトーシスも誘導されることが示された（図 2e）。さらに、KLF5 に対する阻害剤 ML264 の効果を検討した結果、その IC_{50} は 2.11 μ M であった。

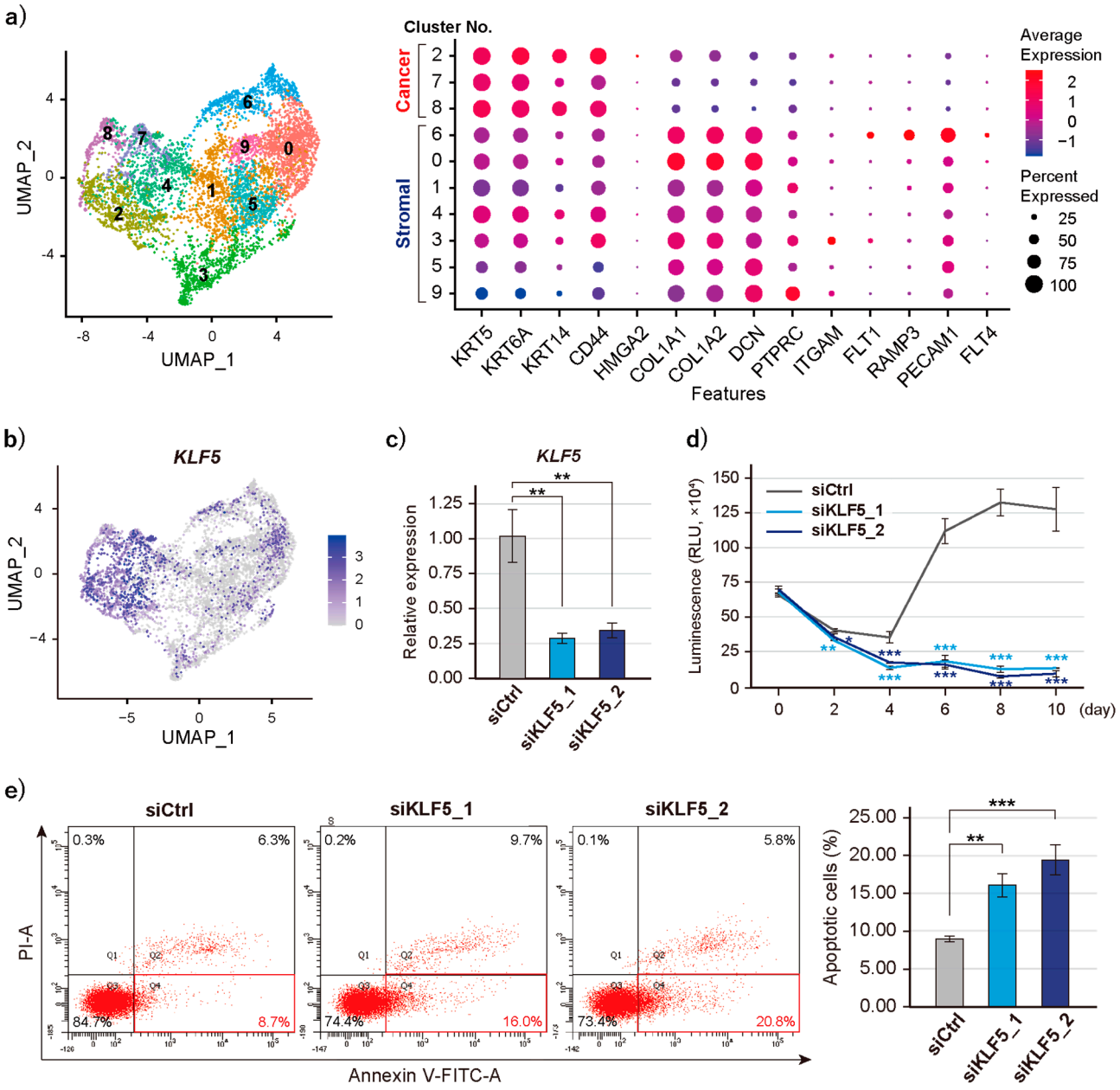


図 2. 成熟奇形腫の悪性転化に対する空間的トランスクリプトーム解析および機能解析

a) 3 症例（4 切片）の UMAP プロットおよびクラスタリング。

b) KLF5 の発現レベル。

c) NOSCC-1 細胞における siRNA の KLF5 の発現抑制効果。

d) NOSCC-1 細胞における KLF5 の増殖への影響。

e) NOSCC-1 細胞における KLF5 のアポトーシスへの影響。

* $p<0.05$、 ** $p<0.01$、 *** $p<0.001$（ダネット検定）。

考　察

高異型度漿液性癌におけるオラパリブを含めた PARP 阻害剤抵抗性の機序は未解明である。PARP 阻害剤が広く使用されるようになり、今後その重要性は増すと考えられ、研究開発を進める必要性がある。今回、我々は空間的トランスクリプトーム解析を用いて、癌部分と間質部分との相互作用を解析し、ミッドカインパスウェイ

がオラパリブ感受性に関与しうることを見出した。ミッドカインパスウェイは、様々な癌種において進展に関わるとされている［1］。今後、卵巣癌の PARP 抵抗性におけるミッドカインの意義について更なる理解を深め、新たな治療標的を探索することが求められる。

成熟奇形腫の悪性転化は、良性腫瘍である成熟奇形腫より 2 次性に発癌すると考えられ、約 90%が扁平上皮癌を呈する。以前に我々は、成熟奇形腫の悪性転化に特徴的なマイクロ RNA 発現について報告している［2］。今回、我々は、空間的トランスクリプトーム解析を用いて、新たな側面よりその病態に迫った。その結果、その進展に KLF5 が重要であることが示された。KLF5 は、食道の扁平上皮癌において重要な因子として報告されている［3］。従って、成熟奇形腫の悪性転化も他の扁平上皮癌と同様の特徴を有していると考えられ、KLF5 に関わる遺伝子は、新たな治療標的として期待される。

総じて、空間的トランスクリプトーム解析をはじめ、次世代シーケンス解析は病態解明において非常に強力なツールであり、今後もその特徴を活かして、がん研究を進めていく必要があると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター研究所病態情報学の山本雄介ユニット長、名古屋大学医学部附属病院の横井暁病院講師である。

文　献

1） Filippou PS, Karagiannis GS, Constantinidou A. Midkine (MDK) growth factor: a key player in cancer progression and a promising therapeutic target. Oncogene. 2020 Mar;39(10):2040-2054. PMID: 31801970, DOI: 10.1038/s41388-019-1124-8.

2） Yoshida K, Yokoi A, Kagawa T, Oda S, Hattori S, Tamauchi S, Ikeda Y, Yoshikawa N, Nishino K, Utsumi F, Niimi K, Suzuki S, Shibata K, Kajiyama H, Yokoi T, Kikkawa F. Unique miRNA profiling of squamous cell carcinoma arising from ovarian mature teratoma: comprehensive miRNA sequence analysis of its molecular background. Carcinogenesis. 2019 Dec 31;40(12):1435-1444. PMID: 31353396, DOI: 10.1093/carcin/bgz135.

3） Jiang YY, Jiang Y, Li CQ, Zhang Y, Dakle P, Kaur H, Deng JW, Lin RY, Han L, Xie JJ, Yan Y, Doan N, Zheng Y, Mayakonda A, Hazawa M, Xu L, Li Y, Aswad L, Jeitany M, Kanojia D, Guan XY, Said JW, Yang W, Fullwood MJ, Lin DC, Koeffler HP. TP63, SOX2, and KLF5 Establish a Core Regulatory Circuitry That Controls Epigenetic and Transcription Patterns in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. Gastroenterology. 2020 Oct;159(4):1311-1327.e19. PMID: 32619460, DOI: 10.1053/j.gastro.2020.06.050. Epub 2020 Jun 30.