

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04981

研究課題名(和文) 分子イメージング法を応用した子宮肉腫肺転移機構の解明と新治療法の開発

研究課題名(英文) To clarify the mechanism of lung metastases in human uterine sarcoma and to thereby provide a novel sarcoma therapeutic agents

研究代表者

吉田 好雄 (Yoshida, Yoshio)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：60220688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：子宮肉腫に特異的なバイオマーカー候補遺伝子を同定。Progranulin, Osteopontin, Midkine, GDF-15が優位に高発現していた。バイオマーカー候補遺伝子分泌タンパクの血中測定系を確立(PECcube system)。GFP陽性ヒト子宮肉腫細胞株マウス同所移植転移モデルの遺伝子プロファイリングから、転移関連遺伝子を同定。高転移株ではTNN1, COL1A2発現が増加し、ZIC1発現が抑制されていた。子宮肉腫のバイオマーカーとして、分子イメージング手法「Radiomics解析」で、Entropy, Correlationの高次テクスチャ特徴量が特異的であることを報告した。

研究成果の概要(英文)：Progranulin, Osteopontin, Midkine, GDF-15 develops the biomarker candidate gene which is specific for an uterus sarcoma from identification clinical specimen or cancer genome data. After identified as candidate biomarkers for diagnosing uterine sarcoma, we developed a novel measurement system for these factors using POCube, a fully automated immunological analyzer and developing a rapid and easy method. To investigate this mechanism, we developed a novel uterine orthotopic and metastatic model. Microarray analysis between orthotopic tumors with high and low metastatic potentials revealed differential expression of genes related to cell proliferation and migration (TNN1, COL1A2, and ZIC1). To evaluate the diagnostic significance of 18F-FDG PET/CT textural features for uterine sarcoma, Entropy, as a single feature, yielded the greatest AUC of 0.974 and the optimal cut-off value of 2.85 for entropy provided 93% sensitivity, 90% specificity, and 92% accuracy.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：biomarker metastases Texture analysis Entropy heterogeneity

## 1. 研究開始当初の背景

子宮肉腫は、極めて予後不良の疾患(5年生存率は20%以下)であり、外科的に完全摘出した症例でも、50%以上に遠隔転移(主に肺)が生じる。さらに、発生頻度は、増加傾向ではあるが、極めて稀(婦人科悪性腫瘍の1%以下)であるため、十分な臨床研究は不可能である。そのため、適切な動物モデルを用いたトランスレーショナルリサーチ研究の樹立が、新規バイオマーカーや治療法開発のために重要である。子宮肉腫の病態解明のために、過去に多くの動物実験モデルの作成が試みられている(Nat Med. 2007 など)が、転移モデルの作成には成功していない。転移機序は非常に複雑で不明な点が多い。特に、転移形成が、どの臓器(原発巣あるいは転移巣)の、どの細胞に、というような「場」の問題や、どのような時間経過で発現し消長するかという「時間」の問題が存在する。最近、乳がんの原発巣が、転移前に転移先の「場」を整えるため、様々な遺伝子調節をすることが判明した(Cell. 2014)。子宮肉腫においては、既に転移が完成した臨床検体を用いたゲノム解析は実施されているが(Science. 2009 など)、転移前・転移初期・転移進行期の時間経過を考慮した遺伝子プロファイリングの検討はなされていない。

## 2. 研究の目的

- (1) GFP 陽性ヒト子宮肉腫細胞株の樹立・マウス同所移植転移モデルの作製
- (2) ヒト子宮肉腫分子イメージング法で、「ラジオミクス解析」を実施し、「テクスチャ解析」で、高次特徴量を同定し、新規子宮肉腫イメージングバイオマーカーを同定する。
- (3) 遺伝子プロファイリングを行う。樹立したモデルマウスの原発腫瘍、転移巣および正常組織の遺伝子プロファイリングをマイクロアレイにより比較し、

発現レベルに顕著な差を有する遺伝子を同定する。

- (4) 新規子宮肉腫バイオマーカーの樹立
- (5) 新規血中測定可能新規子宮肉腫バイオマーカー測定系の樹立

## 3. 研究の方法

(1) GFP 遺伝子を導入したヒト子宮肉腫由来 MES-SA 細胞株を樹立し、ヌードマウスの皮下移植し、腫瘍形成後子宮へ同所移植し腫瘍を形成させた。腫瘍形成の検出は、GFP 蛍光イメージング・animal 用-核酸代謝 PET イメージング (FLT-PET)・animal 用-糖代謝 PET イメージング (FDG-PET) で検討した。また、同実験モデルを用いて高転移株と低転移株の樹立を試み、DNA マイクロアレイ解析で転移関連遺伝子を模索した。

(2) ヒト子宮肉腫症例を用いて、FDG-PET/CT 施行。関心領域の VOI を manual で同定し、テクスチャ解析ソフトで「テクスチャ特徴量」で、新規子宮肉腫イメージングバイオマーカーを同定した。解析ソフトは Chang-Gung Image Texture Analysis toolbox (CGITA) implemented under MATLAB 2014b (Mathworks INC. Natick.MA.USA) を使用した。

(3) 樹立したモデルマウスの原発腫瘍の高転移株、低転移株およびディッシュで増殖した細胞を用いて、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(4) NCBI より公開されているピックデータと、当科あるいは協力病院から患者血清の供与依頼を行い、データベースの解析と、血清解析を行い、子宮肉腫に特異的な新たな血清マーカー検出を実施した。

(5) 東洋紡と共同で、ELISA 法を用いた高感度迅速測定法の樹立を実施した。

## 4. 研究成果

(1) GFP 陽性ヒト子宮筋肉腫細胞株の樹立  
ヒト子宮肉腫由来 MES-SA 細胞に GFP 遺伝子

を導入しクローン化することで、GFP を恒常的に発現する細胞株を複数樹立した。マウス転移モデルの作製 GFP 導入 MES-SA 細胞を免疫不全マウスの皮下また子宮（同所）に移植した。その結果、腫瘍は再現性よく形成され、その腫瘍を他個体に移植した場合においても、腫瘍形成が認められた。また転移や腹膜播種も観察され、この腫瘍を回収し他個体の子宮に再移植したところ、その個体でも転移が認められた。このように子宮肉腫細胞を用いた実験動物モデルが作製された。さらにこれらの細胞株を用いて同所移植を繰り返していく中で、肺への転移数が多く見られる株（高転移株）と、転移が見られないまたは非常に少ない株（低転移株）の樹立に成功した。PET を指標とした転移早期発見技術の開発 GFP 導入 MES-SA 細胞を同所移植した免疫不全マウスを用いて  $^{18}\text{F}$ -FDG と  $^{18}\text{F}$ -FLT の PET 撮像実験を行った。その結果、肺への転移が認められた個体では転移が認められない個体と比較して、肺および原発巣における  $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込み（SUV 値）が増加した。一方、 $^{18}\text{F}$ -FLT の取り込み（SUV 値）の変化は認められなかった。

(2) 「texture 解析」の結果。Entropy が、特定の特徴量として最も有用であった。子宮肉腫バイオマーカーとしての、診断精度は、AUC of 0.974 で optimal cut-off value of 2.85 で、感度 93% 特異度、90% 正診率 92% であった。さらに、maximum SUV (cut-off :6.0) と entropy (2.85) さらに correlation (0.73)を加えると、感度 100% 特異度、94% 正診率 95% であった。

(3) ヒト子宮筋肉腫の発生・転移機序の解明。樹立したモデルマウスの原発腫瘍の高転移株、低転移株およびディッシュで増殖した細胞を用いて、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、高転移株と低転移株との間において Cellular Movement や Cell Morphology に関

与する遺伝子発現が変化していることを明らかにした。(特願 2014-149007) (*Cancer Letter* 2015)。同定された遺伝子は、TNNT1、ZIC1、COL1A2 であった。特に TNNT1 は、Davidson B et al., Gene expression signatures of primary and metastatic uterine leiomyosarcoma. *Hum Pathol.* 2014 や、Tong DL et al., Artificial neural network inference (ANNI): a study on gene-gene interaction for biomarkers in childhood sarcomas. *PLoS One.* 2014 でも子宮肉腫の悪性度と関連する遺伝子として着目されており、特に肉腫内の低酸素環境と強く関連していることが示唆されている。低酸素は癌の転移などの悪性化や治療抵抗性と密接に関連していることはよく知られた事実であり、我々の実験系では、TNNT1 の発現が子宮肉腫の低酸素環境と関連し肺転移を促進している可能性がある。

(4) 臨床検体あるいはがんゲノムビクテーターから、*Progranulin*, *Osteopontin*, *Midkine*, *GDF-15* が子宮肉腫に優位に高発現していることを見出した(特願 2017-148278)。

(5) バイオマーカー候補遺伝子分泌タンパクの血中測定系を確立 (PECcube system) 多孔性フィルター上で ELISA を行うことにより全血検体から前記子宮肉腫バイオマーカーを迅速に測定できる系を確立した。本実験系では従来血液検体を 50-100ul 程度必要とし、反応時間も 4 ~ 6 時間程度要するが、本システムは血液検体の量を、5-20ul 程度、測定時間も 15 分 ~ 50 分以内に短縮することができる。(東洋紡との共同開発)

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 20 件)  
K.Hattori, M.Orisaka, S.Fukuda,  
K.Tajima, Y.Yamazaki, T.Mizutani,

Y.Yoshida: Luteinizing Hormone Facilitates Antral Follicular Maturation and Survival via Thecal Paracrine Signaling in Cattle. *Endocrinology*. 査読有 , in press  
DOI:10.1210/en.2018-00123.

H.Tsuyoshi, Y.Yoshida: Molecular biomarkers for uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma. *Cancer Sci*. 査読有 , 2018 Apr 16. in press  
DOI: 10.1111/cas.13613

T.Tsujikawa, H.Tsuyoshi, M.Kanno, S.Yamada, M.Kobayashi, N.Narita, H.Kimura, S.Fujieda, Y.Yoshida, H.Okazawa:Selected PET radiomic features remain the same, *Oncotarget*, 査読有 , 2018 , in press

T.Kurokawa, T.Onuma, A.Shinagawa, Y.Chino, M.Kobayashi, Y.Yoshida: The Ideal Strategy for Cervical Cancer Screening in Japan: Result from the Fukui Cervical Cancer Screening Study, *Cytopathology*, 査読有 , 2018 , in press  
DOI: 10.1111/cyt.12576

K.Fujii, M.Orisaka, M.Yamamoto, K.Nishijima, Y.Yoshida: Primary intramedullary spinal cord tumour in pregnancy: a case report. *Spinal Cord Ser Cases* , 査読有 , 2018, 4:25  
DOI: 10.1038/s41394-018-0059-6

S.Fujiwara, H.Tsuyoshi, T.Nishimura, N.Takahashi, Y.Yoshida:Precise preoperative diagnosis of struma ovarii with pseudo-Meigs' syndrome mimicking ovarian cancer with the combination of 131I scintigraphy and 18F-FDG PET: case report and review of the literature. *J Ovarian Res* , 査読有 , 2018 Feb, 11(1):11  
DOI: 10.1186/s13048-018-0383-2

T.Tsujikawa, M.Yamamoto, K.Shono, S.Yamada, H.Tsuyoshi, Y.Kiyono, H.Kimura, H.Okazawa, Y.Yoshida:Assessment of intratumor heterogeneity in mesenchymal uterine tumor by an 18F-FDG PET/CT texture analysis , *Ann Nucl Med* , 査読有 , 2017, 31(10):752-757  
DOI: 10.1007/s12149-017-1208-x

T.Onuma, K.Tajima, K.Sato, K.Hattori, S.Fukuda, T.Tsuji, Y.Yoshida:Clinical significance of atypical squamous cells of undetermined significance after treatment for cervical intraepithelial grade 3 neoplasia: A retrospective single-center cohort study , *Mol Clin Oncol*. 査読有 , 2017 , 7(6):1032-1038.  
DOI: 10.3892/mco.2017.1443

K.Kurata, Y.Chino, A.Shinagawa, T.Kurokawa, Y.Yoshida:Surgical Apgar Score predicts 30-day morbidity in elderly patients who undergo non-laparoscopic gynecologic surgery: A retrospective analysis , *Int J Surg*, 査読有 , 2017, 48:215-219  
DOI: 10.1016/j.ijssu.2017.11.002

T.Tsujikawa, T.Rahman, M.Yamamoto, S.Yamada, H.Tsuyoshi, Y.Kiyono, H.Kimura, Y.Yoshida, H.Okazawa:18F-FDG PET radiomics approaches: comparing and clustering features in cervical cancer. *Ann Nucl Med*. 査読有 , 2017 , 31(9):678-685  
DOI: 10.1007/s12149-017-1199-7

H.Tsuyoshi, Y.Yoshida:Diagnostic imaging using positron emission tomography for gynecological malignancy. *J Obstet Gynaecol Res* , 査読有 , 2017 , 43(11):1687-1699  
DOI: 10.1111/jog.13436

S.Fujiwara-Arikura, K.Nishijima, C.Tamamura, Y.Nishikawa, J.Takahashi, H.Kawamura, S.Nakago, F.Kotsuji, Y.Yoshida : Re: Transverse uterine fundal incision for placenta praevia with accreta, involving the entire anterior uterine wall: a case series. Spontaneous uterine rupture during the subsequent pregnancy after transverse uterine fundal incision for placenta praevia with accreta. *BJOG* , 査読有 , 2017,  
DOI: 10.1111/1471-0528.14899

H.Tsuyoshi, VKW.Wong, Y.Han, M.Orisaka, Y.Yoshida, BK.Tsang:Saikosaponin-d, a calcium mobilizing agent, sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by

facilitating mitochondrial fission and G2/M arrest. *Oncotarget* , 査読有 , 2017, 8(59):99825-99840  
DOI: 10.18632/oncotarget.21076

S.Yamada, K.Nishijima, J.Takahashi, N.Takahashi, C.Tamamura, Y.Yoshida: Intrauterine fetal death caused by seatbelt injury , 査読有 , 2017 , 56(4):558-560  
DOI: 10.1016/j.tjog.2016.08.009.

Y.Chino, H.Tsuyoshi, T.Tsujikawa, H.Okazawa, Y.Yoshida: A Novel Diagnostic Strategy Using  $^{16}\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]-Fluoro-17- $\beta$ -Estradiol ( $^{18}\text{F}$ -FES) PET/MRI to Achieve Complete Resection of Intravenous Leiomyomatosis in Reproductive-Age Women. *Clin Nucl Med*. 2017 Jul, 42(7):e335-e336  
DOI: 10.1097/RLU.0000000000001678

M.Yamamoto, Y.Tsujikawa, S.Yamada, T.Kurokawa, A.Shinagawa, Y.Chino, T.Mori, Y.Kiyono, H.Okazawa, Y.Yoshida:  $^{18}\text{F}$ -FDG/ $^{18}\text{F}$ -FES standardized uptake value ratio determined using PET predicts prognosis in uterine sarcoma , *Oncotarget* , 査読有 , 2017 , 8(14):22581-22589 ,  
DOI: 10.18632/oncotarget.15127

M.Yamamoto, T.Tsujikawa, Y.Fujita, Y.Chino, T.Kurokawa, Y.Kiyono, H.Okazawa, Y.Yoshida : Metabolic tumor burden predicts prognosis of ovarian cancer patients who receive platinum-based adjuvant chemotherapy . *Cancer Sci* , 107(4):478-85 , 2016.4  
DOI:10.1111/cas.12890

K.Ota, K.Kawahara, H.Banno , K.Nishijima, Y.Yoshida : Hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by pyogenic liver abscess during 1 pregnancy : a case report. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology(OJOG)* , 6(5):287-92 , 2016.4

Rahman, T.Tsujikawa, M.Yamamoto,

Y.Chino, A.Shinagawa, T.Kurokawa, T.Tsuchida, H.Kimura, Y.Yoshida, H.Okazawa. Different prognostic implications of  $^{18}\text{F}$ -FDG PET between histological subtypes in patients with cervical cancer. *Medicine*, 95(9):e3017, 2016.3  
DOI:10.1097/MD.0000000000003017

M.Yamamoto, T.Tsujikawa, H.Okazawa, Y.Yoshida : Impact on PET texture features of imaging biomarkers for predicting survival of patients with uterine sarcoma-preliminary results. *Biomarkers Journal*, 2(1):13, 2016.3

〔学会発表〕(計 8 件)

H.Tsuyoshi, Y.Yoshida: Diagnostic value of bioactive factors from blood sample for the early detection of uterine sarcoma, The SGO 2018 Annual Meeting on Women's Cancer, 2018.3.24-27, New Orleans(USA)

吉田 好雄 : 婦人科肉腫に対する基礎からのアプローチ , 第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 , 2017.7.27-29 , 熊本市 (ランチョンセミナー)

吉田 好雄: 画像検査(CT,MRI,PET/CT) , *CT-scan,MRI,CT-PET* , 第 59 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 , 2017.7.27-29 , 熊本市 (婦人科腫瘍学教育講座)

吉田 好雄 : 分子イメージング解析による婦人科腫瘍の診断 , 第 23 回熊本婦人科悪性腫瘍研究会 (Kumamoto GOG) , 2017.6.15 , 熊本市

T.Kurokawa, A.Shinagawa, Y.Chino, Y.Yoshida : The Assessment of cervical cancer screening using the combination of cervical cytology and high-risk human papillomavirus testing in fukui prefecture, Japan . The 19<sup>th</sup> International Congress of Cytology , 2016.5.28-6.1 , Yokohama

吉田 好雄 : 子宮肉腫の診断と治療 ~ 新たな挑戦 ~ , 第 42 回日本産婦人科医学会学術集会 , 2015.10.17 , 新潟市 (教育講演)

吉田 好雄 : 「婦人科がんの診断」 - PET

を中心に - ,第 22 回佐賀産婦人科・放射線科フォーラム ,2015.7.3 ,佐賀市

吉田 好雄 :子宮肉腫の診断と治療 ~ ホルモン治療の可能性について~,第 2 回島根産婦人科フォーラム ,2015.10.22 ,出雲市

〔図書〕(計 1 件)

— 吉田 好雄 :子宮の腫瘍・類腫瘍 :吉川史隆・倉智 博久・平松 祐司(編):産科婦人科疾患 最新の治療 2016-2018 ,南江堂 ,295-7 ,2016.2

〔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 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 好雄 (YOSHIDA Yoshio)  
福井大学・学術研究院医学系部門・教授  
研究者番号 : 60220688

(2)研究分担者

清野 泰 (KIYONO Yasushi)  
福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授  
研究者番号 : 50305603

岡沢 秀彦 (OKAZAWA Hidehiko)  
福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授  
研究者番号 : 50360813

水谷 哲也 (MIZUTANI Tetsuya)  
福井大学・学術研究院医学系部門・准教授  
研究者番号 : 90322734