

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10698

研究課題名(和文)子宮内膜癌における筋層浸潤と局所免疫反応の解析

研究課題名(英文) Analysis of relation between myometrial invasion and local immunereaction in endometrial carcinoma.

研究代表者

徳永 英樹 (TOKUNAGA, Hideki)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30595559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌の手術摘出組織のパラフィン固定標本25例について、CD8、CD56の免疫染色を行い、子宮下部発生癌ではNK細胞の間質浸潤が多い傾向であることがわかった。子宮内膜組織のフローサイトメトリーを行ったが有意な結果は得られなかった。未治療子宮癌生検組織60例におけるT細胞受容体レパートリー解析を行い、腫瘍部におけるT細胞受容体の多様性の分布について解析を行った。現在統計学的に臨床情報との関連を解析中である。

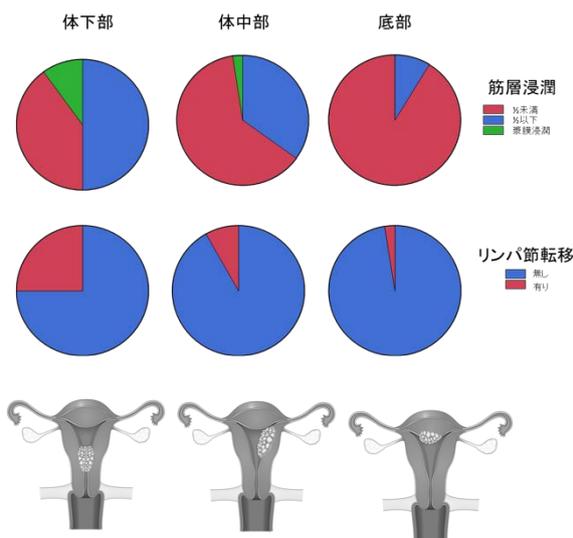
研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical staining of CD8 and CD56 was performed on 25 paraffin fixed specimens of surgically removed tissues of endometrial carcinoma. It was found that there is a tendency that NK cell interstitial infiltrate tends to be large in cancer of lower part of uterine corpus. Flow cytometry for cells obtained from endometrial tissue was performed, but no significant results were obtained in terms of immune reaction of cancer invasion. We analyzed T cell receptor repertoire in 60 untreated uterine cancer biopsy tissues and analyzed the distribution of T cell receptor diversity in the tumor area. Currently the relation with clinical information is being analyzed.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌 臨床試験

1. 研究開始当初の背景

正常子宮内膜においては、分泌期後半に CD56 陽性細胞 (NK 細胞) が誘導され、内膜間質内のらせん動脈周囲間質にアポトーシスが生じることを当教室において明らかにした (Tohoku J Exp Med. 1999 Feb;187:149-55, Tohoku J Exp Med. 2001 Jan;193:13-25.)。子宮内膜癌における CD56 陽性細胞の意義については、Garzetti らが 1995 年に子宮内膜癌における筋層浸潤、脈管侵襲と NK 細胞の誘導との関連性を報告しているものの、それ以来、子宮内膜癌の進展と NK 細胞の誘導に関する詳細な検討は行われていない。さらに生殖臓器である子宮においては臓器固有の免疫機構は存在せず、血液中の NK 細胞が状況に応じて子宮内に誘導されることで免疫機能を発揮していると考えられているが、その詳細についても明らかではない。局所免疫と子宮内膜癌の進展に着いて唯一と言ってもよい報告は Tamiolakis らによる子宮体部漿液性腺癌 (局所破壊浸潤性と転移性が他の組織型に比べて高度な組織型) におけるマクロファージとヘルパー T 細胞の分布の検討である。局所浸潤とこれらの免疫応答細胞の発現状態に関連性があることが示唆されている。また子宮体癌の発生に関連する代表的な遺伝子異常として p53 遺伝子異常および DNA ミスマッチ関連遺伝子異常が知られている。我々は子宮体下部発生癌において DNA ミスマッチ関連遺伝子異常に起因するマイクロサテライト領域遺伝子不安定性が低率で、p53 遺伝子蛋白の過剰発現が認められることを報告 (Watanabe et al. Int J Gynecol Pathol 2001;20:368-73) しているが、子宮筋層における局所免疫反応との関連性については全く不明であり、関連研究も認められていない。

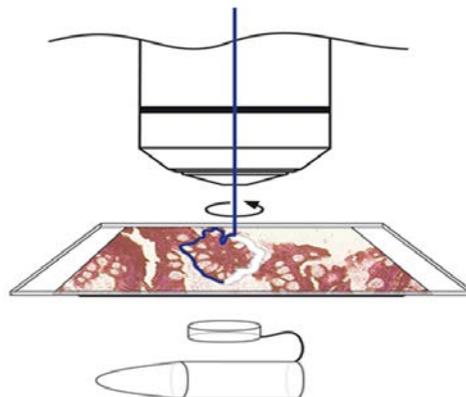


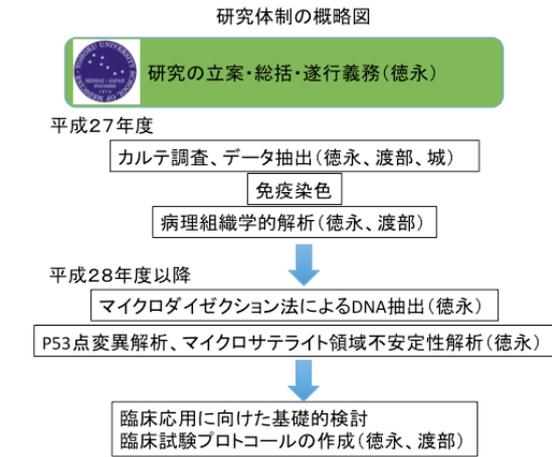
2. 研究の目的

子宮体癌は子宮体下部発生癌の臨床病理学的検討から、腫瘍の発生部位により子宮筋層浸潤、後腹膜リンパ節転移などの進展度が異なる事実が知られているものの、その詳細は明らかではない。そこで、本研究においては子宮底部、子宮体中部、子宮体下部各部位に発生する子宮体癌の筋層内局所免疫反応および子宮体癌と密接に関連する p53 および DNA ミスマッチ修復関連遺伝子異常に注目し、相互の関連性を検討することによって、子宮体部における腫瘍発生部位別に子宮体癌の臨床病理学的特徴と腫瘍進展機序の差異を解明する。さらに子宮体癌に対する有効な手術術式、術後治療適用のための新規臨床条件を確立することを最終目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、子宮内の局所免疫機構に着目し、腫瘍発生部位ごとの生物学的特徴を明らかにし、治療の個別化への道筋を見いだすことを最終目的として、以下に示す 4 つの研究計画をデザインし 3 年の期限で遂行する。研究計画 1. 当教室における子宮体癌手術症例を後方視的に調査し、発生部位別の臨床病理学的特徴をあきらかにする。2006 年から 2010 年の間に、東北大学病院において手術を行ったおよそ 200 例のパラフィン包埋検体を保存しており、その臨床データも蓄積している。腫瘍の発生部位のパターンで再分類し、転移、浸潤様式、化学療法に対する反応性、放射線療法感受性、予後のデータを用いて臨床病理学的特長を明らかにする。研究計画 2. 子宮内膜癌の手術摘出組織のパラフィン固定標本を用いて、HLA-DR、CD4、CD8、CD56、p53、hMSH2、hMLH1 免疫染色を行い、発生部位との関連性を明らかにする。研究計画 3. 子宮内膜癌の手術摘出組織のパラフィン固定標本から DNA を抽出し、マイクロサテライト領域遺伝子不安定性、および p53 遺伝子異常について解析する。研究計画 4. 発生部位別の進展様式の差異を明らかにし、それぞれに適した手術術式、後治療を検討し、子宮体癌における前方視的臨床試験を立案する。





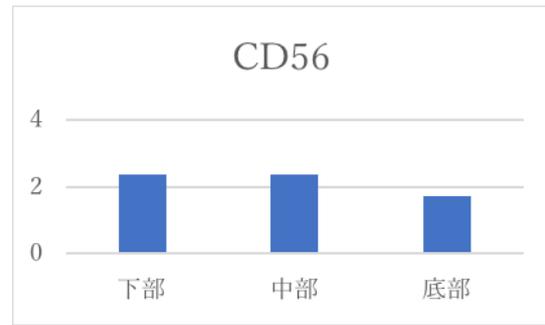
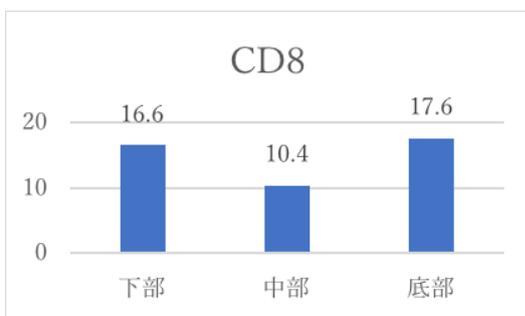
#### 4. 研究成果

本研究は子宮底部、子宮体中部、子宮体下部各部位に発生する子宮体癌の筋層内局所免疫反応および子宮体癌と密接に関連する p53 および DNA ミスマッチ修復関連遺伝子異常に注目し、子宮体部における腫瘍発生部位別に子宮体癌の臨床病理学的特徴と腫瘍進展機序の差異を解明しようとするものである。

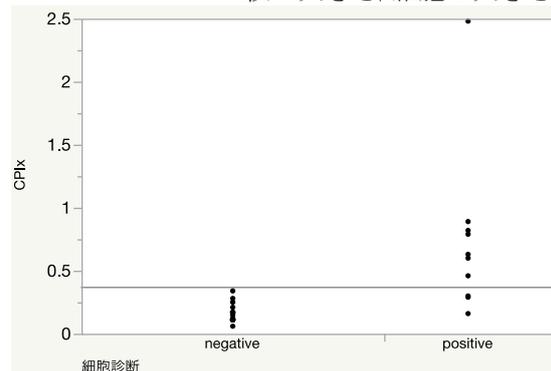
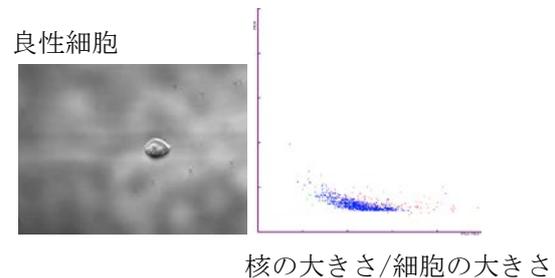
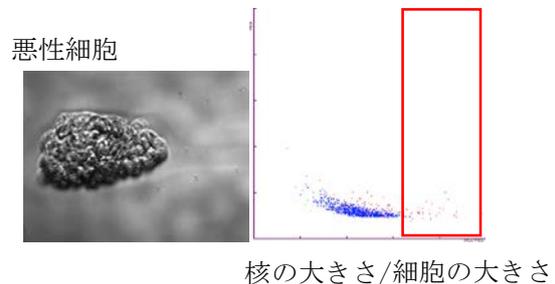
子宮体癌においては組織学的分化度、子宮筋層内浸潤の深さ、あるいは後腹膜リンパ節転移を主とした子宮外進展の有無が予後規定因子として知られている。本研究においては子宮体癌の発生部位による生物学的特徴を明らかにするため、子宮体癌を子宮底部発生癌、子宮体中部発生癌、および子宮体下部発生癌の3型に分類し、子宮筋層内における局所免疫反応、および p53 遺伝子異常、DNA ミスマッチ修復関連遺伝子異常の両面から検討を行う予定であった。

本研究の意義は、子宮内膜癌において、局所免疫応答の差異を示すことによって、転移・再発危険因子の再評価を可能とし、より効果的な後治療を規定することを可能にするものと考えている。

子宮体癌臨床検体の選別と免疫染色の実施であり、子宮内膜癌の手術摘出組織のパラフィン固定標本 25 例について、CD8、CD56 の免疫染色を行い、子宮下部発生癌ではNK細胞の間質浸潤が多い傾向であることがわかった。



より定量的に子宮内膜癌組織における免疫担当細胞の存在を確認するために、未治療の生検組織において子宮内膜組織のフローサイトメトリー解析を行った。剥離細胞分析装置 LC-1000 (Sysmecs 社) を使用し、CPIx (Cell Proliferation Index) を測定した。研究方法の妥当性を検証するために腹水が貯留した東北大学病院婦人科での治療対象者から腹水を採取し、上皮細胞成分、間葉系細胞成分、免疫応答細胞の分離解析を行い、各成分の分離が可能であることを確認した。29 例が登録され、平均 56 歳、卵巣がん 13 例、子宮体癌 11 例、頸部腺癌 1 例、その他 4 例だった。9 例は肉眼的あるいは画像上癌性腹膜炎を呈していた。細胞診断は陰性 19 例、陽性 9 例、疑陽性 1 例だった。陰性例の CPIx 値は平均 0.16、陽性例では 0.81 と統計学的に優位 ( $P=0.0001$ ) な分布の差が認められた。



(図：癌性腹水から採取したサンプルでは有意に CPIx が高い)

子宮内膜生検検体 30 例を対象に同様の解析を行ったが、上皮性組織および間質組織の細胞間結合予想以上に強く、細胞集塊の分離に不均衡が生じたため有意な結果は得られなかった。

そこで、未治療子宮癌生検組織 60 例における T 細胞受容体レパートリー解析を行った。腫瘍部における T 細胞受容体の多様性の分布について PCR 法を用いた網羅的な塩基配列シーケンスにより解析を行った。この手法では子宮悪性腫瘍組織における T 細胞受容体レパートリーは同一患者の循環血液における T 細胞受容体の塩基配列の多様性が明らかに異なることを見出した。現在統計学的に臨床情報(年齢、組織型、腫瘍の TNM 進行期)との関連を解析中である。

子宮内膜癌における強力な予後因子にリンパ節転移の有無がある。傍大動脈リンパ節転移の診断的意義は一定のコンセンサスを得ているものの、治療的意義についてはいまだ一定の見解が得られていないため、日本臨床腫瘍研究グループ(JCOG)において、筋層浸潤が子宮壁の 1/2 以上に及ぶ中・高リスク子宮内膜癌患者を対象に傍大動脈リンパ節を実施するか否かを手術中にランダム化し、比較する前方視的優越性試験(JCOG1412 試験)

標準治療：子宮全摘術、両側付属器切除、骨盤リンパ節郭清

試験治療：子宮全摘術、両側付属器切除、骨盤リンパ節郭清+傍大動脈リンパ節郭清

を企画し、現在患者リクルートを行っている。本研究代表者(徳永英樹)は渡利班(AMED・17ck0106314h0001)の分担研究者として、試験遂行に協力している。合計 760 例の登録目標に対して平成 30 年 4 月現在で 80 例の登録があり、我々の施設からは 2 例の登録を行った。

## 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 1 件)

① Current Status of Uterine Leiomyosarcoma in the Tohoku Region: Results of the Tohoku Translational Center Development Network Survey.

Tokunaga H, Takahashi F, Yamamoto H, Honda T, Watanabe T, Shoji T, Sugiyama T, Yamada H, Tando T, Yoshinaga K, Kagabu S, Otsuki T, Kin S, Yokoyama Y, Wagatsuma S, Sato K, Sato H, Oishi T, Yoshida Y, Hayasaka T, Matsui T, Imai N, Nishigori H, Shimokawa H, Yaegashi N, Watanabe Y.

Int J Clin Oncol. 2017 Jun;22(3):541-547. doi: 10.1007/s10147-017-1097-y. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28188392 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

① A randomized phase III trial of docetaxel plus cisplatin or paclitaxel plus carboplatin compared with doxorubicin plus cisplatin as adjuvant chemotherapy for endometrial cancer at high risk of recurrence: Japanese Gynecologic Oncology Group study (JGOG2043).

ASCO 2017, Chicago, USA

Presented Friday, June 2, 2017

Hiroyuki Nomura, Daisuke Aoki, Hirofumi Michimae, Mika Mizuno, Hidekatsu Nakai, Masahide Arai, Motoi Sasagawa, Kimio Ushijima, Toru Sugiyama, Motoaki Saito, Hideki Tokunaga, Kohei Omatsu, Toru Nakanishi, Yoh Watanabe, Toshiaki Saito, Nobuo Yaegashi

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳永 英樹 (TOKUNAGA, Hideki)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30595559

### (2) 研究分担者

岡本 聡 (OKAMOTO, Satoshi)

東北大学・大学病院・臨床検査技師

研究者番号：40420020

### (3) 連携研究者

渡部 洋 (WATANABE, Yoh)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：80231009

### (4) 研究協力者 なし