

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10708

研究課題名(和文)末梢血中における子宮内膜癌幹細胞の検出とその臨床的意義の検討

研究課題名(英文)Analysis of circulating cancer stem cells in endometrial cancer

研究代表者

中村 充宏(Nakamura, Mitsuhiro)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：50377397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌154例にp53とER( / )について免疫組織学的に解析した。多変量解析にて、病理組織学的Grade、stained-p53、high-ER が独立した進行リスク因子となっていた。high-ER はリンパ節転移・術後再発の発生において、感度および陰性的中率が100%であった。Double positive(stained-p53かつhigh-ER )症例は、他の群に比べ、有意にDisease-free-survivalが短いという結果であった。子宮内膜癌においてp53、ER が癌進行リスクの予測因子になりうると同時に癌幹細胞が深く関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the immunohistochemical expression profiles of p53 and estrogen receptor (ER) proteins in patients with endometrial endometrioid carcinoma who underwent surgical treatment at our hospital (n = 154). By multivariate analysis, we found that histological grades, detection of immunoreactive p53 and high expression of ER (high-ER) were independently associated with metastasis and/or recurrence. Among these parameters, the sensitivity and negative predictive values of high-ER were very high (up to 100%). The disease-free survival of patients who were double-positive for p53-stained and high-ER was significantly shorter than that in other patients. These results suggest that double-positivity for p53-stained and high-ER may provide a promising clinical indicator to predict the risk of progression in endometrial cancer. Furthermore, p53 and ER expression may be associated with cancer stem cells (CSCs), especially CD133 and CD117 CSC markers.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：Endometrial cancer Cancer stem cells p53 ER

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞のごく一部の細胞集団が高い腫瘍形成能と自己複製能、さらに多分化能を有するという癌幹細胞 (Cancer stem cells; CSCs) との存在が報告されている。

特定の表面マーカーを有する少数の細胞集団が癌幹細胞様の性格を持つのではないかとの報告が数多くなされている。我々は子宮内膜癌において CD133 が癌幹細胞マーカーであること報告した (Nakamura et al. Hum Pathol, 2010)。CD133 陽性子宮内膜癌細胞は陰性細胞に比し、高い造腫瘍、自己複製能を有しており、抗癌剤抵抗性であり臨床的には独立予後不良因子であった。また CD133 陽性細胞は浸潤、転移の遺伝子である MT1-MMP の発現が亢進しており著明な浸潤能を有していた (Nakamura et al. Int J Oncol, 2014))。更に、CD133 陽性子宮内膜癌細胞が血管内皮細胞へ分化する能力を有していることを明らかにし、癌幹細胞が多分化能を持つ可能性を示唆した。また CD117 が新たな癌幹細胞マーカーであることを明らかにし、新たな分子標的治療のターゲットになりうることを示した (Zhahg and Nakamura et al, Cancer Lett, 2014)。このように子宮内膜癌幹細胞は悪性度の高い細胞集団であることが明らかとなり、これを治療ターゲットとすることは難治性子宮内膜癌の治療に重要であると考えられる。しかしながらヒト即ち生体内での機能や役割については解明されていないのが現状である。

臨床において悪性腫瘍に対する手術を施行し、肉眼上完全に切除した進行期が初期の症例でも早期に遠隔転移が見つかり化学療法などの治療効果に乏しい場合が決して少なくない。

## 2. 研究の目的

子宮内膜癌細胞の分子生物学的特徴を解明する。

## 3. 研究の方法

今回我々は、子宮内膜癌症例について検討を行った。術前検査において遠隔転移を認めなかった子宮内膜癌手術症例の中で、術後病理標本にて組織型が類内膜癌と診断された 154 症例を対象とした。p53 と ER ( / ) の免疫染色を行い、また p53 においては遺伝子変異との関連も解析した。免疫染色の判定基準として、p53 は癌細胞の核に 10%以上染色が認められる症例を stained-p53、ER ( / ) は中等度以上の染色強度で癌細胞の核に 50%以上染色が認められる症例を high-ER とそれぞれ判定した。臨床病理学的因子および分子生物学的因子と所属リンパ節転移・術後再発の有無との相関を評価した。

## 4. 研究成果

患者の同意を文書で得た上で子宮内膜癌組織を採取した。対象症例 154 例のうち、術後の病理診断にてリンパ節転移のあったもの及び治療後早期に再発・転移を認めたものは 29 例認められた。リンパ節に転移を認めず、早期に再発・転移を認め無かった 125 例と臨床病理学的に検討したところ組織の分化度(グレード)、筋層浸潤の程度及び脈管侵襲の有無との間に有意な差を認めた。

p53 と ER ( / ) について免疫組織学的に検討を行った。p53 については Non-stained が 102 例、10~49%染色の Low-stained が 33 例、50%以上の High-stained が 19 例認められた。High-positive 群は Low-positive 群に比べて TP53 遺伝子変異が多かった。Low-positive 群のリンパ節転移・術後再発の頻度は 39.4%であり、High-positive 群の 47.4%とほぼ同等であった。これらの結果から遺伝子変異に由来しない p53 蛋白の機能異

常の存在が示唆された。

ER high expression は 140 例認められた。リンパ節転移・術後再発の有無との間に有意差を認めなかった。ER high expression は 68 例認められた。リンパ節転移・術後再発を認めた 29 例全例、ER high expression であった。

多変量解析にて、病理組織学的 Grade、stained-p53、high-ER の 3 つの因子が独立した進行リスク因子となっていた。特に、high-ER はリンパ節転移・術後再発の発生において、感度および陰性的中率が 100%であった。また、high-ER 症例のなかで、リンパ節転移・術後再発の頻度は p53-stained 群で 61.1%、p53-non-stained 群で 21.9%であった。Double positive (stained-p53 かつ high-ER ) 症例は、それ以外の群に比べ、有意に Disease-free-survival が短いという結果であった。p53 については、遺伝子変異とリンパ節転移・術後再発との間に相関は認められなかった。子宮内膜癌において p53、ER が癌進行リスクの予測因子になりうると同時に癌幹細胞が深く関与している可能性が示唆された。

#### <引用文献>

1. Nakamura M, Kyo S, Zhang B, Zhang X, Mizumoto Y, Takakura M, Maida Y, Mori N, Hashimoto M, Ohno S, Inoue M. Prognostic impact of CD133 expression as a tumor-initiating cell marker in endometrial cancer. *Hum Pathol* 41(11): 1516-29, 2010. doi: 10.1016/j.humpath.2010.05.006. Epub 2010 Aug 30.
2. Nakamura M, Zhang X, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Kyo S. Molecular characterization of CD133+ cancer stem-like cells in endometrial cancer. *Int J Oncol*. 2014 Mar;44(3):669-77. doi:

10.3892/ijo.2013.2230. Epub 2013 Dec 23.

3. Zhang X, Kyo S, Nakamura M, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, Takakura M, Fujiwara H. Imatinib sensitizes endometrial cancer cells to cisplatin by targeting CD117-positive growth-competent cells. *Cancer Lett*. 345(1):106-14, 2014. doi: 10.1016/j.canlet.2013.04.010. Epub 2013 Apr 18.

#### 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 10 件 )

1. Detection of circulating tumor cells in cervical cancer using a conditionally replicative adenovirus targeting telomerase-positive cells. Takakura M, Matsumoto T, Nakamura M, Mizumoto Y, Myojyo S, Yamazaki R, Iwadare J, Bono Y, Orisaka S, Obata T, Iizuka T, Kagami K, Nakayama K, Hayakawa H, Sakurai F, Mizuguchi H, Urata Y, Fujiwara T, Kyo S, Sasagawa T, Fujiwara H. *Cancer Sci*. 2018 Jan;109(1):231-240. doi: 10.1111/cas.13449. Epub 2017 Dec
2. Successful detection of SRY gene via fine needle biopsy: A case of extragenital gestational choriocarcinoma in the kidney. Orisaka S, Kagami K, Mizumoto Y, Koda W, Ono M, Nakamura M, Fujiwara H. *Mol Clin Oncol*. 2017 Dec;7(6):1057-1060. doi: 10.3892/mco.2017.1460. Epub 2017 Oct 18.
3. Dual expression of immunoreactive estrogen receptor and p53 is a potential predictor of regional lymph node metastasis and postoperative recurrence in

endometrial endometrioid carcinoma. Obata T, Nakamura M, Mizumoto Y, Iizuka T, Ono M, Terakawa J, Daikoku T, Fujiwara H. PLoS One. 2017 Nov 30;12(11):e0188641. doi: 10.1371/journal.pone.0188641. eCollection 2017.

4. Subserous invasion of VEGF-C-producing cancer cells is a possible risk factor for ileal ulceration in the non-metastatic mucosal layer during bevacizumab-combined chemotherapy for recurrent ovarian cancer: A case report. Matsumoto T, Mizumoto Y, Nakade K, Obata T, Matsuoka A, Myojo S, Ono M, Nakamura M, Fujiwara H. Mol Clin Oncol. 2017 Nov;7(5):820-824. doi: 10.3892/mco.2017.1403. Epub 2017 Sep 1.

5. APOBEC3G is increasingly expressed on the human uterine cervical intraepithelial neoplasia along with disease progression. Iizuka T, Wakae K, Nakamura M, Kitamura K, Ono M, Fujiwara H, Muramatsu M. Am J Reprod Immunol. 2017 Oct;78(4). doi: 10.1111/aji.12703. Epub 2017 Jun 7.

6. FDG-PET-positive ovarian thecoma with GLUT5 expression: Five cases. Bono Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Iwadare J, Obata T, Fujiwara H. J Obstet Gynaecol Res. 2017 Mar;43(3):599-603. doi: 10.1111/jog.13243. Epub 2016 Dec 17.

7. Synchronous endometrioid adenocarcinomas in the uterine cervix and corpus. Obata T, Nakamura M, Mizumoto Y, Matsumoto T, Takakura M, Fujiwara H. J Obstet Gynaecol Res. 2016 Oct;42(10):1390-1394. doi: 10.1111/jog.13049. Epub 2016 Jun 29.

8. Wakae K, Aoyama S, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Monjurul AM, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Kukimoto I, Yamaguchi K, Shigenobu S, Nishiyama T, Muramatsu M. Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by Next-Generation Sequencing. Virology. 2015 Nov;485:460-6. doi: 10.1016/j.virol.2015.08.017.

9. Kyo S, Mizumoto Y, Takakura M, Nakamura M, Sato E, Katagiri H, Ishikawa M, Nakayama K, Fujiwara H. Nerve-sparing abdominal radical trachelectomy: a novel concept to preserve uterine branches of pelvic nerves. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2015 Oct;193:5-9. doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.06.029.

10. Yamazaki R, Inokuchi M, Ishikawa S, Myojo S, Iwadare J, Bono Y, Mizumoto Y, Nakamura M, Takakura M, Iizuka T, Ohta T, Fujiwara H. T amoxifen-induced ovarian hyperstimulation during premenopausal hormonal therapy for breast cancer in Japanese women. Springerplus. 2015 Aug 19;4:425. doi: 10.1186/s40064-015-1223-0.

〔学会発表〕(計3件)

1. ハイリスク HPV14 種類を9つに判別する新規 HPV 簡易ジェノタイピング試薬の臨床評価  
中村 充宏、水本 泰成、高倉 正博  
第58回日本臨床細胞学会総会春季大会  
平成29年5月26日～28日 大阪国際会議場  
(大阪市)

2. E6/E7 遺伝子をターゲットとした新規 HPV

### 簡易ジェノタイピング試薬の臨床的検討

中村 充宏、高倉 正博、水本 泰成、山崎  
玲奈、岩垂 純平、保野 由紀子、折坂 俊  
介、小幡 武司、松本 多圭夫、飯塚 崇、  
鏡 京介、藤原 浩

### 第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会

平成 28 年 7 月 8 日～10 日 米子コンベンシ  
ョンセンター(米子市)

### 3. 子宮内膜癌における分子標的治療の有効 性に関する検討

中村 充宏、高倉 正博、水本 泰成、保野  
由紀子、京 哲、藤原 浩

### 第 67 回日本産科婦人科学会総会学術講演会

平成 27 年 4 月 10～12 日 パシフィコ横浜(横  
浜市)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 充宏(NAKAMURA MITSUHIRO)  
金沢大学・附属病院・講師  
研究者番号・50377397

### (2) 研究分担者

藤原 浩 (FUJIWARA HIROSHI)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号・30252456

尾崎 聡(OZAKI SATOSHI)  
金沢大学・保健学系・助教  
研究者番号・40401921  
平成 28 年度まで分担者

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

該当なし