

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10712

研究課題名(和文) 分葉状子宮頸管腺過形成(LEGH)の自然史と悪性化に関わる因子の探索

研究課題名(英文) The search for natural history and factors involved in malignant transformation of lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH)

研究代表者

高津 亜希子 (Takatsu, Akiko)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90447730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：1年以上の観察研究を行った分葉状頸管腺過形成(LEGH)43例中、2例が異型を伴うLEGH、1例が胃型粘液性癌(GAS)への進行を認め、悪性化の徴候として、病変の増大と細胞診所見の悪化は特に重要と考えられた。細胞間接着に関与するCTNNB1タンパク膜発現は、GASではLEGHより有意に減弱しており、GAS発生に重要な役割をもつと考えられた。胃型ムチンのGlcNAcと、その生成に関わる糖転移酵素4GnTの発現は、LEGHとGASに特異的に認めるが、GASではLEGHより有意に発現が減弱していた。これらの発現減弱はLEGHとGASを鑑別する診断マーカーとしても有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Of 43 cases of lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH) with more than 12 months of the observation period, 2 cases were progressing to "LEGH with atypia" and 1 case was to "gastric-type mucinous carcinoma (GAS)". These cases suggest that the enlarging cervical lesion and the aggravation of cytology may be the important signs suggesting a malignant transformation of LEGH. Membrane expression of the CTNNB1 protein involved in intercellular adhesion was significantly attenuated in GAS compared with LEGH. This CTNNB1-downregulation may have an important role in the development of GAS. Expression of GlcNAc in gastric mucin and 4GnT, a glycosyltransferase involved in the GlcNAc production, is specifically observed in LEGH and GAS; however, those expressions were significantly attenuated in GAS compared with LEGH. The attenuation of GlcNAc and 4GnT expression may be a useful marker supporting the distinguishment of GAS from LEGH.

研究分野：産婦人科学、婦人科腫瘍学

キーワード：分葉状頸管腺過形成 胃型粘液性癌 子宮頸癌 頸管細胞診 核磁気共鳴画像 胃型ムチン CTNNB1  
GlcNAc

### 1. 研究開始当初の背景

良性疾患である分葉状頸管腺過形成 (LEGH) と、子宮頸部悪性腺腫 (MDA) を含めた胃型粘液性癌 (GAS) はともに子宮頸部に多嚢胞性病変を形成し、水様性帯下や子宮頸部の腫大を示し、HIK1083 ラテックス凝集反応等で検出可能な胃幽門腺型粘液を産生するといった似通った臨床的特徴を示し (Am J Surg Pathol, 2000) 鑑別が困難な疾患である。また組織学的には両者とも正常頸管腺に類似した腺構造の増殖を主徴とし、生検組織診でも鑑別が困難な場合があるが、LEGH は細胞異型がなく良性であるのに対し (Am J Surg Pathol, 1999) MDA は軽度の細胞異型と間質浸潤を伴う高分化型の腺癌として定義される (Am J Obstet Gynecol, 1975)。最近、MDA は GAS として分類されるようになったが (WHO classification 2014) GAS は抗癌剤や放射線治療に抵抗性を示す悪性度が高い腫瘍であることも明らかにされてきた。LEGH および MDA/GAS に適切な治療を行うには、正確な術前鑑別診断が必要である。我々は平成 17-18 年に、日本産婦人科学会の公募研究として「子宮頸部悪性腺腫 (adenoma malignum) およびその類縁疾患の術前診断および治療法のガイドライン確立に向けた多施設共同研究」を施行した。その結果、細胞診による細胞異型度、MRI 画像などから、精度約 90% で LEGH と MDA/GAS を術前診断することが可能であることを示した (Int J Gynecol Pathol, 2011)。

LEGH と臨床診断して、子宮摘出をせずに経過観察を行った場合、問題となるのが悪性化の可能性である。MDA/GAS の多くは LEGH を伴っており、LEGH がこれらの前駆病変である可能性が指摘されてきた。LEGH の腫瘍性性格を明らかにするために、LEGH 病変のクロナリティー解析を行ったところ、LEGH には癌化に繋がる可能性のある単クローン性のもと、非腫瘍性である多クローン性のもが存在することが示された (Virchow Arch, 2013)。

一方、LEGH からの癌化の頻度や癌化までの期間は明らかになっていない。また、LEGH の経過観察を行う場合、癌化の可能性に注意を払う必要があるが、癌化の早期段階を示す徴候が明らかにはされていない。こういった背景から、LEGH の自然史を明らかにする必要があり、また、癌化の徴候やあらたな癌化マーカーの同定は重要な課題であるといえる。

### 2. 研究の目的

本研究では以下のことを目的とする。

- 1) LEGH と臨床診断し、経過観察している症例の経過を通して、悪性化の頻度や悪性化までの時間といった、LEGH の自然史解明と腫瘍化 (癌化) の初期サインを見出す。
- 2) LEGH と MDA/GAS/腺癌の鑑別診断や癌化の早期診断に役立つバイオマーカーを見出す。

### 3. 研究の方法

- 1) 臨床診断法の精度の検討と follow-up への適用

図 1 に我々の行う臨床診断法を示す。MRI、頸管細胞診、胃型ムチン検出検査により子宮頸部多嚢胞性病変の臨床診断を行い (Int J Gynecol Pathol, 2011)、子宮全摘例については病理診断との対比を行った。臨床診断 LEGH で follow-up を希望された場合には 3~6 か月毎に頸管細胞診、胃型ムチン検査と経膈エコーによる病変の大きさの評価を行い、それらに異常がなくても MRI を 1~2 年毎に施行し、それらにより臨床診断を繰り返し行い、MDA/GAS/腺癌疑いとなれば、子宮摘出に方針転換した。

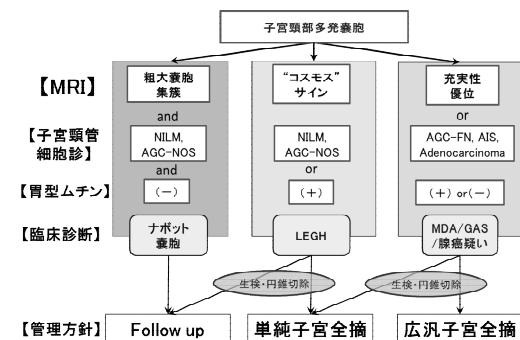


図 1: 子宮頸部多嚢胞性病変の臨床診断法と管理方針

- 2) GNAS 変異解析

GNAS は G 蛋白経路を活性化する蛋白であるが、LEGH などでの変異が知られている。LEGH:10 例、異型を伴う LEGH:5 例、MDA:2 例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片より、各病変部分を laser microdissection (LM) で正確に採取し、ゲノム DNA を抽出して、exon8~9 の sequencing (Am J Surg Pathol 2014) を Sanger 法で行った。

- 3) CTNNB1 タンパク膜発現の検討

細胞間接着に關与する CTNNB1 タンパクの膜発現について、LEGH および子宮頸部腺癌 52 例 { 通常型腺癌 (UEA) 25 例、GAS11 例、その他 16 例 } の FFPE 切片を用いて、免疫染色で評価し、予後との関連を検討した。染色の評価は IRS (immunoreactive score [0-12]) = positiviti (陽性細胞率 0: <1%, 1: 1-25%, 2: 26-50%, 3: 51-75%, 4: >75%) × intensity (発現強度 0: なし, 1: 低度, 2: 中等度, 3: 高度) で行った。また CDH1 蛋白発現との相関を検討した。

- 4) MUC6、4GnT、GlcNAc 発現の検討

LEGH、MDA/GAS に特徴的な胃型ムチンはムチンコアタンパク質である MUC6 末端に、1,4-N-acetylglucosaminyltransferase (4GnT) という糖転移酵素が働き、1,4-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc)

が転移したものである。正常を含めた子宮頸部腺系病変 86 例 (正常頸管腺 11 例、UEA 22 例、GAS 12 例、分葉状頸管腺過形成 [LEGH] 25 例、子宮頸部上皮内腺癌 16 例) における、MUC6、4GnT、GlcNAc の発現を免疫組織化学的に評価し、予後との関連を臨床病理学的因子と合わせて検討した。

#### 4. 研究成果

1) 臨床診断法は follow-up 管理に有効である。

子宮頸部多嚢胞性病変を示した 94 例の初回臨床診断は、ナボット嚢胞 (NC): 25 例、LEGH: 59 例、MDA/GAS/腺癌疑い: 10 例であった。MDA/GAS/腺癌疑いは全例子宮全摘を行い、MDA/GAS/腺癌 7 例、LEGH 3 例であった。一方、LEGH のうち 10 例が子宮全摘術を受け全例が LEGH であった。この症例群における悪性例の陽性的中率 100%、陰性的中率 100% であり、臨床診断法は悪性の鑑別に有効と考えられた。

NC 25 例全例、LEGH 49 例が経過観察を希望した。経過観察期間が 1 年以上 (1~10 年) の症例について検討すると、NC 18 例は全例所見に変化なく臨床診断も NC のままであった。一方、LEGH 42 例中 38 例は病状に変化なく、3 例に別疾患で子宮全摘が施行されたが、3 例とも子宮頸部多嚢胞性病変は LEGH であった。LEGH 4 例に病変の増大を認め、うち 1 例は細胞診が AGC-FN となり、臨床診断が MDA/GAS/腺癌疑いとなった。これら 4 例について子宮全摘術を行ったところ、MDA/GAS/腺癌疑いとなった 1 例は MDA/GAS であったが、LEGH を伴っており、LEGH から癌化に至ったと考えられた。そのほか異型を伴う LEGH (LEGH with atypia: 細胞異型を伴い、より前癌病変としての意義が大きいとされる) 2 例、NC 1 例であった。このことから、臨床診断法は LEGH の follow-up にも有用であり、病変の増大と細胞診所見の悪化が特に重要と考えられた。

また、LEGH の自然歴として MDA/GAS への進行は 1 例に認められたのみであり、症例数が少ないことから確定的ではないが、癌化は数年で数%程度であろうと考えられる。LEGH を follow-up することは許容されるのではないだろうか。

2) GNAS 変異解析結果

GNAS 変異は LEGH with atypia の 2 例に認められた、いずれも R201 のアミノ酸置換を伴う missense 変異であった。一方、併存する LEGH without atypia 部分や、LEGH 症例では認められなかった。このことから GNAS 変異は LEGH 悪性化の初期段階に関連している可能性があると考えられた。

3) CTNNB1 タンパク膜発現の検討結果

子宮頸部腺癌のうち、GAS (median=4) では UEA (median=12) に比較して有意に CTNNB1 タンパク膜発現が減弱していた (図 2)。ま

た LEGH では高発現しており、CTNNB1 タンパク膜発現低下は GAS 発生に関与している可能性が考えられた。

GAS において CTNNB1 タンパク膜発現低下例は無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) の有意な短縮が認められた (図 3)。GAS における CTNNB1 タンパク膜発現は CDH1 蛋白発現と強く相関しており (Spearman:  $r=0.731$ ,  $p=0.011$ )、CTNNB1 タンパク膜発現低下が CDH1 蛋白発現低下から、上皮間葉転換 (EMT) を引き起こし、浸潤・転移促進から予後不良となる可能性が考えられた。

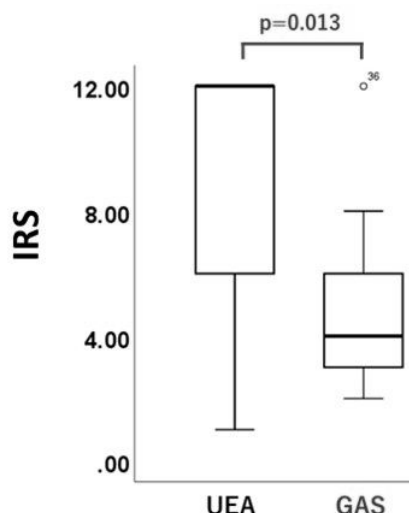


図 2 : UEA、GAS における CTNNB1 タンパク膜発現の IRS score (箱ひげ図)

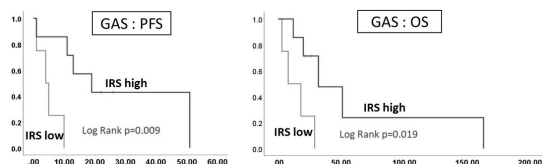


図 3 : GAS 症例の CTNNB1 タンパク膜発現による累積生存率 (Kaplan-Meier 法)

4) MUC6、4GnT、GlcNAc 発現の検討結果

MUC6 は、LEGH や GAS だけでなく、UEA や正常頸管腺においても発現を認めた。一方、4GnT や GlcNAc は、GAS や LEGH で発現を認めたが UEA や正常頸管腺では認めなかった。腺領域面積に対する発現面積のスコアリング (0: 10%未満、1: 10-33%、2: 34-66%、3: 67%以上) では、4GnT や GlcNAc は、GAS においては LEGH より有意に低発現であった ( $P<0.001$ )。また GAS においては 4GnT および GlcNAc の発現低下例は有意に生存期間が短縮していた ( $P=0.028$ ) (図 4)。一方で、MUC6 ではこうした結果は得られなかった。これらの結果から、4GnT と GlcNAc は LEGH と GAS の鑑別診断補助マーカーとして、また GAS の予後マーカーとして機能する可能性が示唆された。

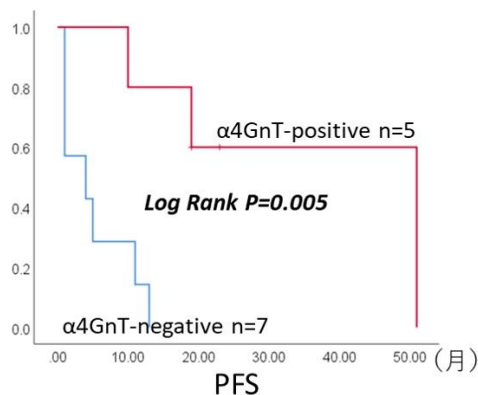


図4： 4GnT発現の有無によるGAS症例の無増悪生存期間の変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- (1) 小原久典, 鹿島大靖, 塩沢丹里. Multiple vesicular pattern: 子宮の病変. 画像診断 (査読なし) 2017年37巻9号 pp.961-961
- (2) Ando H, Miyamoto T, Kashima H, Higuchi S, Ida K, Mvunta DH, Shiozawa T. Panobinostat Enhances Growth Suppressive Effects of Progestin on Endometrial Carcinoma by Increasing Progesterone Receptor and Mitogen-Inducible Gene-6. Horm Cancer. 査読有 2017; Vol.8(4): 257-267.
- (3) Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ando H, Higuchi S, Ida K, Kashima H, Shiozawa T. Overexpression of SIRT1 is Associated With Poor Outcomes in Patients With Ovarian Carcinoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 査読有 2017; Vol.25(6):415-421.
- (4) Mvunta DH, Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ando H, Higuchi S, Ida K, Kashima H, Shiozawa T. SIRT1 Regulates the Chemoresistance and Invasiveness of Ovarian Carcinoma Cells. Transl Oncol. 査読有 2017; Vol.10(4):621-631.
- (5) Ando H, Miyamoto T, Kashima H, Takatsu A, Ishii K, Fujinaga Y, Shiozawa T. Usefulness of a management protocol for patients with cervical multicystic lesions: A retrospective analysis of 94 cases and the significance of GNAS mutation. J Obstet Gynaecol Res. 査読有 2016; Vol.42(11):1588-1598.

(6) 鹿島大靖, 塩沢丹里. 子宮頸部嚢胞性病変の治療と管理. 臨床婦人科産科 (査読なし) 2016年 Vol.70 No.8

(7) Yamada Y, Miyamoto T, Kashima H, Kobara H, Asaka R, Ando H, Higuchi S, Ida K, Shiozawa T. Lipocalin 2 attenuates iron-related oxidative stress and prolongs the survival of ovarian clear cell carcinoma cells by up-regulating the CD44 variant. Free Radic Res. 査読有 2016; Vol.50(4):414-25.

(8) Asaka R, Miyamoto T, Yamada Y, Ando H, Mvunta DH, Kobara H, Shiozawa T. Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target. Lab Invest. 査読有 2015; Vol.95(12):1363-73.

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Koichi Ida, Tsutomu Miyamoto, Hirofumi Ando, Ryoichi Asaka, Yasushi Yamada, Hodaka Takeuchi, Tanri Shiozawa. Mutation analysis by whole exome sequencing of endometrial hyperplasia and carcinoma from one patient. The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology 2017年
- (2) Koichi Ida, Tsutomu Miyamoto, Shotaro Higuchi, Hirofumi Ando, Ryoichi Asaka, Yasushi Yamada, Hiroyasu Kashima, Hisanori Kobara, David Hamsi Mvunta, Tanri Shiozawa: Mutation analysis by whole exome sequencing of endometrial hyperplasia and carcinoma in one patient. 日本癌学会 2017年
- (3) 安藤大史, 宮本強, 高津亜希子, 山田靖, David Mvunta Hamisi, 樋口正太郎, 井田耕一, 鹿島大靖, 塩沢丹里. 子宮頸部多嚢胞性病変に対する当科の対応と転帰 94例の後方視的検討とGNAS遺伝子変異の意義 中日本産婦人科セミナー 2016年
- (4) 宮本強: 子宮頸部嚢胞の取扱い. 第130回関東連合産科婦人科学会学術集会 2015年

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高津 亜希子 (TAKATSU AKIKO)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90447730

(2)研究分担者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号：20235493

宮本 強 (MIYAMOTO TSUTOMU)  
信州大学・学術研究院医学系・准教授  
研究者番号：70418721

安藤 大史 (ANDO HIROFUMI)  
信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)  
研究者番号：80722925