

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10715

研究課題名(和文) 子宮頸部神経内分泌腫瘍の発生メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism for development of neuroendocrine tumor of the uterine cervix

研究代表者

上田 豊 (Ueda, Yutaka)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10346215

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)：神経内分泌腫瘍領域と腺癌領域が併存する子宮頸部腫瘍におけるそれぞれの領域のクロナリティー解析を行い、両領域が単一細胞由来として矛盾しない結果であることを明らかにした。さらに両領域からCTOS (cancer tissue originated spheroid) を樹立し、神経内分泌腫瘍と腺癌の分化に関わる遺伝子Xを同定した。

ついで、神経内分泌領域から樹立したCTOSを利用して、子宮頸部と肺の神経内分泌腫瘍に共通して特に高発現している蛋白質を16種類同定した。子宮頸部神経内分泌腫瘍は、子宮頸部腺癌より肺の神経内分泌腫瘍に近い蛋白質発現パターンを示し、臓器を超えた類似性が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Clonality analysis demonstrated that coexisting neuroendocrine and adenocarcinoma regions were derived from a single cell. CTOS (cancer tissue originated spheroid) was established from both areas and gene X involved in differentiation of neuroendocrine tumor and adenocarcinoma was identified.

Sixteen types of proteins which were highly expressed in neuroendocrine tumors of both uterine cervix and lung were identified. Cervical neuroendocrine tumor exhibited a similar expression pattern of proteins to neuroendocrine tumor of lung, showing similarity beyond the organs.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：婦人科腫瘍 子宮頸部神経内分泌腫瘍

1. 研究開始当初の背景

婦人科腫瘍においても、様々な基礎的・臨床的研究により、発生機序の解明や新規治療法の開発がなされてきている。それらの研究において特に重要なのは臨床情報と組織検体であり、それ故、希少癌では研究がなかなか進んでいないのが実情である。その一つが神経内分泌腫瘍である。神経内分泌腫瘍、特に小細胞癌は肺に発生する頻度が高いが、進行が急速なために手術適応になることが少なく、摘出組織を使った研究も必ずしも進んでおらず、限られた知見しか存在しない(D'Angelo et al. *Cancer Biol Ther.* 2010;10:1-10. Review)。子宮頸部においては発生頻度が子宮頸癌全体の3%程度と少なく、発生メカニズムなどは、HPV感染を比較的高頻度に認める(Wang et al. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:901-8)以外、十分に解明されていない。

予後が極めて不良である子宮頸部神経内分泌腫瘍に対しては、今後有効な分子標的治療を開発していく必要があるが、そのためにも発生メカニズムの解明は極めて重要である。その発生メカニズムの解析において注目すべき点が、神経内分泌腫瘍が腺癌と共存している症例の報告である(Alphandery et al. *Acta Cytol.* 2007;51:589-93, Yasuoka et al. *Int J Gynecol Pathol.* 2013;32:416-20等)。神経内分泌腫瘍が腺癌と共通のoriginから発生するのか、あるいは単に共通のinitiatorであるHPV感染を機にそれぞれ別に独立して発生して合併しているだけなのか。他臓器症例も含め、これまでの報告はいずれも単一細胞由来を示唆するものである(Alphandery et al. *Acta Cytol.* 2007; 51: 589 -93 Yasuoka et al. *Int J Gynecol Pathol.* 2013;32:416-20, D'Adda et al. *J Pathol.* 1999;189:394-401, Sauer et al. *Prostate.* 2006;66:227-34, Wang et al., *World J Gastroenterol.* 2013;19:5340-6)。

これまで我々は、婦人科腫瘍に対するアンドロゲン受容体遺伝子の不活化のパターンを利用したクロナリティー解析により、婦人科癌の前癌病変の腫瘍性格の解析を行ってきた(Lab Invest. 2003;83:1517-27, *Am J Clin Pathol.* 2004;122:266-74, *Int J Gynecol Pathol.* 2007;26:180-7, 等)。更にこの手法を応用して、子宮頸部の扁平上皮系病変(扁平上皮癌・CIN)と腺系病変(腺癌・AIS・glandular dysplasia)の共存症例においては、両病変が共通の型のHPVによってそれぞれ別個に発生すること、一方、腺扁平上皮癌は両成分が共通のoriginから発生している可能性が高いことを他に先駆けて証明した(*Am J Clin Pathol.* 2008;130:389-400)。

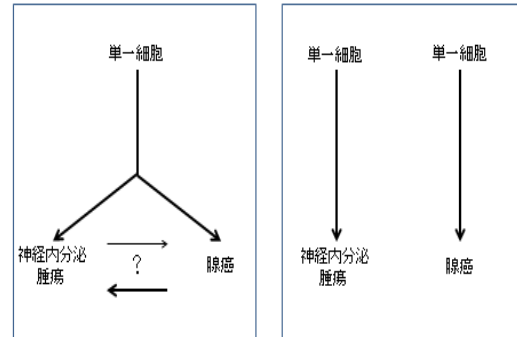
2. 研究の目的

今回、このクロナリティー解析を利用して、子宮頸部に発生する神経内分泌腫瘍と腺癌の発生メカニズム(単一細胞から発生して両方に分化するのか、異なる細胞に由来して別個に発生するのか)を解析することとした。また、希少癌においては、他の一般的な癌腫に比して特異的な遺伝子融合が高確率に検出される傾向が見られる。そこで、子宮頸部神経内分泌腫瘍においても遺伝子融合を網羅的に解析する。検出された融合遺伝子を腺癌でも解析することで、神経内分泌腫瘍と腺癌の発生に関係をより詳細に解明できるものと考える。

3. 研究の方法

<平成 27 年度>

(1) アンドロゲン受容体遺伝子の不活化のパターンを利用したクロナリティー解析
神経内分泌腫瘍と腺癌が共存する症例において、ホルマリン固定パラフィン包埋切片から microdissection にて両病変部分を回収し、DNA を抽出。両病変組織でのアンドロゲン受容体遺伝子の遺伝子のメチル化状態を制限酵素による切断長を利用した PCR-RFLP 法を用いて解析し、それら病変が単一細胞由来か、別個の細胞から独立して発生したのかを明らかにする。



(2) 次世代シーケンサーを用いた融合遺伝子解析

腺癌を共存しない一般的な神経内分泌腫瘍で、凍結標本組織が十分量存在する症例において、神経内分泌腫瘍組織から RNA を抽出しライブラリーを作成、次世代シーケンサーにて融合遺伝子を網羅的に探索し(RNA-seq) 融合遺伝子解析ソフトにより融合遺伝子を検出する。

<平成 28 年度>

(3) 神経内分泌腫瘍単独症例・腺癌単独症例における上記遺伝子融合の頻度の解析
平成 27 年度計画(2)で検出された遺伝子融合を、それぞれと共存しない単独の神経内分泌腫瘍症例(凍結標本組織量が少ない症例を追加)および腺癌症例において、RT-PCR 法にて解析し、一般の神経内分泌腫瘍および腺癌に

おける同遺伝子融合の検出頻度を解析する。

(4) 神経内分泌腫瘍・腺癌共存症例における遺伝子融合の比較解析

同様に平成 27 年度計画(2)で検出された遺伝子融合を、神経内分泌腫瘍と腺癌が共存する症例の両病変においても RT-PCR 法にて解析し、神経内分泌腫瘍・腺癌共存症例における両病変の関係をさらに明確にする。

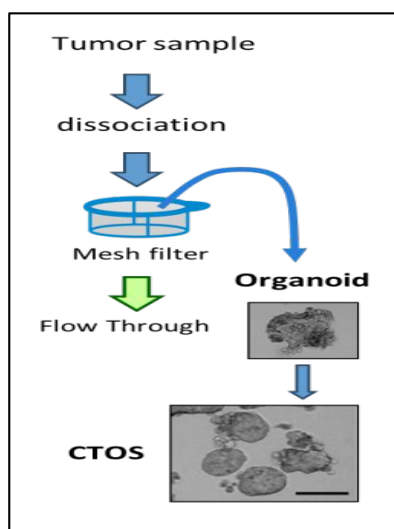
<平成 29 年度>

(5) 検出された融合遺伝子の役割の解析

子宮頸部神経内分泌腫瘍の臨床検体から樹立した CTOS (cancer tissue-originated spheroid) を用いて、上記で検出された遺伝子の、神経内分泌腫瘍の発生における役割を明らかにする。すなわち、増殖能・浸潤能・転移能などを与える影響を解析する。また化学療法抵抗性・放射線療法抵抗性に関わるメカニズムや予後との相関を解析する。

(6) 分子標的治療開発へつなげるための研究

上記遺伝子の上流遺伝子(蛋白質)・下流遺伝子(蛋白質)を解析し、標的とできる遺伝子(蛋白質)を検索する。

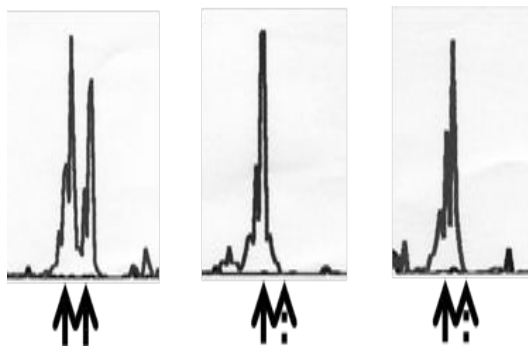


4. 研究成果

(1) アンドロゲン受容体遺伝子の不活化のパターンを利用したクロナリティー解析

神経内分泌腫瘍領域と腺癌領域の混在する腫瘍 4 症例において、それぞれの領域のクロナリティーを解析したところ、いずれも神経内分泌腫瘍領域と腺癌領域が同一のクロナリティーとして矛盾しないという結果であった。したがって、神経内分泌腫瘍領域と腺癌領域が単一の細胞から発生し、別の組織型に分化したと解釈できる。解析結果の例を如何に示す。

(正常頸部組織) (神経内分泌組織) (腺癌組織)



(2) 次世代シーケンサーを用いた融合遺伝子解析

(3) 神経内分泌腫瘍単独症例・腺癌単独症例における上記遺伝子融合の頻度の解析

(4) 神経内分泌腫瘍・腺癌共存症例における遺伝子融合の比較解析

(5) 検出された融合遺伝子の役割の解析

(6) 分子標的治療開発へつなげるための研究

これらについては、解析に足る症例の集積が困難で、やむを得ず(5)で計画していた手法を用いて、融合遺伝子に限定しない形で、神経内分泌腫と腺癌の分化に関わる遺伝子(蛋白質)の同定と、その機能解析等を行うこととした。

まず 4 症例を用いて、CTOS (Cancer Tissue Originated Spheroid) を樹立し、十分な遺伝子解析ができるようにした。すなわち、細胞株と同様に保存し、必要に応じて培養して使用できる状態にある。神経内分泌腫瘍と腺癌が共存する症例において、それぞれの病変から樹立できた CTOS を用いて、神経内分泌腫瘍と、それと共存する腺癌の網羅的遺伝子発現解析を行い、神経内分泌腫瘍と腺癌の分化に関わる遺伝子(遺伝子 X) を同定し、その遺伝子 X を制御する遺伝子(遺伝子 Y) を同定した。CTOS を利用して、遺伝子 X の導入による神経内分泌腫瘍細胞から腺癌細胞への組織誘導も確認できた(論文投稿中)。

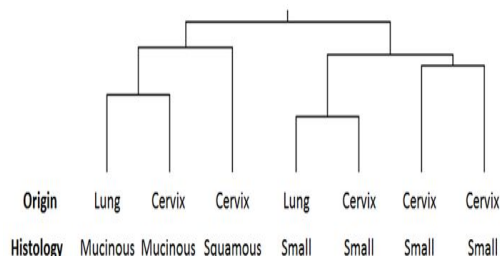
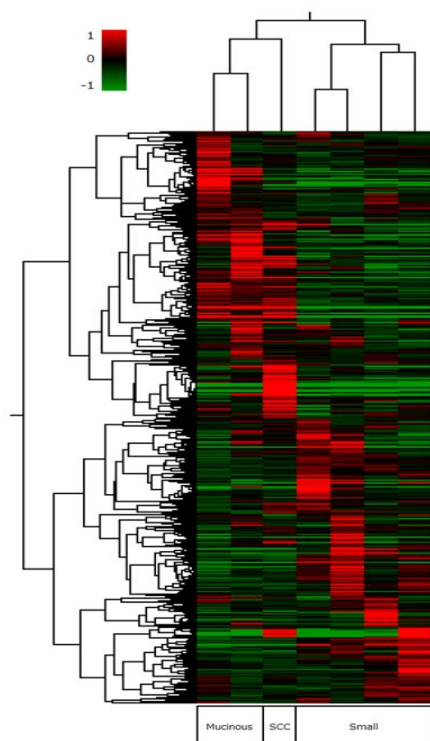
この遺伝子 Y は放射線感受性・化学療法感受性に関わる遺伝子として知られており、神経内分泌腫瘍における放射線抵抗性・化学療法抵抗性にも関与している可能性が示唆されるため、現在も引き続き解析を行っている。

さらに、神経内分泌領域から樹立した CTOS を利用して、子宮頸部神経内分泌腫瘍の分子生物学的特徴の解明を目指し、研究を行った。すなわち、子宮頸部の神経内分泌腫瘍(3 種)と腺癌(1 種)および扁平上皮癌(1 種)の発現蛋白質を iTRAQ 法にて解析し、これを肺の神経内分泌腫瘍(1 種)と扁平上皮癌(1 種)とも比較した。

Clinical characteristics of tumors CTOS were derived from			
Name of CTOS	Histology	FIGO Stage	Age
Cerv5	SMCC	IB2	47
Cerv9	SMCC	IB2	28
Cerv46	SMCC	IB2	35
Cerv44	SCC	IB2	49
Cerv23	MACC	IB1	29
LC26	SCLC	IA	68
LC193	MACL	IIB	68

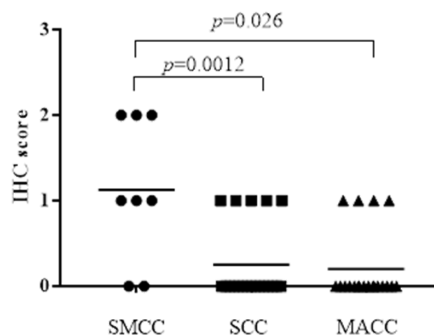
Abbreviations: SMCC, small cell carcinoma of the uterine cervix; SCLC, small cell lung carcinoma; SCC, squamous cell carcinoma of the uterine cervix; MACC, mucinous adenocarcinoma of uterine cervix; MACL, lung mucinous adenocarcinoma

これら CTOS において 3109 種類の蛋白質の発現を確認できた。これら蛋白質のうち、子宮頸部神経内分泌腫瘍で発現していた 44 種類の蛋白質は、肺の神経内分泌腫瘍での高発現が認められた一方、子宮頸部腺癌では低発現であった。同様に、子宮頸部神経内分泌腫瘍で発現していた 36 種類の蛋白質は、肺の神経内分泌腫瘍での高発現が認められた一方、子宮頸部および肺の扁平上皮癌では低発現であった。



この中で、子宮頸部と肺の神経内分泌腫瘍に共通して特に高発現している蛋白質を 16 種類同定した。これら蛋白質のうち、免疫組

織染色の抗体が利用可能であった 4 種類については、他の手術検体を用いてその発現を確認した。下にその 1 例を示す。



以上より、子宮頸部神経内分泌腫瘍は、子宮頸部腺癌より肺の神経内分泌腫瘍に近い蛋白質発現パターンを示し、臓器を超えた類似性が確認できた（論文投稿中）。

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）

〔学会発表〕(計 1 件)

Satoshi Kubota, Yumiko Kiyohara, Akiko Okazawa, Shinya Matsuzaki, Eiji Kobayashi, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Tadashi Kimura and Masahiro Inoue. Key role of Notch-ASCL1 pathway for trans-differentiation in a mixed small cell carcinoma/adenocarcinoma of uterine cervix. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 2017 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 豊 (UEDA, Yutaka)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10346215

(2) 研究分担者

吉野 潔 (YOSHINO, Kiyoshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90362730

小林 栄仁 (KOBAYASHI, Eiji)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50614773

松崎 慎哉 (MATSUZAKI, Shinya)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00467565