

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10732

研究課題名(和文) CAGE法を用いた子宮体癌におけるリンパ節転移予測マーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of biomarkers to diagnose lymph node metastasis based on gene expression patterns in primary lesion of endometrial carcinoma

研究代表者

寺尾 泰久 (TERAO, YASUHISA)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：00348997

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)：子宮体癌リンパ節転移陽性群と陰性群でがん原発巣の遺伝子発現を、Cap Analysis of Gene Expression法を用いて、遺伝子発現の高解像度測定をゲノム全体に渡って実施した。SEMA3DとTACC2新規アイソフォームが子宮体がんのリンパ節転移診断のバイオマーカーになりうることを明らかにした。この結果は子宮体がんの簡便・高精度・低侵襲なリンパ節転移診断を可能とし、リンパ節郭清術の適応を症例ごとに決定する個別化医療の実現に貢献する。

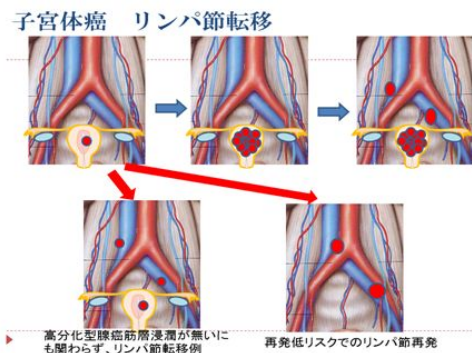
研究成果の概要(英文)：Lymphadenectomy in endometrial carcinoma (EM Ca) should be performed based on the risk of lymphatic metastasis. We attempted to identify biomarkers to diagnose lymphatic metastasis based on gene expression patterns in the primary lesion of EM Ca. Genome-wide gene expression was analyzed using cap analysis gene expression in lymphatic metastasis-negative (LN-) and metastasis-positive (LN+) cases with EM Ca G1 with less than 1/2 myometrial invasion. Candidate genes used to distinguish between LN-/LN+ were identified and verified by RT-qPCR. SEMA3D and TACC2 with a novel transcription start site (novel TACC2) were identified as biomarkers with the highest diagnostic accuracy. SEMA3D was highly expressed in LN-, while novel TACC2 was highly expressed in LN+. SEMA3D and novel TACC2 were identified as biomarkers to evaluate lymphatic metastasis in EM Ca. This finding paves the way for pre-operative lymphatic metastasis diagnoses and the realization of individualized surgical methods.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮体癌 リンパ節転移 CAGE法 トランスクリプトーム リンパ浮腫 個別化医療

### 1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は近年増加しており、婦人科悪性腫瘍で最も多い癌である。子宮体癌は術前に子宮内膜生検を行うことで、術前診断可能であるが、病期分類は子宮全摘出術、両側付属器切除術、後腹膜リンパ節郭清を行って病期を決定している。子宮体癌は臨床病理学的にはエストロゲン依存性の予後良好な type1 (高・中分化型類内膜腺癌) と、エストロゲン非依存性の予後不良の type2 (低分化型類内膜腺癌、漿液性腺癌、明細胞癌) に分けられる。type1 の高分化型子宮体癌においては、筋層浸潤を認めてもほとんどがリンパ節転移陰性であるが、筋層浸潤が無いにも関わらず、まれにリンパ節転移陽性例が存在する。つまり、ほとんどの高分化型子宮体癌はリンパ節転移陰性であるにもかかわらず、マイナーな転移の疑いを排除できないため不要なリンパ節郭清を実施しているのが現状である。リンパ節郭清に伴う手術時間の延長、出血量の増加、皮膚切開の延長、リンパ浮腫、リンパ嚢胞などの合併症があり、患者の QOL の観点から考えると不要なリンパ節郭清を避けられることが望ましい。



上段：一般的に子宮体部の腫瘍量が増え、腫瘍が大きくなりその後にリンパ節転移を起こす。

下段：子宮体部の腫瘍量がほとんどないにもかかわらず、まれに早期からリンパ節転移する。あるいは再発低リスク群と考えられていたものが、リンパ節に再発することが稀にある。

手術前にリンパ節転移を予測できるバイオマーカーがあれば、リンパ節郭清を省略することができ、合併症をなくすなど患者さんにとって大きな利益になる。また、摘出したリンパ節に転移がなくても特異的なマーカーが上昇しているような場合には化学療法を追加したり、経過観察中にこのマーカーが上昇した場合には再発診断に有用な情報と成り得るなど様々なことに応用できる。

次世代シーケンサー (NGS) 登場以前に完全長 cDNA を作成する技術が開発され、研究分担者らによって遺伝子の転写開始点を網羅的に解析する手法である CAGE 法 (cap analysis of gene expression 法) が開発さ

れた (Shiraki T et al. Proc Natl Acad Sci USA 100: 15779-15781, 2003)。転写開始点解析法 CAGE 法は、5' -末端に Cap 構造を持つ RNA 断片 (数十~数百塩基長) の塩基配列を調べることで、ある遺伝子が持つ複数の転写開始点の中でどの開始点がより多く使用されているかを明らかにすることができる。対象遺伝子の転写開始点が組織により異なれば、異なる遺伝子発現制御ネットワーク下にあることを意味することから、細胞の特徴を敏感に反映するプロモーターの同定が期待される (The ENCODE Project Consortium, Nature 489, 57-74. 2012)。プロモーター活性を網羅的に測定することは CAGE 法以外 (マイクロアレイや RNA-seq, ゲノムシーケンシング等) では困難である。CAGE 法による発現を 2 群間 (子宮筋層浸潤が 1/2 以下の子宮体癌 G1 (高分化型腺癌) でリンパ節転移なしと転移あり) で比較解析することで今まで指摘されることのなかったリンパ節転移の新たな診断や治療法に臨床応用できるとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、リンパ節転移を促進する遺伝子を CAGE 法という手法を用いて網羅的に解析し、リンパ節転移を予測するバイオマーカーを確立する。現在は術前にリンパ節転移有無を予測・評価できないが、これを可能にするシステムがあれば不要なリンパ節郭清術は省略でき、患者 QOL の向上が期待できる。申請者らが実施した手術組織検体を用い CAGE 法を行った予備実験では、リンパ節転移陽性例と陰性例では数百の転写開始領域の活性が二群間で異なることを既に見いだしている。これらはすべて、術前リンパ節転移を予測可能にするバイオマーカー候補ではあるが、臨床応用のためには (i) より多くの検体を用いた候補の絞り込み、(ii) 候補遺伝子の機能解析、(iii) 術前生検組織を用いた検証実験、が必須である。

### 3. 研究の方法

不要なリンパ節郭清術を省略し、患者 QOL 向上に向けて、本研究では遺伝子の転写開始点を網羅的に解析する CAGE 法を用いて、子宮体癌のリンパ節転移に関わる遺伝子群をゲノムワイドに探索し、リンパ節転移の有無を判別可能にする遺伝子の単離を行い、その遺伝子解析を行うことを今回のゴールとしている。このゴールにむけて目標 - を設定し戦略的にアプローチする。

(1) リンパ節転移陽性と陰性の手術組織検体を用い、転写開始点を網羅的に解析する CAGE 法を行い、リンパ節転移に関わる遺伝子群をゲノムワイドに探索する。

(2) (1) の結果よりリンパ節転移予測候補遺伝子の絞り込みを行う。

(3) 臨床検体での検討を行う。

(4) リンパ節転移能獲得機構の解明を行

う。

(1) 本研究においては nAnT-iCAGE 法 (非増幅) を使用したライブラリ調製を行い, NGS は HiSeq2000 を使用し, 1) 子宮体癌組織より RNA の抽出 2) ライブラリ調製 3) CAGE データの処理 4) データ解析を行う。

(2) 用いる組織は子宮筋層浸潤が 1/2 以下の子宮体癌 G1 (高分化型腺癌) でリンパ節転移なしと転移ありの組織を使用する。得られた網羅的な転写開始活性データを用いて、リンパ節転移陽性例・陰性例の間で確実に異なる転写開始領域を絞り込む。発現差に関する有意性、発現量、その分類能力等を用いて数十の候補まで絞りこむ。

(3) 臨床検体で qRT-PCR や免疫染色等の手法を用いて検証実験を行う。統計解析により上記蛋白発現レベルと組織型・組織分化度・進行期・再発の有無・予後との関連を検討する。

(4) リンパ節転移能獲得機構の解明

増殖因子・サイトカインであれば、子宮体癌細胞株の培養液に添加し、細胞特性の変化 (細胞特性・運動能・浸潤能等) を観察する。

膜表面受容体や転写因子であった場合は、その遺伝子の cDNA を発現ベクターに組み込み形質導入し過剰発現細胞を作製後、その細胞特性の変化を観察する。変化をきたした細胞内で作用するシグナル経路を解明する。

上記の結果、リンパ節転移の特性に関与し有意に運動能を亢進させた因子を過剰発現する子宮体癌細胞株を樹立し、マウスに移植し転移能を解析する。

上記因子の機能や発現を阻害する薬剤、中和抗体があれば、それを投与し転移能が抑制されるかを検討し、新規治療薬の候補とする。

#### 4. 研究成果

倫理委員会承認後、115 例の子宮体癌組織を収集した。

(1) 筋層浸潤 1/2 以下の子宮内膜癌 G1 でリンパ節転移陰性 (LN-) 10 例と陽性 (LN+) 5 例に対して CAGE 法で LN-/LN+ の識別に有効な候補遺伝子群を抽出した。

6 つの遺伝子がリンパ節転移の有無を識別可能にする候補遺伝子として抽出された。

また、候補遺伝子のひとつである TACC2 は、リンパ節転移陽性の子宮体癌において既存のものとは全く異なる部分から活性化される新規転写開始点を有する TACC2 アイソフォーム (novel TACC2) を発見した。(図 2)

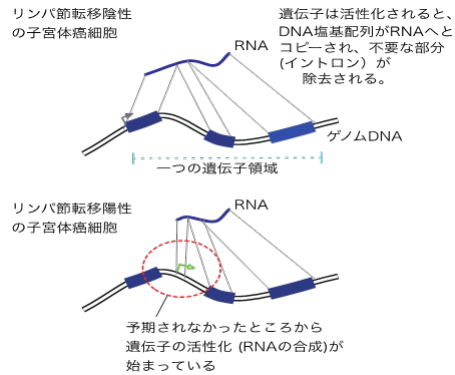


図 2 リンパ節転移陽性例では新規転写開始点から RNA が合成されていた。

(2) 上記の 6 つの候補遺伝子に対して、115 例の子宮体癌組織に対して qRT-PCR を行った。その結果、最も診断精度の高いバイオマーカーとして SEMA3D と新規転写開始点を有する TACC2 アイソフォーム (novel TACC2) を同定した。SEMA3D は LN 転移陰性群で高発現し ( $P < 0.001$ )、novel TACC2 は LN 転移陽性群で高発現であった ( $P < 0.05$ )。(図 3)

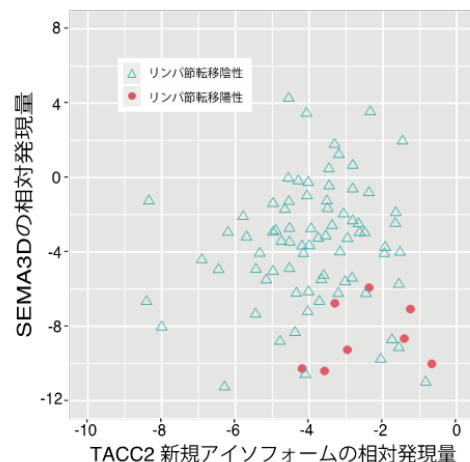


図 3 散布図

縦軸に SEMA3D、横軸に TACC2 新規アイソフォームのそれぞれ相対発現量を取り、リンパ節転移との関連性を示す。赤丸で示したリンパ節転移陽性群では、SEMA3D の発現が低く、TACC2 新規アイソフォームの発現が高い傾向を示した。

これら 2 遺伝子の発現量差を算出し、この値におけるリンパ節転移陽性群と陰性群の識別精度を ROC 曲線で示した。ROC 曲線の AUC は、SEMA3D と TACC2 新規アイソフォームの発現量を組み合わせると 0.929 と非常に高いリンパ節転移識別能を認めた。

(図 4)

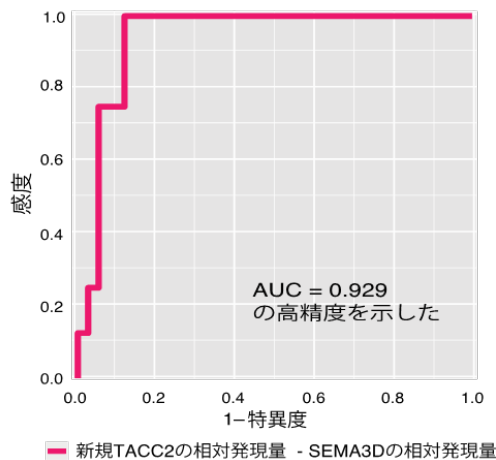


図4 ROC 曲線

本研究結果は、リンパ節転移診断マーカーとしてSEMA3D、novel TACC2を同定した。このリンパ節転移診断法は、原発巣の遺伝子発現量に基づく診断法であり、転移リンパ節を同定する他の診断法とは一線を画す新しい手法である。この結果は過剰なリンパ節郭清の回避を助ける診断法開発に可能性を開くものである。

#### 今後の展開：

実際の医療において問題となるのは、リンパ節転移陽性を誤って陰性と診断する偽陰性診断である。偽陰性診断によって、本来すべき術後治療が行われなかった場合、再発リスク増大という不利益が生じる。本マーカーは、偽陰性率が0%となる極限(感度100%、陰性的中率100%)にカットオフ値が設定できる可能性が示唆され、この精度をもって概算で年間8000例以上の過剰なリンパ節郭清術の回避と術後QOLの向上が期待できる。

子宮体癌において様々なリンパ節転移診断法の確立が試みられているが、一般的に臨床応用されている画像診断や腫瘍マーカーだけでは精度は十分ではない。センチネルリンパ節(SLN)診断は、近年検出技術の向上により感度97.2%、陰性的中率99.6%と非常に高い精度が認められ、診断法として期待されている。しかしSLN診断では検出のための薬剤投与などの追加処置が必要であり、負担追加や投与薬剤の副作用が生じることがある。我々が確立を目指す本マーカーを用いたリンパ節転移診断法は、癌原発巣の遺伝子発現評価によってリンパ節転移の有無を評価する革新的な方法であり、転移したリンパ節を検出する他の診断法とは全く異なる方法である。本研究は、リンパ節郭清術適用の個別化に貢献し、低侵襲化を実現しながらリンパ節転移診断を効率的かつ正確に実施できる可能性を有する。本研究によって従来の標準治療が“女性にやさしい個別化医療”に変わることが強く期待される。

今後このマーカーを利用した個別化術式を実現する術前リンパ節転移診断の確立を

目指したい。

#### 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)

Promoter-level transcriptome in primary lesions of endometrial cancer identified biomarkers associated with lymph node metastasis

Yoshida E, Terao Y, Hayashi N, Mogushi K, Arakawa A, Tanaka Y, Ito Y, Ohmiya H, Hayashizaki Y, Takeda S, Itoh M, Kawaji H. Sci Rep. 2017 Oct 26;7(1):14160. doi: 10.1038/s41598-017-14418-5.

〔学会発表〕(計 2件)

Identification of biomarkers to diagnose lymph node metastasis based on gene expression patterns in primary lesion of endometrial carcinoma

Yasuhisa Terao

The 20th ESGO International Meeting, 2017/11/04-07 Vienna Austria

Identification of biomarkers to diagnose lymphatic metastasis based on gene expression patterns in the primary lesion in endometrial carcinoma.

Emiko Yoshida, Yasuhisa Terao,

第69回日本産科婦人科学会学術講演会, 広島, 2017年04月13日-16日

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称:

子宮体がんのリンパ節転移能の評価方法  
発明者: 寺尾泰久、吉田恵美子、竹田省、  
林崎良英、伊藤昌可、川路英哉

権利者:

学校法人順天堂

地方独立行政法人神奈川県立が病院機構

種類: 特許、

番号: 2015-556853

出願年月日: 2015年7月9日

国内外の別: 国内

名称:

METHOD FOR ASSESSING LYMPH NODE METASTATIC POTENTIAL OF ENDOMETRIAL CANCER"

発明者: 寺尾泰久、吉田恵美子、竹田省、  
林崎良英、伊藤昌可、川路英哉

権利者:

学校法人順天堂

地方独立行政法人神奈川県立が病院機構

種類: 特許

番号: European Patent Application No. 15 735 080.2

出願年月日：2016年7月9日  
国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/news/20171026-04.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺尾 泰久 (TERAO, Yasuhisa)  
順天堂大学・医学部・先任准教授  
研究者番号：00348997

### (2) 研究分担者

向後 泰司 (KOUGO, Yasushi)  
理化学研究所 予防医療・診断技術開発プログラム 薬事統括マネージャー  
研究者番号：20462682

河合 純 (KAWAI, Jun)  
理化学研究所 予防医療・診断技術開発プログラム 副プログラムディレクター  
研究者番号：30391923

### (3) 連携研究者

伊藤 昌可 (ITO, Masayoshi)  
理化学研究所 予防医療・診断技術開発プログラム コーディネーター  
研究者番号：90344027

川路 英哉 (KAWAJI, Hideya)  
理化学研究所 予防医療・診断技術開発プログラム 予防医療・ゲノミクス応用開発ユニット 開発ユニットリーダー  
研究者番号：20525406

### (4) 研究協力者

竹田 省 (TAKEDA, Satoru)  
順天堂大学・医学部・教授

林崎 良英 (HAYASHIZAKI, Yoshihide)  
理化学研究所 予防医療・診断技術開発プログラム プログラムディレクター