

令和元年5月30日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11134

研究課題名(和文) 卵管上皮に対する月経と排卵に伴う液性因子の発がん誘導作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of soluble factor in menstrual blood or follicular fluid associated with fallopian tubal carcinogenesis

研究代表者

水本 泰成 (Mizumoto, Yasunari)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00420331

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)：卵巣癌の一部は卵管上皮由来であるとされている。また、卵管結紮や低用量ピルの使用は卵巣癌の発症を抑制する疫学データがある。卵管上皮が月経血や卵胞液に暴露する機会が減少することが卵管上皮の遺伝子異常の蓄積に関与するとの作業仮説を立て、ヒト卵管上皮不死化細胞を作成し、実験的な検証を行った。今回我々の行った系では、発癌に関与する可能性のある遺伝子変異の蓄積を示せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験において月経血もしくは卵胞液による遺伝子毒性やそれに伴うヒト卵管上皮不死化細胞の形質転換は確認されなかった。疫学的に卵管結紮や低用量ピルの使用が卵巣癌発症に抑制的に機能することは明らかであり、月経血もしくは卵胞液暴露による刺激が関与していることを本研究が否定するものではないと考えられる。本研究では遺伝子変異に着目したが、エピジェネティックや免疫系の関与など多方面からの解析が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Some of ovarian cancers are proven to be originated from fallopian tube epithelium. On the other hand, tubal ligation or use of oral contraceptives are epidemiologically proven to decrease ovarian cancer incidence. We hypothesized that the soluble factor associated with menstrual blood or follicular fluid induces genetic mutation, thus leads to carcinogenesis of fallopian tubal carcinogenesis. We planned the experiment using iFTE(immortalized Fallopian Tuval Epithelium) in vitro, but failed to demonstrate the involvement of menstrual blood or follicular fluid in its carcinogenesis.

研究分野：卵巣癌

キーワード：卵巣高悪性度漿液性癌 卵胞液 月経血 発癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

婦人科癌の中で最も死亡率が高いのは卵巣癌である。卵巣癌に高頻度にみられる組織型は漿液性腺癌、類内膜腺癌、粘液性腺癌、明細胞腺癌であるが、最も頻度が高く、卵巣癌死の主因となっているのは漿液性腺癌、ことに高悪性度漿液性腺癌 (High Grade Serous Carcinoma, 以下 HGSC) である。

HGSC の誘因解明を目的とした研究の多くは、その由来を卵巣表層上皮としたことにより不成功に終わってきた可能性がある。HGSC が卵管上皮由来であるとする仮説 (Crum, 2009) が支持される背景には HGSC 症例から摘出された卵管の細切片に上皮内癌 (Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma, 以下 STIC) が高率に認められること (Kindelberger, 2007) HGSC 発症ハイリスク家系である BRCA 変異乳癌卵巣癌家系から予防的に摘出された卵管上皮に STIC が高頻度に確認されること (Pieck, 2001) などがある。

HGSC は DNA 修復やアポトーシスに関わるがん抑制遺伝子 TP53 変異をほぼ全例に認め、発癌の初期イベントであると考えられている。前癌病変である STIC でも TP53 変異が確認され、またそれに先行する病変として p53 signature と称される p53 強陽性を示す細胞集団において変異は見られず、生理的な反応であると報告され (Lee Y.J Pathol 2007) 徐々に発癌過程にみられる現象が明らかになってきている (図 1) が、TP53 変異の誘因や時期はいまだ未解明である。

一方、疫学研究より 5 年間の経口避妊薬の使用によって HGSC 発症リスクが 22.1% 減少すること (CGESOC, Lancet 2008) 卵管結紮によって有意に HGSC 発症リスクが低下すること (Cibula, Hum Reprod Update 2011) が報告された。卵管上皮は生殖年齢において周期的に排卵に伴う卵泡液や月経血の経卵管的逆流に暴露されている。月経血中には含まれる炎症物質は、慢性炎症、細胞分裂の促進、DNA 修復エラーの増加に影響すること (Salvador, 2009)、触媒活性を有する鉄によって誘導される酸化ストレスががん遺伝子変異のトリガーとなること (Toyokuni, 2009) などが報告され発癌過程の一端を担っている可能性がある。卵泡液は高分子多糖や血中の 1000 倍高濃度のエストロゲンやプロゲステロンを含んでおり、上皮細胞に遺伝子毒性を有し、発癌に関わる遺伝子変異を誘発する (Bahar-Shanyk, 2014) といった報告もある。月経血中あるいは卵泡液中に含まれる物質に繰り返し暴露されることが卵管上皮の DNA 損傷、DNA 修復エラーを生じ、その結果 TP53 遺伝子変異に関与している可能性が想起される。また、TP53 変異を獲得した上皮内癌 (STIC) から浸潤能獲得の過程で月経血、卵泡液が関わっている可能性もある。

### 2. 研究の目的

本研究は HGSC 発癌初期段階における p53 signature 発現や STIC 形成期におけるがん抑制遺伝子 TP53 発現異常や変異に、あるいは TP53 変異獲得後の癌形質獲得に月経血あるいは卵泡液が関与していると仮定し、ヒト卵管上皮不死化細胞を用いた in vitro 実験系、条件特異的遺伝子改変マウスを用いた動物実験系にて証明することで、HGSC の新しい予防・治療戦略の開発に繋がる知見を得ることを目的としている。

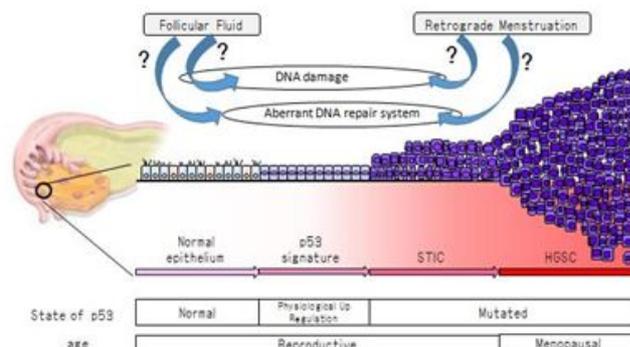
### 3. 研究の方法

TP53 は DNA 修復や細胞分裂の停止などの機能を持つ蛋白をコードしており、がん抑制遺伝子としての機能の一つに細胞が癌化した際にアポトーシスを誘導することが知られている。文献の検討から HGSC 発癌過程は 正常卵管上皮から p53 発現異常 (p53 signature) 上皮内癌 (STIC) 形成、浸潤能獲得 (HGSC) という 3 つのステップが想起される (図 1)。

p53 signature (病理組織学的に卵管上皮に確認される 12 個以上の連続した p53 陽性細胞) は TP53 変異を伴っておらず、何らかの“刺激”に対する反応性変化であることが示唆される。上皮内癌 (STIC) 形成時には TP53 変異があることを考えると、その“刺激”が TP53 発現異常、変異誘導の主役である可能性がある。また、TP53 変異を伴う STIC が浸潤能を獲得し HGSC へ形質転換する際に月経血、卵泡液中の液性因子による“刺激”が関与している可能性も考えられる。

月経血あるいは卵泡液がその“刺激”であることを証明するため、本研究期間内に 1) 月経血、卵泡液による遺伝子毒性 (Genotoxicity) を明らかにする。2) 月経血、卵泡液による DNA 修復経路 (TP53 経路、BRCA 経路など) への関与を明らかにする 3) DNA 修復経路に異常をきたした状態で月経血、卵泡液を添加した場合に、TP53 を含めた遺伝子変異が蓄積することを証明する。

1)2)3) を証明するために in



in vitro ではヒト卵管上皮不死化細胞株、in vivo では卵管特異的 TP53 ノックアウトマウスを用いて研究を行う。究極的には月経血、卵胞液による刺激によって p53 signature、STIC 形成、浸潤能獲得を in vitro, in vivo いずれの系においても再現することが目標となる。

また 2) によって月経血、卵胞液による DNA 修復経路の破綻が明らかになった場合は、その再現性を確認すると同時に、その経路を HGSC 発癌誘導の key factor と位置づけ機能解析、誘導実験など更なる発展的研究につなげる。

1) 2) 3) のいずれかが証明された際には、その結果に寄与した主要因子を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

ヒト卵管上皮不死化細胞 (immortalized Fallopian Tubal Epithelium, 以下 iFTE) に対し遺伝子変異を誘導すべく月経血あるいは卵胞液のそれぞれ血球分画、液性分画、内膜細胞分画を添加し、短期的にがん抑制遺伝子 TP53 発現量の変化、TP53 遺伝子変異の有無を観察したが、添加前後において有意な変化を認めなかった。引き続き in vitro 長期添加実験による TP53 発現、変異への寄与に関して in vitro 実験系にて評価したが形質転換を確認できなかった。iFTE に対する月経血、卵胞液の添加による遺伝子毒性に関する in vitro genotoxicity test (Ames test, mouse lymphoma assay), comet assay による評価による遺伝子毒性は確認されなかった。月経血、卵胞液の刺激が iFTE の DNA 修復経路に与える影響を網羅的に解析し細胞分裂に際して、一定の確率生じる DNA 複製エラーの修復シグナルへの月経血、卵胞液の影響を評価する目的で、月経血、卵胞液の添加の有無によって生じる遺伝子発現の変化を microarray 解析および pathway 解析にて評価を予定していたが、DNA 複製エラーの再現性が確認されなかったため、中止した。本研究において BRCA 経路など高悪性度漿液性腺癌、STIC 形成に関与が疑われている DNA 修復経路に有意な差異を認められず、月経血あるいは卵胞液の発がんに関する遺伝子変異への寄与は証明されなかった。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：藤原浩

ローマ字氏名：Fujiwara Hiroshi

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：30252456

研究分担者氏名：大黒多希子

ローマ字氏名：Daikoku Takiko

所属研究機関名：金沢大学

部局名：学際科学実験センター

職名：教授

研究者番号（8桁）：30767249

研究分担者氏名：荒木慶彦

ローマ字氏名：Araki Yosihiko

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学研究科

職名：先任准教授

研究者番号（8桁）：70250933

研究分担者氏名：保野由希子（～2018年3月22日）

ローマ字氏名：Bono Yukiko

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：協力研究院

研究者番号（8桁）：80565416

研究分担者氏名：尾崎聡（2016年8月5日～2017年3月21日）

ローマ字氏名：Ozaki Satoru

所属研究機関名：金沢大学

部局名：保健学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：40401921

## (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。