

令和元年5月8日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11150

研究課題名(和文)MRスペクトロスコピーを用いた鉄濃度測定による子宮内膜症発癌リスクの新たな評価法

研究課題名(英文) Predictive diagnosis of endometriosis-associated malignant transformation by iron concentration measurement using magnetic resonance spectroscopic imaging.

研究代表者

吉元 千陽 (YOSHIMOTO, CHIHARU)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00526725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌の腫瘍内鉄濃度をMRスペクトロスコピー(MRS)で測定した結果、R2値(MRSで測定した鉄濃度を反映する値)=12.1をカットオフ値とし感度86%、特異度94%、陽性的中率80%、陰性的中率96%で両者の鑑別が可能であった。R2値は腫瘍径や年齢等で影響を受けないことから、全内膜症患者に対して癌化を評価する有用な手法と考えられた。内膜症関連卵巣癌はチョコレート嚢胞と比較して相対的に総抗酸化物質が酸化物質より高いことから、チョコレート嚢胞は酸化物質により死滅する一方、癌化する場合は抗酸化能を獲得することで細胞死を免れ、適度な酸化ストレス下で癌化に至ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チョコレート嚢胞は頻度の高い疾患で、チョコレート嚢胞から発症しやすい卵巣明細胞腺癌は特に我が国で発生頻度が高く一般的な上皮性卵巣癌と比較して抗癌剤抵抗性を示し、予後不良なことが知られている。そのため、本研究により、癌化の過程で鉄濃度の変化がおこるメカニズムが証明できれば、腫瘍内の鉄濃度測定により癌化のリスク評価もできるようになり、さらには癌化の予防法の開発に繋がる可能性も秘めている。また、肝臓の鉄沈着は肝癌発生のリスクである、といった「鉄と発癌」の関係が示唆されている他の臓器にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We evaluate the clinical application of MR relaxometry in a series of ovarian endometriosis (OE) and endometriosis-associated ovarian cancer (EAOC). A prospective study of diagnostic accuracy was conducted among 82 patients (67 OE and 15 EAOC) to compare MR relaxometry and biochemical measurement of cyst fluid total iron concentration. Transverse relaxation rate R2 value was determined using a single-voxel, multi-echo MR sequence (HISTO) by a 3T-MR system. The results in vivo R2 values were highly correlated with total iron concentrations. Compared to OE, EAOC exhibit decreased in vivo R2 values and total iron levels, regardless of their age, menopausal status and cyst size. The use of in vivo R2 values retained excellent accuracy in distinguishing EAOC versus OE (sensitivity and specificity: 86% and 94%). We have demonstrated that MR relaxometry provides a noninvasive predictive tool to discriminate between EAOC and OE.

研究分野：腫瘍内容液鉄濃度測定による癌・非癌の鑑別とチョコレート嚢胞癌化のメカニズムの解明について

キーワード：子宮内膜症 癌化 鉄 MRスペクトロスコピー ヘムオキシゲナーゼ1 チョコレート嚢胞

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

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、200 万人以上の女性が罹患する疾患であり、月経痛、不妊症、そして卵巣癌の合併と、女性の QOL を最も低下させる疾患である。我々は前方視的臨床研究により、6,398 人のチョコレート嚢胞患者から、46 人の卵巣癌患者が発生し、本邦におけるがん発生頻度は 0.72% で、自然発生卵巣がん比べ 8 倍以上の高率でがん化が起こることを初めて証明した。(Kobayashi H, et al. *Int J Gynecol Cancer*. 2007.) しかし、これまで癌化のリスクは年齢と腫瘍径しか明らかでなく、40 歳以上や腫瘍径が 6 cm 以上の場合には手術を考慮している。また、超音波診断装置や核磁気共鳴映像法(MRI)による腫瘍の形態的評価によって癌化の可能性を判断しているが、実際に癌化しているか否かは組織の病理学的検査によって初めて明らかにされている。従って、チョコレート嚢胞を有している多くの患者は癌化していないものの将来癌化する可能性を考慮して、摘出する外科的な処置を受ける患者も多く、より低侵襲、且つ精度の高い診断方法の実用化が囑望されている。

チョコレート嚢胞は、ヘモグロビン由来の高濃度の“鉄”による持続的な酸化ストレスにより、DNA、脂質、蛋白が障害を受け、発癌すると考えられている。(Kobayashi H, et al. *Gynecol Endocrinol*. 2009.) そこで、我々はチョコレート嚢胞の内容液中の“鉄濃度上昇”と癌化リスクの上昇との相関性について、嚢胞内の総鉄濃度、ヘム鉄濃度、自由鉄濃度等の測定を重ねてきた。その結果、定説とは異なり、癌化したチョコレート嚢胞の内容液中の鉄濃度は、良性のチョコレート嚢胞の内容液中の鉄濃度よりも有意に低く、また良性のチョコレート嚢胞はメトヘモグロビンが主であり、癌化した場合はオキシヘモグロビンに変化していることを初めて見出した(図 1)。

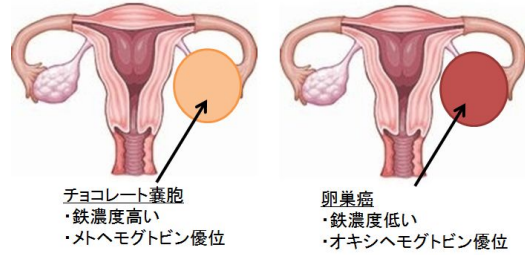


図 1 チョコレート嚢胞と卵巣癌の鉄の分布

この現象がおこるメカニズムとして、我々は以下の仮説を提唱した。通常は出血がおこると、溶血が生じ、赤血球中の酸素を結合したオキシヘモグロビン(HbO₂-Fe²⁺)は細胞外へ放出される。

そこで自動酸化がおこり、メトヘモグロビン(metHb-Fe³⁺)と活性酸素(スーパーオキシドアニオン O₂⁻)が生じる。従って、チョコレート嚢胞では鉄による酸化ストレスがきわめて強いため、ほとんどの子宮内膜症上皮細胞は癌化する前に死滅する。一方、癌化する場合は、何らかの抗酸化能を獲得することで細胞死が抑制されるのに加え、至適な鉄の環境下で、適度の持続的な酸化ストレスを受け、DNA 障害や遺伝子不安定性を持ったまま生存し続けるため、増殖・癌化・浸潤・転移能を獲得すると考えた(図 2)。

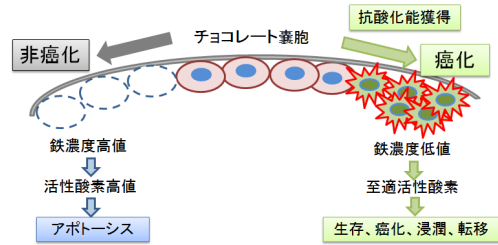


図 2 チョコレート嚢胞の発癌仮説

我々はこれまでチョコレート嚢胞と内膜症由来の卵巣癌の患者の腫瘍内容液を検討し、鉄濃度 64.8mg/l をカットオフ値とした場合、卵巣癌の診断精度は感度 91%、特異度 100%、陽性的中率 100%、陰性的中率 97%であることを示した。(Yoshimoto C, et al. *Cancer Biomark*. 2015) 従って、チョコレート嚢胞内の鉄濃度を外来診療で非侵襲的に測定できるようになれば、癌化の予測や早期発見ができる可能性があると考えた。その手法として、MRI 検査の一種である MR スペクトロスコピー(MRS)を用いた鉄成分を測定するシーケンスに注目した。このシーケンスは、未だ一般的な実用化には至っていないものの、脳出血や肝臓における鉄沈着の評価が可能である等の報告がされている。そこで、手術前の生体内の腫瘍内容液の MRS 信号強度(R2 値：鉄濃度を反映した数値)、摘出した内容液の R2 値、摘出した内容液の鉄濃度(以下 [Fe]_{ICP})を測定し、これらの相関関係を検討した結果、手術前と手術後の R2 値は一致し、[Fe]_{ICP} と良好な相関関係を示した(図 3)。従って、生体内の腫瘍内鉄濃度は MRS で測定できることが証明された。チョコレート嚢胞と内膜症由来の卵巣癌の両者では、R2 値が明瞭に異なることが予測され、癌化の予測や早期発見が可能となることが期待される(図 4)。

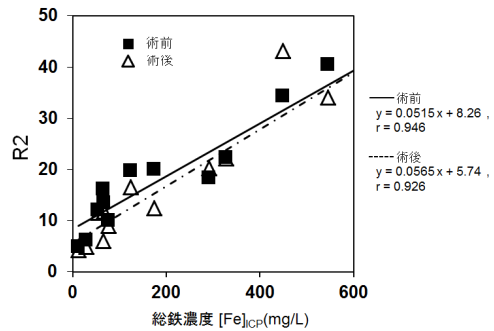


図 3 手術前後の R2 値と総鉄濃度 [Fe]_{ICP}

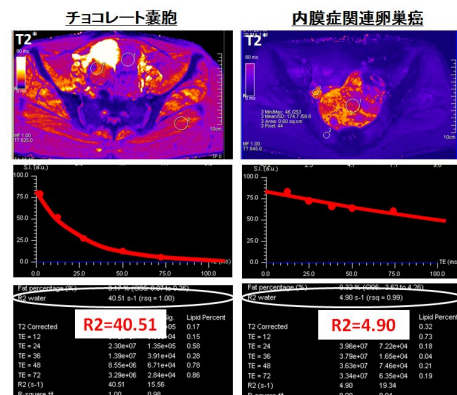


図 4 チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌の MRS

2. 研究の目的

チョコレート嚢胞、内膜症由来の卵巣癌の腫瘍内の鉄濃度を MRS で測定し、それらを鑑別するカットオフ値を明らかにする。さらに、癌化の過程で鉄濃度に変化がおきるメカニズムを遺伝子レベル・分子レベルにおいて解明することで、MRS による鉄濃度の測定で発癌リスクが予測できるかを明らかにし、我々の発癌仮説を実証する。

3. 研究の方法

(1) 「MRS を用いた腫瘍内鉄濃度測定による発癌予測・早期発見」に関する臨床試験

チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌における MRS による鉄濃度測定

チョコレート嚢胞または内膜症関連卵巣癌の疑いの患者に術前 MRS を施行し、鉄濃度を反映する R2 値を測定した。術後、病理学的検査でチョコレート嚢胞と診断された患者 67 名と、内膜症から発症した卵巣癌と診断された患者 15 名を対象とした。ROC 曲線を用いて、チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌における R2 値のカットオフ値を設定し、感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率を求めた。

チョコレート嚢胞内鉄濃度に影響を及ぼす要因の検討

チョコレート嚢胞患者を集めて、年齢、腫瘍径、月経周期(月経期、増殖期、分泌期、閉経期)、ホルモン剤の使用(低用量ピル、ジェノゲスト、偽閉経療法)などによって、R2 値が変化するかを検討した。

(2) 「発癌仮説の実証」に関する基礎実験

チョコレート嚢胞・内膜症関連卵巣癌の腫瘍内容液中の酸化/抗酸化物質の測定

チョコレート嚢胞 44 例と内膜症由来卵巣癌 14 例の腫瘍内容液を用いて、酸化/抗酸化物質の測定を行った。酸化物質は、活性酸素による DNA 酸化生成物である 8OHdG の ELISA、ヘム鉄のヘムアッセイ法、抗酸化物質は、ヘム鉄を分解する抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ 1(HO-1)の ELISA、総抗酸化能(Total antioxidant capacity:TAC)を測定した。

チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌組織における HO-1 関連の免疫染色

チョコレート嚢胞 33 例と内膜症関連卵巣癌 20 例のパラフィン包埋切片を用いて、HO-1 の発現について免疫染色を用いて検討した。また、マクロファージには主に炎症性サイトカインを産生する M1 マクロファージと、組織リモデリングに関わる M2 マクロファージが存在し、HO-1 は M2 マクロファージから産生されることが知られているため、マクロファージ(CD68)、M1 マクロファージ(CD11c)、M2 マクロファージ(CD163)の免疫染色も行った。

4. 研究成果

(1) 「MRS を用いた腫瘍内鉄濃度測定による発癌予測・早期発見」に関する臨床試験

チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌における MRS による鉄濃度測定

チョコレート嚢胞の R2 値の中央値は 22.2(6.73-47.8)、内膜症関連卵巣癌は 7.2(4.8-19.7)であり、チョコレート嚢胞で有意に高かった。ROC 曲線を用いてカットオフ値を 12.1 に設定した場合、卵巣癌の診断精度は感度 86%、特異度 94%、陽性的中率 80%、陰性的中率 96%であった(図 5)。

チョコレート嚢胞内鉄濃度に影響を及ぼす要因の検討

チョコレート嚢胞において、生体内の腫瘍内 R2 値は年齢や腫瘍径とは相関しなかった(図 6,7)。また、チョコレート嚢胞患者において月経周期(増殖期 7 例、分泌期 8 例、月経期 4 例、閉経 1 例)、ホルモン剤の使用(未使用 30 例、ジェノゲスト 4 例、低用量ピル 2 例、偽閉経療法 3 例)において、R2 値を検討した結果、有意差を認められたものはなかった。今回の検討からは、R2 値に影響を及ぼす要因は同定されなかったため、全チョコレート嚢胞患者に対して癌化を評価する有用な手法である可能性が示唆された。ただし、月経周期別やホルモン剤の使用の有無に関しては症例数が少なく、同一患者での経時的な変化が検討できなかったため、今後も検討を続けていく必要があると考えられた。

(2) 「発癌仮説の実証」に関する基礎実験

チョコレート嚢胞・内膜症関連卵巣癌の腫瘍内容液中の酸化/抗酸化物質の測定

チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌において、8OHdG は 2.023(0.16-49.98) vs 0.820(0.39-3.89) ng/ml, $p=0.013$ 、HO-1 は 7.00(0.83-51.47) vs

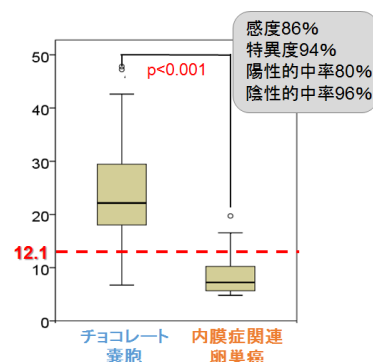


図5 生体内の腫瘍内R2値

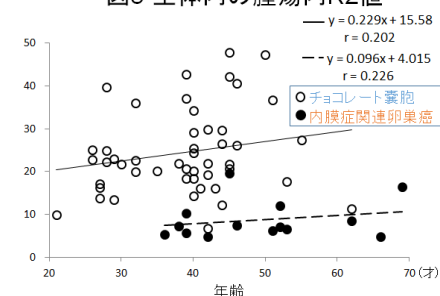


図6 年齢別生体内R2値

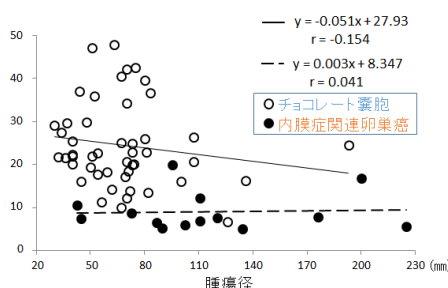


図7 腫瘍径別生体内R2値

1.15(0.42-20.69)ng/ml, $p < 0.001$ であり、チョコレート嚢胞で有意に高い結果であった。酸化と抗酸化のバランスを評価するための指標として、抗酸化物質/酸化物質を総抗酸化能(TAC)/ヘム鉄と定義して検討した結果、チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌では $0.0051(0.0005-0.0420)$ vs $0.0270(0.0030-0.1126)$ mol/g, $p < 0.001$ であり、内膜症関連卵巣癌はチョコレート嚢胞と比較して相対的に抗酸化物質が酸化物質より高かった(図 8)。この結果は、我々の発癌仮説である、チョコレート嚢胞は鉄による酸化ストレスが極めて強い為、ほとんどの子宮内膜症上皮細胞は癌化する前に死滅する一方、癌化する場合は、抗酸化能を獲得することで細胞死が抑制されるのに加えて至適な鉄の環境下で、適度の持続的な酸化ストレスを受け、DNA 障害や遺伝子不安定性を持ったまま生存し続けるため、増殖・癌化・浸潤・転移能を獲得する、という考えを支持する結果であった。

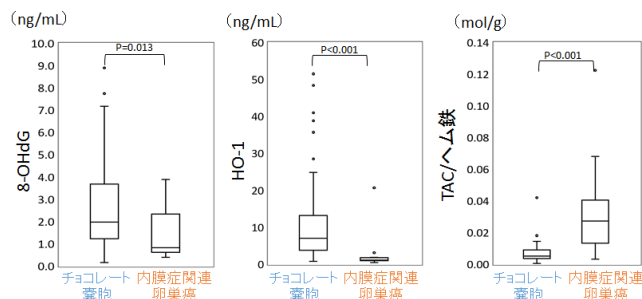


図8 嚢胞内用液中の酸化・抗酸化物質の測定

チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌組織における HO-1 関連の免疫染色

チョコレート嚢胞と内膜症関連卵巣癌の組織内における HO-1 の発現と、M1 マクロファージ、M2 マクロファージの発現を免疫組染色で検討した結果、チョコレート嚢胞では、HO-1、M1 マクロファージ、M2 マクロファージの発現が有意に高かった。また、HO-1 は M2 マクロファージに発現していた。M1 と M2 マクロファージの比率を検討した結果、内膜症関連卵巣癌では M2 マクロファージの割合が増加していた(図 9)。M2 マクロファージの割合が増加することは、癌化の過程において重要な役割を担う可能性が示唆された。

	チョコレート嚢胞	内膜症関連卵巣癌	p 値
症例数	33	20	
M1+M2(CD68)			
平均 ± SD	100.9 ± 40.0	68.6 ± 18.3	0.007
M1(CD11c)			
中央値(範囲)	34.0 (0.6-73.8)	4.1 (0.8-21.8)	0.001
M2(CD163)			
平均 ± SD	94.5 ± 28.6	72.8 ± 27.4	0.009
M1/M2(CD11c/CD163)			
中央値(範囲)	0.321 (0.007-1.0)	0.065 (0.011-0.213)	< 0.001
HO-1			
平均 ± SD	60.0 ± 23.4	17.4 ± 10.9	< 0.001

図9 免疫染色の結果

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Kobayashi H, Yamada Y, Kawahara N, Ogawa K, Yoshimoto C. Modern approaches to noninvasive diagnosis of malignant transformation of endometriosis. *Oncol Lett.* 17(1):1196-1202. 2019. DOI: 10.3892/ol.2018.9721 (査読あり)

Yamada Y, Uchiyama T, Ito F, Kawahara N, Ogawa K, Obayashi C, Kobayashi H. Clinical significance of M2 macrophages expressing heme oxygenase-1 in malignant transformation of ovarian endometrioma. *Pathol Res Pract.* 2018 Dec 12. pii: S0344-0338(18)31370-0. DOI: 10.1016/j.prp.2018.12.017 (査読あり)

Kobayashi H, Yamada Y, Kawahara N, Ogawa K, Yoshimoto C. Integrating modern approaches to pathogenetic concepts of malignant transformation of endometriosis. *Oncol Rep.* Dec.21,2018, DOI: 10.3892/or.2018.6946 (査読あり)

Kobayashi H, Yamada Y, Kawahara N, Ogawa K, Yoshimoto C. Modern approaches to noninvasive diagnosis of malignant transformation of endometriosis. *Oncol Lett.* 2019 Jan;17(1):1196-1202 Received July 28, 2018; Accepted October 26, 2018 DIO:10.3892/ol.2018.9721 Epub 2018 Nov 16. (査読あり)

Fujimoto Y, Imanaka S, Yamada Y, Ogawa K, Ito F, Kawahara N, Yoshimoto C Kobayashi H. Comparison of redox parameters in ovarian endometrioma and its malignant transformation. *Oncol Lett.*16: 5257-5264 Received March 27, 2018; Accepted July 25, 2018 DOI: 10.3892/ol.2018.9242 Epub 2018 Jul 31 (査読あり)

Yoshimoto C, Takahama J, Iwabuchi T, Uchikoshi M, Shigetomi H, Kobayashi H. Transverse Relaxation Rate of Cyst Fluid Can Predict Malignant Transformation of Ovarian Endometriosis. *Magn Reson Med Sci.* 2017 Apr 10; 16(2):137-145 DOI 10.2463/mrms.mp.2016-0028 (査読あり)

Iwabuchi T, Yoshimoto C, Shigetomi H, Kobayashi H. Cyst fluid hemoglobin species in endometriosis and its malignant transformation:The role of metallobiology. *Oncol Lett.*2016;11: 3384-3388 DOI 10.3892/ol.2016.4383 (査読あり)

重富洋志, 高濱潤子, 岩淵拓也, 打越雅人, 岩井加奈, 新納恵美子, 伊東史学, 吉元千陽, 棚瀬康仁, 春田祥治, 川口龍二, 佐道俊幸, 小林 浩, 吉川公彦: 新規MRI技術を活用したチョコレート嚢胞の癌化の早期発見法. *産婦人科の進歩* 2016.8 ; 68(3) : 347-349 DOI 10.11437/sanpunosinpo.68.347 (査読あり)

〔学会発表〕(計 21 件)

Ogawa K, Yamada Y, Kawahara N, Yoshimoto C, Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H: Role of heme oxygenase 1(ho-1) in malignant transformation of ovarian endometriosis. The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS2018), Kyoto, Japan. Sep.14-16,2018(Poster)

河原直紀, 小川憲二, 山田有紀, 吉元千陽, 川口龍二, 佐道俊幸, 小林 浩: MR スペクトロスコピーを用いた卵巣チョコレート嚢胞の癌化の新たな鑑別法 第 138 回近畿産科婦人科学会総会・学術集会 大阪 2018 年 6 月 9-10 日(口演)

河原直紀, 小川憲二, 山田有紀, 吉元千陽, 川口龍二, 佐道俊幸, 小林 浩: 卵巣チョコレート嚢胞の癌化の鑑別における MR スペクトロスコピーの有用性 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会 仙台 2018 年 5 月 10-13 日(ポスター)

小川憲二, 山田有紀, 河原直紀, 吉元千陽, 川口龍二, 佐道俊幸, 小林 浩: 子宮内膜症の癌化におけるヘムオキシゲナーゼ 1 (HO - 1) の抗酸化作用 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会 仙台 2018 年 5 月 10-13 日(ポスター)

Ito F, Yoshimoto C, Takahama J, Iwabuchi T, Yamada Y, Shigetomi H, Tanase Y, Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H. Noninvasive diagnosis of malignant transformation of ovarian endometrioma: A study on metallobiology. The 56th Annual Congress & The 6th International Symposium of TAOG,2017, Taipei,Taiwan.Mar.18-19,2017

Ito F, Yoshimoto C, Takahama J, Yamada Y, Shigetomi H, Tanase Y,Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H. A new MRI sequence to discriminate between benign endometriotic cysts and endometriosis-associated ovarian cancer. 5th Asian Congerence on Endometriosis(ACE2016), Osaka,Japan Sep.22-24,2016 (Poster)Good poster prize 受賞

Ito F, Yoshimoto C, Shigetomi H, Tanase Y, Haruta S, Kawaguchi R, Sado T, Kobayashi H. (International Session Award Candidate)Magnetic resonance spectroscopy can be used to discriminate between benign endometriotic cysts and endometriosis associated ovarian cancer. 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 東京 2016 年 4 月 21-24 日(Oral) International Session Encouragement Award 受賞

〔その他〕

ホームページ等

https://nara-obgyn.com/gynecology_research/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 小林 浩

ローマ字氏名: KOBAYASHI, Hiroshi

所属研究機関名: 奈良県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40178330

研究分担者氏名: 棚瀬 康仁

ローマ字氏名: TANASE, Yasuhito

所属研究機関名: 奈良県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 20423915

研究分担者氏名: 赤坂 珠理晃

ローマ字氏名: AKASAKA, Juria

所属研究機関名: 奈良県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 90526724