

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11289

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌の血液凝固異常・抗がん剤耐性に着目したトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文) Translational research focused on the abnormal blood coagulation system in patients with clear cell carcinoma of ovary

研究代表者

宮城 悦子 (Miyagi, Etsuko)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：40275053

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)：卵巣明細胞癌特異的分新規腫瘍マーカーとしてTFPI2を見出し、その機能解析と臨床における腫瘍マーカーとしての有用性の検討、免疫組織学的検討、子宮内膜症性嚢胞関連癌としての特性などを解明した。卵巣明細胞癌は子宮内膜症関連癌としての性格を有し、チョコレート嚢胞内溶液と明細胞癌では、酸化ストレス・抗酸化能のアンバランス、すなわちレドックスバランスの破綻が癌化に關与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では、卵巣明細胞癌は、少子化・高齢妊婦の増加に伴い、子宮内膜症性嚢胞から発生するCCCは増加している。特に比較的高齢で子宮内膜症性嚢胞を有し不妊治療を受けられている女性も多く、子宮内膜症で有意に上昇することが多いCA125とCCCの特異度が高いTFPI2は、有望な明細胞癌特異的腫瘍マーカーである。また、今後子宮内膜症性嚢胞からの癌化のメカニズムを明らかにすることは、早期発見から適切な治療の選択につながると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate characteristics of clear cell carcinoma of the ovary (CCC), which is known as cancer associated with endometriosis. Subcellular localization of TFPI-2 expression was analyzed by immunohistochemistry. Of 77 surgically resected ovarian clear cell carcinoma tissues, TFPI2 was expressed in cytoplasm and nucleus in 52 cases. As a study on oxidative stress, chocolate cysts were predominantly Hb-Fe3+, whereas endometriosis-related CCCs were predominantly Hb-Fe2+. TFPI2 was released from cells of placental choriotrophoblastic cells and CCC cell line. After incubating purified TFPI2 derived from both cells with human plasmin, placenta- and CCC-derived TFPI2 had no significant difference in affinity for human plasma plasmin. We found that CCC and non-CCC can be distinguished depending on the presence of TFPI2 expression. It was also considered that carcinogenesis was related to the environment in which it acquires the antioxidant ability to survive.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣明細胞癌 TFPI2 血液凝固 血栓症 前向き観察研究 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は本邦での罹患率・死亡率はともに増加傾向にあり、年間9000人以上が罹患し4500人以上が死亡している疾患であり、良性・境界悪性・悪性の組織学的分類は摘出検体の病理検査で初めて確定される。卵巣癌の多くを占める上皮性卵巣癌は、漿液性、類内膜、粘液性、そして明細胞と主に4つの組織型に分類される。中でも、卵巣明細胞癌は他の組織型に比べて抗がん剤が効きにくく予後不良な例が多いとされている。また、代表的な卵巣癌マーカーであるCA125は、卵巣癌全般の検出には優れているが、組織型の鑑別性能を有しないことに加え、明細胞癌の陽性率が低い。良性腫瘍である子宮内膜症で高値となり、内膜症から明細胞癌発症を正確に診断することができないといった問題がある。これまでに、われわれの研究グループは、新規診断マーカーの探索として卵巣癌細胞株培養上清たんぱく質の網羅的比較解析を行い、明細胞癌細胞がTissue Factor Pathway Inhibitor 2 (TFPI2) を特異的に分泌し、卵巣腫瘍組織検体においても明細胞癌ではTFPI2が特異的に発現していることから、TFPI2は明細胞癌診断マーカーとなる可能性を見出した。また、担癌患者で深部静脈血栓症の合併が多いことは古くからトルソー症候群として知られており、特に明細胞癌の患者で良く知られているが、その機序は不明である(Diaz ES, et al. Gynecol Oncol 131: 541-5, 2013)。われわれは、卵巣明細胞癌由来細胞株では、腫瘍細胞自体が外因系血液凝固に参与する第Ⅲ因子や組織因子(TF)自体を産生し、その生物活性は局所での血液凝固亢進に参与するとともに、癌細胞の進展に参与する可能性を見出し報告した(Yokota N, Miyagi E, et al. Br J Cancer 101: 2023-9, 2009)。その後TFPI2はプロテオミクスの技術を用いた卵巣癌由来細胞株よる分泌されるタンパク質を網羅的に解析するセクレトーム解析により、卵巣明細胞癌 特異的分泌タンパク質の一つとして同定されている(Arakawa N, Miyagi E et al. J Proteome Res.12: 4340-50, 2013)。また上皮性卵巣癌の発癌は、分子プロファイルに基づいてタイプ1とタイプ2に分類され、タイプ1は子宮内膜症から発癌し、組織型として類内膜癌、明細胞癌が多い。タイプ2は卵管の前癌病変STICから発癌する漿液性癌が代表的である。本邦の前方視的疫学調査では、卵巣子宮内膜症性嚢胞(チョコレート嚢胞)を有する女性の0.72%が卵巣癌に移行すると報告されている。

2. 研究の目的

- (1) **臨床研究(担当: ルイズ横田奈朋、宮城悦子)**: 手術症例(2007年1月~2014年3月)を対象としたフォローアップ採血の前向きコホート研究が行われた(論文投稿中)。診断マーカーとしてのTFPI2が臨床応用されれば、術後経過観察の上でもよりの確な管理が行えることが期待できる。しかし、先行研究では化学療法施行中の患者を対象としておらず、今回はTFPI2の術後管理における評価指標の一つとしての有用性を明らかにする。

(2) 基礎研究

手術検体の免疫組織化学・動物モデル・細胞株を用いた検討(担当: 宮城洋平、太田幸秀): 上皮性卵巣癌患者の手術検体を用いて、TFPI2の免疫組織化学における有用性を明らかにする。また、培養細胞を用いた分子生物学的解析で、TFPI2の発現が卵巣明細胞癌のどのような形質に参与しているかを明らかにする。

酸化ストレスと発がんについて(担当: 小林浩): 嚢胞内容液中の鉄濃度を詳細に検討した以前の報告では、チョコレート嚢胞および内膜症関連卵巣癌(Endometriosis-associated ovarian cancer, EAOC)嚢胞内溶液の総鉄、ヘム鉄、自由鉄濃度を測定した結果、EAOC嚢胞内溶液の総鉄濃度は、チョコレート嚢胞内溶液よりも有意に低く、今回はこの鉄の分子種を同定するため、ヘモグロビン分子種に着目し、癌化への関与を考察する。また、臨床的には類内膜癌、明細胞癌の術前鑑別は、治療方針決定に重要な因子であるため、両者のMRI鑑別法につき検討する。

TFPI2のセリンプロテアーゼインヒビターとしての機能(担当: 荒川憲昭): TFPI2はセリンプロテアーゼインヒビターとしてプラスミンに対する阻害活性が最も強いことが知られているため、胎盤由来TFPI2と卵巣明細胞癌由来TFPI2において、プラスミン阻害活性に違いがあるのかどうか検討する。

3. 研究の方法

(1) 臨床研究(担当: ルイズ横田奈朋、宮城悦子)

先行研究により登録された2016/7月~2018年3月の期間に上皮性卵巣癌または上皮性境界悪性腫瘍にて手術を施行した患者で、CA125値とTFPI2値、患者背景や再発の有無、治療内容などの情報を収集し、術前、および術後経過観察時における血中TFPI2値およびCA125値の変化を主要評価項目とし、副次評価項目として、術後化学療法中~

経過観察時の病状に伴う TFPI2 値の変化の検討と、術後経過観察時の CA125 と TFPI2 の補完性の検討を行う。

(3) 基礎研究

手術検体の免疫組織化学・動物モデル・細胞株を用いた検討(担当:宮城洋平、太田幸秀): 卵巣明細胞癌株 11 株を用いた TFPI2 発現の Subcellular localization の同定、外科切除 EOC 組織 120 例のホルマリン固定パラフィン包埋組織検体を用いた免疫組織化学による TFPI2 タンパク質の発現解析 TFPI2 ノックアウト細胞株の樹立、マウスへの腹腔内注射 Xenograft モデルによる表現系の違いの評価、接着アッセイによる評価を行った。

酸化ストレスと発がんについて(担当:小林浩): 嚢胞内溶液のヘモグロビン分子種を同定するために、吸収スペクトル測定を行った。また類内膜癌、明細胞癌の MRI 鑑別に寄与する因子を抽出するため、ロジスティック多変量解析を行った。

TFPI2 のセリンプロテアーゼインヒビターとしての機能(担当:荒川憲昭): 胎盤絨毛栄養膜細胞(HVT)と卵巣明細胞癌由来の細胞株(OVMANA)の両細胞からヘパリン処理により TFPI2 を遊離させ TFPI2 の精製をしプラスミンの酵素活性を評価した。

4. 研究成果

(1) **臨床研究:** 23 例全例より同意を得て 2018/6 月より登録を開始し、3 ~ 6 か月おきの検体採取を開始した。1 例は転院となったため、その時点で中止となり、残りの 22 例を対象に 2020/3/31 まで観察を行った。2020/4 月以降に測定を開始予定であったが、新型コロナウイルス感染拡大による外部関係者の立ち入り制限や、県外での移動制限のため、測定を延期している。制限が解除され次第、当院症例の測定および協力医療機関である奈良県立医科大学の症例検体の測定を開始予定である。

(2) 基礎研究

手術検体の免疫組織化学・動物モデル・細胞株を用いた検討

免疫組織化学を用いた研究では、卵巣明細胞癌細胞株 11 種のうち 4 種は核、細胞質、細胞外分画のいずれにも TFPI2 を発現していた。他の 4 種は細胞外分画にのみ発現を認めた。外科切除卵巣明細胞癌組織 77 例のうち 52 例(67.5%)で細胞外分画、細胞質、核のうち少なくとも一つの分画で TFPI2 が発現していた。非卵巣明細胞癌組織 43 例は TFPI2 の発現は認めなかった。TFPI2 の発現の有無により感度 77.8%、特異度 100%で卵巣明細胞癌と非卵巣明細胞癌組織を鑑別できた。TFPI2 の機能解析においては、3 株の TFPI2 ノックアウト細胞株を樹立しマウスへの腹腔内注射 Xenograft による表現系の評価として、腹腔内注射から 3 週経過したところで解剖を行った。TFPI2 ノックアウト細胞株では腸間膜への播種が優位に増加していた。接着アッセイによる評価では、コラーゲン 1 またはフィブロネクチンをコーティングした well を用いた実験では、TFPI2 のノックアウト細胞株で接着している細胞の数が優位に多かった。

酸化ストレスと発がんについて: 嚢胞内溶液のヘモグロビン分子種を同定するため、オキシヘモグロビン(Hb-Fe²⁺)とメトヘモグロビン(Hb-Fe³⁺)の可視光領域における吸光スペクトルを測定した。チョコレート嚢胞内溶液は Hb-Fe³⁺優位のパターンを示し、EAOC 嚢胞内溶液では Hb-Fe²⁺優位のパターンを示した。また、チョコレート嚢胞内溶液では、グアニンが 8-OHdG (8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine) に変化しており、DNA 障害が惹起されたことがわかった。チョコレート嚢胞では Hb-Fe³⁺優位であるのに対し、EAOC は Hb-Fe²⁺優位であることから、抗酸化能を獲得して生存し、DNA を損傷しながらも増殖できる環境が発がんに関係していると推察した。また EAOC においてマクロファージ由来の HO-1 (Heme Oxygenase-1) の発現や癌幹細胞マーカーの一つである CD44 のスプライスバリエント CD44v9 の発現が変化しており、EAOC が DNA 損傷を保持しつつ生存し、増殖するための因子になっているのではないかと考えられた。また、チョコレート嚢胞および明細胞癌を合併したチョコレート嚢胞における CD44v9 および酸化的 DNA 損傷マーカー 8-OHdG の発現を調査した結果、CD44v9 は子宮内膜症の上皮細胞の細胞膜に局在し、88.9%のチョコレート嚢胞組織で発現した。また明細胞癌に隣接するチョコレート嚢胞病変・チョコレート嚢胞・明細胞癌に合併した子宮内膜症組織で CD44v9 と 8-OHdG の変化を検討したところ、これらがチョコレート嚢胞の悪性転換に関連している可能性が示された。マクロファージの抗酸化能に着目した検討では、HO-1 を発現する M2 マクロファージの数の減少はチョコレート嚢胞の悪性形質転換を促進する上で重要な役割を果たす可能性が示された。

TFPI2 のセリンプロテアーゼインヒビターとしての機能: 様々な濃度の基質および

TFPI2 の存在下でプラスミン活性を測定し、反応速度論的解析から TFPI2 のプラスミンに対する阻害定数 (K_i) を求めた。HVT 由来 TFPI2 は 10.57 ± 2.74 nM、OVAMANA 由来 TFPI2 は 15.14 ± 2.47 nM と算出され、ヒト血漿プラスミンに対する親和性には、胎盤 (HVT) 由来の TFPI2 と卵巣明細胞癌 (OVMANA) の TFPI2 には大きな違いはないことが考えられた。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 浩 (Kobayashi Hiroshi) (40178330)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	宮城 洋平 (Miyagi Yohhei) (00254194)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・所長 (82713)	
研究分担者	荒川 憲昭 (Arakawa Noriaki) (60398394)	国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・主任研究官 (82601)	