

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11292

研究課題名(和文) HE4とTFPI2の組み合わせによる卵巣明細胞癌早期発見法

研究課題名(英文) Early detection method for clear cell carcinoma of the ovary by combining HE4 and TFPI2

研究代表者

新納 恵美子(Niino, Emiko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80588533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：明細胞癌の卵巣癌全体に占める割合は2番目に多い。さらに、明細胞癌は抗癌剤抵抗性で転移浸潤能が高く、卵巣癌全体の中でも最も予後が悪い。以上のことより、明細胞癌の早期発見のための有用なマーカーの開発が急務である。通常卵巣癌ではCA125が上昇するが、明細胞癌ではCA125の上昇はみられない。我々は組織中のHNF-1の発現とその抗がん剤耐性惹起機序を証明してきたが、Tissue factor pathway inhibitor 2(TFPI2)が、明細胞癌のみに多く発現していることが報告された。卵巣癌患者のTFPI2濃度とHE4を測定し、TFPI2は明細胞癌特異的に上昇することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この度の研究結果により、新規マーカーであるTFPI2が明細胞癌特異的に上昇することが確認された。

研究成果の概要(英文)：Clear cell carcinoma is the second most common ovarian cancer. Furthermore, clear cell carcinoma is resistant to anti-cancer agents and has high metastatic invasion ability, and thus has the worst prognosis among all ovarian cancers. From the above, there is an urgent need to develop useful markers for early detection of clear cell carcinoma. CA125 is elevated in normal ovarian cancer, but not in clear cell carcinoma. We have demonstrated the expression of HNF-1 in tissues and its mechanism of inducing resistance to anticancer drugs, but it is reported that Tissue factor pathway inhibitor 2(TFPI2) is highly expressed only in clear cell carcinoma. It was The TFPI2 concentration and HE4 of ovarian cancer patients were measured, and it was confirmed that TFPI2 was specifically increased in clear cell carcinoma.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：卵巣癌 腫瘍マーカー TFPI2 HE4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1.研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は日本人女性での罹患率・死亡率ともに増加傾向にある疾患であるが、検診の有効性は否定的であり、発見時にはその70%がIII期・IV期の進行癌となっている。主な組織型は漿液性、類内膜、粘液性、明細胞の4種類である。明細胞癌の卵巣癌全体に占める割合は、欧米での5%に対して、本邦においては23%を占めていて、発生頻度は漿液性に続き2番目に高い。漿液性癌は白金製剤を主体とする癌化学療法に対する感受性は比較的良好であるが、明細胞癌は化学療法に低感受性で、残存・再発病変のコントロールは極めて難しく、卵巣癌全体の中でも極めて予後が悪い。以上のことより、明細胞癌の早期発見のためのツールの開発が急務である。HE4 (Human Epididymal Protein 4) は WAP (Whey Acidic Protein) ファミリーに属し、分子量が約 25 kDa の分泌型糖タンパク質である。HE4 は、正常な男女の生殖管上皮、上気道、唾液腺管、胸部で発現しているほか、遠位尿管、結腸、子宮内膜でも可変的な発現が見られる。正常な卵巣上皮では HE4 の発現は見られないが、卵巣癌では血清中で高値を示し、進行癌では非常に高値を示す。ムチン糖タンパク質である CA125 も、卵巣癌の高感度な腫瘍マーカーとして知られているが、HE4 と比較すると特異性が低い。HE4 と CA125 の両方を測定し、卵巣癌および子宮内膜癌の悪性度の評価を行う研究が進められている。また最近、卵巣癌細胞株のプロテオーム解析から、明細胞癌のみに検出されかつ、血中に検出されうる Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) が、世界で初めて報告された (Arakawa N. et al. J Proteome Res. 2013)。

2.研究の目的

本研究では、卵巣癌患者、婦人科良性疾患患者の血清中の CA125、HE4 と TFPI2 濃度を測定し、コンビネーションアッセイの有用性につき検討する。特に、早期明細胞癌患者血清での CA125、HE4、TFPI2 の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を求め、ROC 曲線からカットオフ値を算出する。さらに卵巣癌組織(漿液性、明細胞、類内膜、粘液)中の各マーカーの発現を免疫染色する。これにより、明細胞癌の早期発見には、CA125 よりも TFPI2 と HE4 の組み合わせが有用であることを証明する。さらに、明細胞癌の進行度や治療効果と TFPI2・HE4 の相関、再発時診断における新規マーカーの有用性について検討することで、実地臨床における明細胞癌に対する新たな診断および治療戦略を構築することを目指す。

3.研究の方法

卵巣明細胞癌診断における HE4・TFPI2 測定の有用性

血液・組織サンプルの集積：我々は県内中核病院として、年間約 100 例の婦人科悪性疾患および年間約 300 例の婦人科良性疾患を治療しているため、十分な婦人科癌組織や血液サンプルを集積することが可能である。現在すでに、513 例の卵巣癌サンプルが液体窒素に保管されており、年間 30 例以上の卵巣癌の組織や血清サンプルの蓄積が可能と予想される。また、婦人科良性疾患の組織や血清サンプルも、現在 800 例以上蓄積されていて、年間 300 例以上の蓄積が可能である。これらのサンプルを継続的に集積すること、またサンプルの臨床背景データをリンクさせて、今後行っていく解析の迅速化を目的とする。また、これらのサンプルはすべて、当院の倫理委員会により承認された臨床研究プロトコールのもとに集められた。

血清 HE4・TFPI2 測定：上記で集積されたサンプルを用いて、以下を測定する。CA125 は Phoenix Pharmaceuticals 社の ELISA キットを用いて測定。HE4 は Human HE4/WFDC2 Quantikine ELISA Kit を用いて測定。TFPI2 は Cloud-Clone・Wuhan USCN Life Science Inc. の ELISA キットを用いて測定。

卵巣明細胞癌診断のカットオフ値の設定：測定した卵巣癌組織別および婦人科良性疾患の HE4・TFPI2 値より、卵巣明細胞癌の診断におけるこれらマーカーの血中濃度の感度、特異度などを計算して、カットオフ値を設定する。

卵巣明細胞癌の進行度と HE4・TFPI2 発現との相関について

早期卵巣明細胞癌診断における HE4・TFPI2 の有用性：上記の検討で設定した卵巣明細胞癌診断のための HE4 と TFPI2 カットオフ値を参考に、早期卵巣明細胞癌血清中の HE4・TFPI2 と卵巣癌の汎用マーカーである CA125 を測定して、新規マーカーが CA125 より早期診断に有用なマーカーであるかについて検討する。

卵巣明細胞癌の進行度と HE4・TFPI2 との相関についての検討：HE4 や TFPI2 が卵巣明細胞癌のボリュームと正の相関があれば、新たなマーカーとしてより有用であると考えられる。そのため、進行期別の卵巣明細胞癌血清中の HE4 と TFPI2 を測定することで、進行度とこれらの相関について検討する。

卵巣明細胞癌の治療効果・再発診断における TFPI2 発現の有用性

卵巣明細胞癌の治療効果と TFPI2 との相関についての検討：進行卵巣明細胞癌の抗癌剤治療中において、効果判定は画像検査を用いて行うことが一般的である。しかし、画像検査を毎月行うことは実地診療においては現実的ではないため、3 か月から 6 か月毎に行うことが多い。そのため、毎月行う抗癌剤治療の効果を確認するには、さらなる有用な予測ツールが必要である。上記で得られた検討結果をもとに、抗癌剤治療観察中において、血清中 TFPI2 を経時的に測定して、抗癌剤治療の効果を画像検査よりもより早期にかつ簡便に予測することが可能かどうか検討を行う。

卵巣明細胞癌再発と HE4・TFPI2 についての検討：卵巣明細胞癌治療後の経過観察について、定期的な画像検査により再発の有無を診断することが一般的である。そのため、症状がなくても定期的に画像検査を測定する必要があり、検査の非効率性が問題としてあげられ、また症状が出てから画像検査を行うため、診断までのタイムラグが生まれることが問題としてあげられる。この経過観察期間に血清 HE4・TFPI2 測定を組み入れることで、再発の診断をより効率的にかつ早期に診断可能かどうかについて検討する。

4.研究成果

卵巣明細胞癌診断における HE4・TFPI2 測定の有用性

血液、組織サンプルの集積

当初 2 年間において、当科での保存検体患者の診療録の振り返りと組織の再確認を行った。保存検体及び新規採取検体のうち、明らかに良性疾患である卵巣子宮内膜症性嚢胞と断定されるもの、悪性疾患である卵巣癌のうち、明らかに明細胞癌、漿液性癌、類内膜癌、漿液粘液性癌と断定されるものを抽出した。結果、卵巣子宮内膜症性嚢胞 13 例、卵巣境界悪性腫瘍 2 例、卵巣明細胞癌 7 例、卵巣漿液性癌 2 例、卵巣類内膜癌 7 例、卵巣漿液粘液性癌 1 例を抽出した。

血清 TFPI2 カットオフ値の決定

ELISA キットを用いて上記症例の血清 TFPI2 値を測定した。ROC 曲線から YOUDEN INDEX を用いてカットオフ値を 243pg/ml とした(図1)。同カットオフ値においては感度 49%、特異度 75% となり、臨床的マーカーとして使用するには特異度の低さが問題となる。カットオフ値を 270pg/ml

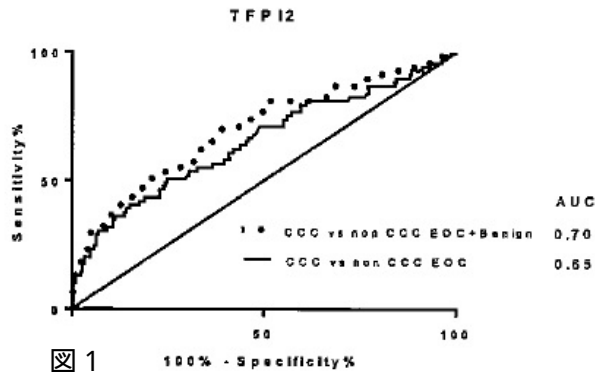


図1

に設定すると感度 44%、特異度 80% となり十分な特異度が得られる。尚、現在卵巣癌のマーカーとして広く使用されている CA125 においては、一般的なカットオフ値 35U/ml としても感度 62%、特異度 25% しかなく、明細胞癌のマーカーとして、TFPI2 は CA125 よりも優れている可能性が示唆された。以降、270pg/ml をカットオフ値として検討を行った。

卵巣明細胞癌の進行度と HE4・TFPI2 発現との 相関について

卵巣明細胞癌の各ステージにおける血清 TFPI2 濃度の測定を行い、TFPI2 濃度と stage が相関するか否かの検討を行った。TFPI2 が 270pg/ml をカットオフ値として設定すると、病期の進行に伴い有意に TFPI2 濃度が上昇することが確認された(図2)。

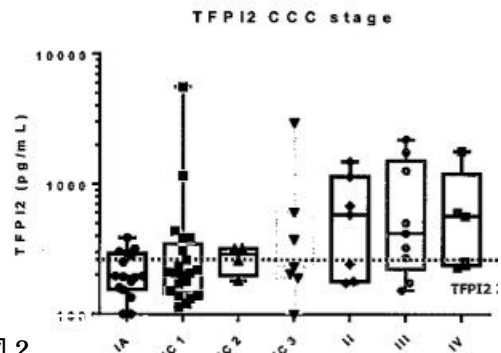


図2

また、TFPI2 濃度と CA125 濃度に相関があるか

を検討したが、TFPI2 濃度と CA125 濃度に相関は認めなかった(図3)

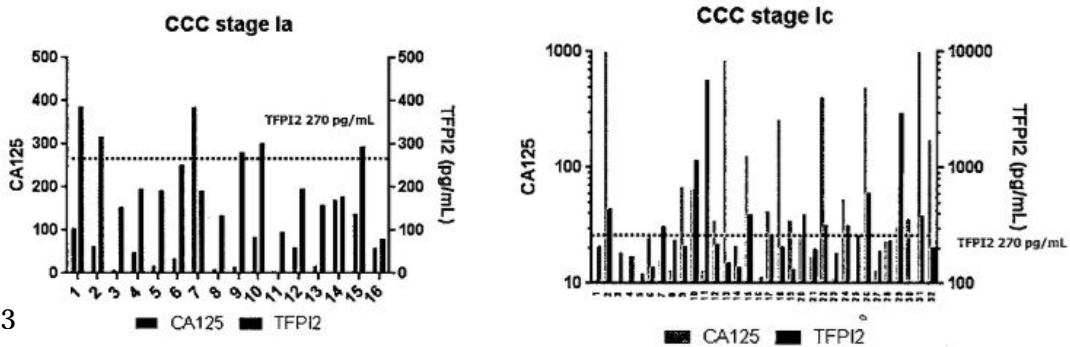


図3

良性・悪性疾患における血清中・組織中 TFPI2 濃度

良性疾患である子宮内膜症、および卵巣癌の各組織型について、それぞれ血清中及び内容液中の TFPI2 濃度を測定した。さらに追加で現在婦人科領域にて実臨床で用いられている各種腫瘍マーカー(CA125, CEA, CA19-9; すべて健康保険適応あり)も同時に検討し、TFPI2 が既存の腫瘍マーカーと同等以上の感度特異度を有することを確認した(図4) また、健常人と他明細胞癌以外の組織型において血清中 TFPI2 濃度を測定し、明細胞癌特異的に上昇することを確認した。同時に既存の卵巣癌腫瘍マーカーである CA125 も

測定し、CA125では卵巣明細胞癌を拾い上げることが困難であることも確認した(図5)

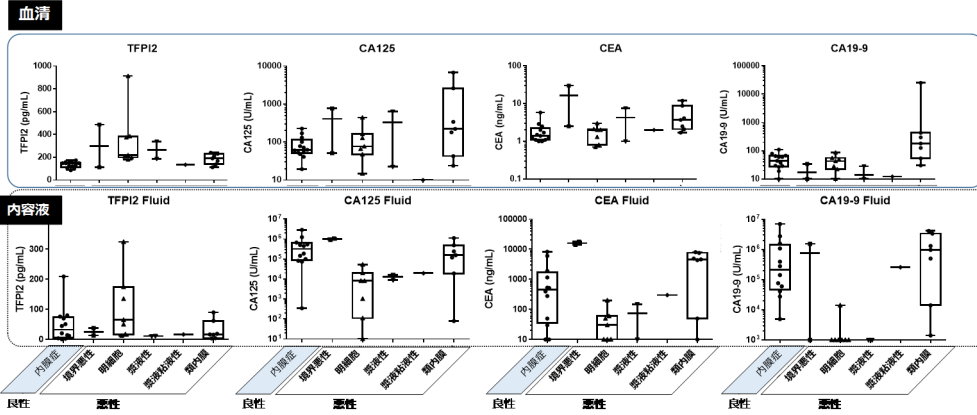


図 4

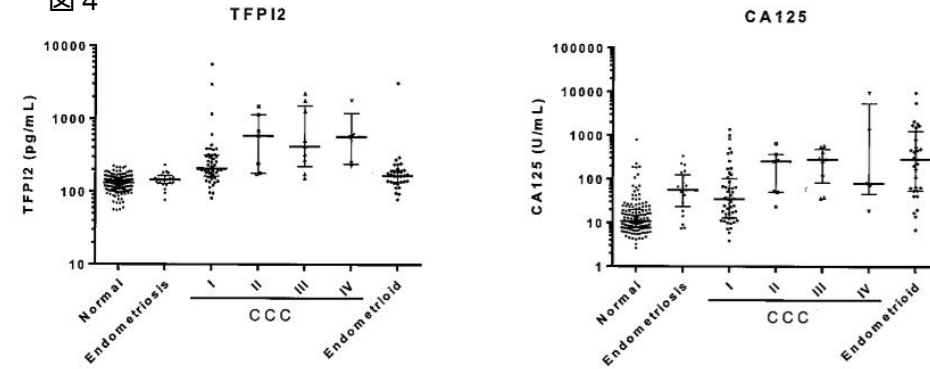
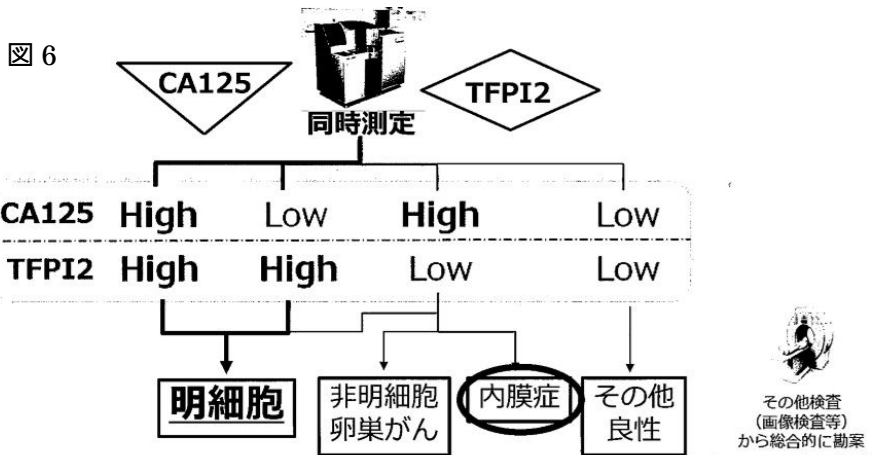


図 5

結果のまとめ

新規マーカーである TFPI2 は良性疾患である卵巣子宮内膜症性嚢胞では上昇せず、卵巣子宮内膜症性嚢胞を前癌病変として発症する卵巣明細胞癌において上昇することを確認した。これは発癌のマーカーとなりうることを示唆する。また、既存の卵巣癌腫瘍マーカーである CA125 では、卵巣明細胞癌患者においては上昇が認められなかったが、新規マーカーである TFPI2 においては卵巣明細胞癌患者において特異的に上昇する。これは既存のマーカー CA125 を補填する可能性がある。早期の臨床応用を目指していきたい。今後の臨床応用のイメージ図を図 6 に示す。



明細胞癌の診断：コンビネーションで「感度向上」
 内膜症からの癌化診断：内膜症とIa期が鑑別可能であり、早期診断に期待

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〕

現在論文については作成、投稿準備中である。

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	川口 龍二 (Kawaguchi Ryuji) (50382289)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	
研究分担者	重富 洋志 (Shigetomi Hiroshi) (20433336)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	