

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09833

研究課題名(和文) 卵巣癌発癌機構の解明と微量核酸解析による癌早期発見を目指した新規検査法の開発

研究課題名(英文) Carcinogenic mechanism of ovarian cancer and of examination of ovarian cancer by NGS analysis

研究代表者

赤羽 智子 (AKAHANE, Tomoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：40398699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：漿液性卵管上皮内癌(STIC)は卵巣高異型度漿液性癌の前駆体とされているがp53 signatureの意義は不明である。そこでp53 signatureの卵管上皮の出現頻度をRRSOと婦人科良性疾患例の卵管采と比較し、TP53変異をp53染色陽性と陰性を示すSTICおよびオカルト癌と比較した。結果、卵管采の出現頻度に症例別の差はなかった。TP53病的変異はRRSO群のみに検出された。2つのSTICには同一codonから開始する相違変異が検出されp53陽性STICと癌には共通する病的変異が検出された。p53 signatureのTP53変異には発癌機構の差異となる2つの特性があると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2020年の人口動態統計の婦人科癌がん死亡者数データ報告は子宮体癌約2600人、子宮頸癌約2800人に対し卵巣癌は約4800人と約2倍となっている。このような状況にも関わらず、卵巣は検診対象臓器でないため卵巣癌の早期検出は困難であり有用な検査方法や腫瘍マーカーは現在も模索中である。卵巣癌だけでなく癌の早期検出は極めて重要な予後因子であり、卵巣癌もFIGOステージ分類 期症例の5年生存率は90%を超える。本研究の実装化による卵巣癌早期検出は、婦人科癌全体の死亡者数の減少だけでなく化学療法における体力的、精神面などの患者自身の多方面にわたる負担および社会医療費負担の軽減へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Serous tubal intraepithelial carcinoma (STIC) is considered a precursor of high-grade serous carcinoma, whereas the significance of the p53 signature remains unclear. In this study, we investigated the relationship between the p53 signature and the risk of ovarian cancer. We analyzed DNA sequencing for TP53 variants of p53 signatures and STIC in RRSO and benign gynecologic disease. TP53 pathogenic variants were detected significantly higher in RRSO group than control ($p < 0.001$). No difference in the frequency of p53 signatures were observed between groups (53.8% vs 29.4%; $p=0.17$). TP53 sequencing and next-generation sequencing analysis in a patient with STIC and occult cancer revealed 2 TP53 mutations causing different p53 staining for STICs and another TP53 mutation shared between STIC and occult cancer. Those results were suggested that sequence analysis for TP53 revealed 2 types of p53 signatures.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌

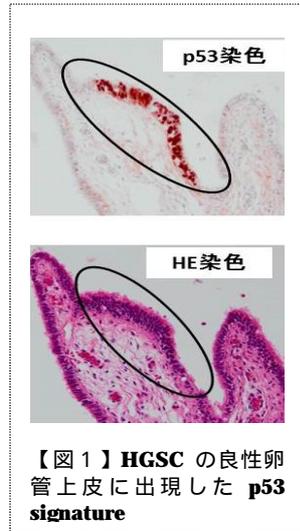
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は研究開始当初に以下の背景があった。

- (1) 卵巣癌は早期検出が難しく婦人科腫瘍の中で最も予後が悪い。世界では年間20万人以上の死亡と31万人以上の新規罹患が報告されているが卵巣は検診対象臓器でないため適切な検診法が存在しない。また卵巣癌は自覚症状に乏しいため初診時進行例が多いなどの理由から早期検出は困難な状況にある。
- (2) 一方、卵巣癌の早期発見が困難であっても、癌が卵巣内に限局したFIGO stage 期例の5年生存率は90%を超えていることから卵巣癌早期検出のための有用なツールを開発することが急務である。
- (3) 近年の研究から、卵巣高異型度漿液性癌(High-grade serous carcinoma 以下HGSC)の一部は良性卵管上皮が漿液性卵管上皮内癌(Serous tubal intraepithelial carcinoma 以下STIC)となり、STICが卵巣本体に移行して増殖・進展する機序が明らかとなった。しかしながらSTICの前段階の細胞は不明である。可能性として良性卵管細胞のp53蛋白強発現現象であるp53 signature(図1)が推測されるが現時点でその可能性は不明である。

そこで本研究はp53 signatureの特性解明と卵巣癌早期検出法の開発を目指すこととした。



2. 研究の目的

卵管上皮のp53 signatureの特性を蛋白発現と遺伝子レベルにて解明し、卵巣癌早期検出につながる手法を確立する。これにより卵巣癌未発症者には卵巣癌の早期発見のための、既発症者には再発時の早期介入へとつながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 解析対象症例

日本人の以下の症例について解析を行った。

リスク低減両側卵巣卵管摘出術(Risk Reducing Salpingo-Oophorectomy: 以下RRSO)施行例; 13例

卵巣嚢腫や子宮筋腫等の婦人科良性疾患例(以下control症例); 17例

RRSO施行例でSTIC共存HGSCオカルト癌例; 1例、

(2) p53 signatureの卵管部位別検出頻度とSTIC検出

免疫組織化学

RRSOの手術摘出卵管をSEE-FIM protocol(Kauff ND et al. J Clin Oncol 2007)にて切り出し作成された全パラフィンブロックより作成した組織切片とcontrol例の手術時摘出検体の卵管採パラフィン切片について高分子ポリマー法による高感度染色法を実施しp53蛋白発現確認してp53 signatureの検出を行った。卵管上皮に確認されたp53 signatureはKi67染色を追加しSTICとの鑑別を行った。

p53 signatureとSTICの判断基準

免疫組織化学にて染色した組織切片のp53 signatureとSTICを次の基準に従い判定した。

・p53 signature 判定基準

形態学的に異型の無い卵管上皮分泌細胞にp53陽性細胞が12個以上連続して存在し、Ki67スコアがKi67 < 10%である。

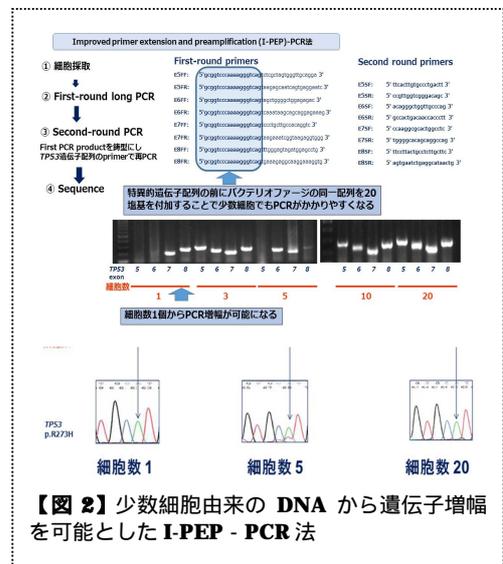
・STIC 判断基準

当該細胞に顕著な核異型、有糸分裂像やアポトーシス小体の存在、細胞分極の喪失およびミスセンス変異または欠失変異のいずれかと互換性がある異常なp53染色パターンがあり、Ki67標識指数の増加Ki67 > 10%である。

(3) I-PEP-PCR 変法による微量細胞由来の遺伝子増幅とTP53遺伝子変異の検出

Laser Capture Microdissection(以下LCM)法による細胞分離

p53 signatureの特性を正確に検出するため、目的細胞のみを選択的にLCM法にて正確に単離した。



Improved primer extension and preamplification I-PEP-PCR 変法 (図 2)

これまでの研究にてパラフィン切片より LCM 法で回収した少数細胞から DNA 抽出することなく direct sequence 可能な I-PEP-PCR 変法を確立している (Akahane T et al. Int J Gynecol Pathol, 2007)。本解析法はパラフィン切片では細胞数約 20 から 50 個、Papanicolaou 染色細胞は 3 個より遺伝子変異の検出が可能であることから本解析法で少数遺伝子を増幅し TP53 遺伝子変異を direct sequence 法で検出した。

(4) オカルト癌検体の次世代シーケンサー解析による遺伝子特性の解析

RRSO が施行されオカルト癌 (HGSC) と STIC が共存していた症例の癌部パラフィン切片より抽出した DNA を、がんの発症と進行に関連する包括的な 275 遺伝子および TERT プロモーターにおける変異を検出可能な次世代シーケンサー (NGS) 用分子バーコードパネル QIAseq Comprehensive cancer panel (QIAGEN)® を使用しにて遺伝子変異解析を実施した。

NGS Library の作成

パラフィン切片由来 DNA より 250ng にて NGS Library の作成を行った。作成した Library は Real-time PCR にてクオリティーチェックと定量を行い 4nM 濃度に希釈後プーリングし、Miseq™ NGS System にて約 900 coverage で稼働した。

データ解析とアノテーション

NGS から出力された FastQ ファイルはクラウド解析システム Gene Grove (QIAGEN)® にて変異抽出した。取得した変異データは COSMIC および ClinVar にて病原性の可能性の高い遺伝子に該当したものを再抽出してアノテーションを行った。

4. 研究成果

(1) 日本人症例の RRSO 例と control 例の卵管上皮における p53 signature の検出頻度

RRSO 例の卵管上皮に出現する p53 signature の卵管部位別検出頻度 (Table 1)

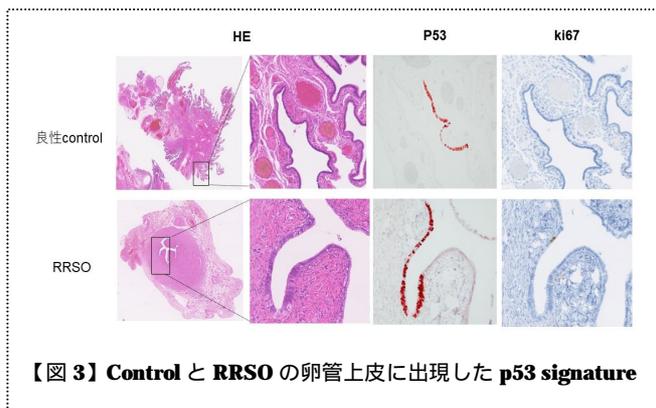
SEE-FIM protocol で切り出しされた卵管に出現した p53 signature を卵管部位別に比較した。その結果、isthmus 1/17 例 (5.8%), Ampulla 2/17 例 (11.7%), Infundibulum 2/17 例 (11.7%), Fimbria 12/17 例 (70.5%) と卵管采に高頻度であった。卵管采に高頻度との報告はこれまで複数されていることから (Lee Y et al. J Pathol 2007, Folkins AK et al. Gynecol Oncol 2008, Visvanathan K et al. Am J Surg Pathol 2011, Mehra KK et al. Mod Pathol 2011) 日本人症例においても相違はないと考察されたが、子宮側近傍の峡部卵管にも明瞭な p53 signature は存在した (図 3 下段 RRSO)。

Table 1 Location of p53 signatures in RRSO samples

	Location				total
	Isthmus	Ampulla	Infundibulum	Fimbria	
Right fallopian tube	0	2	1	6	9
Left fallopian tube	1	0	1	6	8
Right+Left fallopian tube (%)	1 (5.8)	2 (11.7)	2 (11.7)	12 (70.5)	17 (100)

RRSO 例と control 例の卵管采における p53 signature の検出頻度

control 例の卵管は SEE-FIM protocol で切り出しされなかったため卵管采に出現した p53 signature の頻度のみを比較した。その結果、RRSO 7/13 例 (58.3%), control 5/17 例 (29.4%) に検出が確認され、数値的には RRSO 例がわずかに高頻度であったが X² 検定で p=0.17 と統計学的有意差を認めなかった (Table 2)。p53 signature は卵巣癌や BRCA1/2 生殖細胞変異保持者など症例を特定した出現でない可能性が考えられた。



【図 3】 Control と RRSO の卵管上皮に出現した p53 signature

Table2 Frequency of p53 signature in fimbriae of RRSO and control samples

Group (n)		RRSO(13)	control (17)	total	
p53 signature in fimbriae	positive (%)	7 (53.8)	5 (29.4)	12	P=0.17 (Chi-square)
	negative (%)	6 (46.2)	12 (70.6)	18	

(2) p53 signature の TP53 変異

RRSO 例の p53 signature には TP53 変異が複数検出され、COSMIC および ClinVar のデータベース登録で pathogenic 登録されている変異も確認された。検出された変異が卵管からの発癌に関与するかは不明であるが、p53 signature には遺伝子レベルの差異があると考察された。

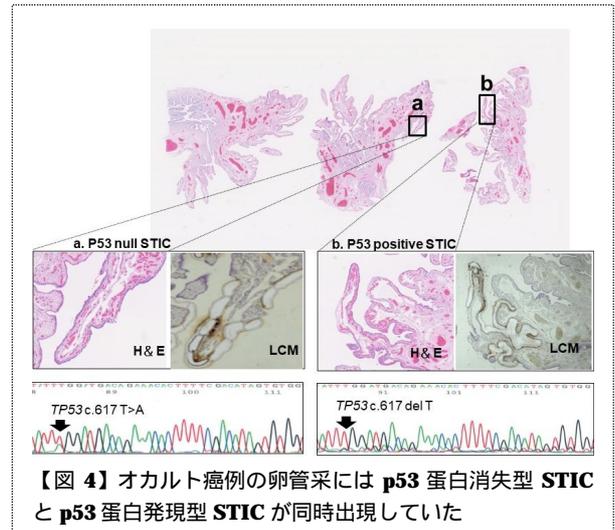
(3) RRSO が施行されたオカルト癌例 (HGSC) の卵管采に付随した p53 消失型(negative) STIC と p53 発現 (positive) STIC の特性

p53 と Ki67 蛋白発現

RRSO が施行された症例のうち 1 例にオカルト癌 (HGSC) が確認された。右卵管采には Ki67 スコアが 10% < 陽性を示す上皮細胞が 2 か所存在したが p53 蛋白の発現は p53 negative と p53 positive と異なっており 2 種類の STIC が同時に存在したと判定した。

p53 negative STIC と p53 positive STIC の TP53 変異特性

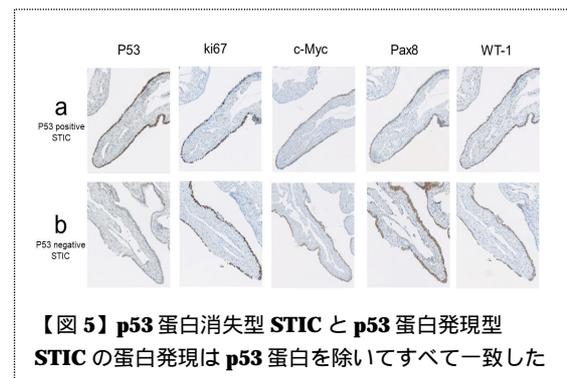
p53 発現の異なる 2 つの STIC の上皮細胞の TP53 変異を検出した。p53 negative (null) STIC には c.617 T>A (p.L206*) 変異が、p53 positive STIC からは c.617del T (p.L206Wfs*41) 変異が検出された (図 4)。検出された 2 つの変異は同一 codon から生じ、異なる位置に STOP codon を形成する変異であった。STOP codon の差異は mRNA の長さの違いから異なる p53 蛋白発現を示す要因となったと考えられた。HGSC には 95% に TP53 の変異が検出されると報告されているが (Nature, 2011) P53 蛋白の発現型と消失型の違いを検討した報告は 2 例のみであり (Kuhn E et al J Pathol. 2012, Mota A, Triviño JC, BMC Cancer. 2015) BRCA1/2 生殖細胞変異陽性の HGSC 例の報告はされていない。本解析結果は予期していなかった事項であるため追加検討をおこなった。BRCA1/2 の生殖細胞変異陽性の HGSC 13 例の腫瘍組織について p53 蛋白の発現と消失の頻度を検討した。結果、p53 発現型 HGSC 8/13 例 (61.5%)、p53 発現消失型 HGSC 5/13 例 (38.5%) であり、BRCA1/2 の生殖細胞変異陽性 HGSC に p53 消失型は約 4 割程度存在することが確認された。本結果は上記 2 つの論文報告と比較し p53 消失型 HGSC の頻度が数値的にわずかに高かった。



【図 4】オカルト癌例の卵管采には p53 蛋白消失型 STIC と p53 蛋白発現型 STIC が同時出現していた

2 種の STIC の蛋白発現の差異

p53 発現型 STIC と p53 消失型 STIC には HGSC に発現陽性を示す c-Myc, Pax8, WT-1 などの蛋白発現は確認されたが、p53 発現だけが異なっていた (図 5)。本結果から追加解析としてオカルト癌の HGSC の起源となった STIC を TP53 変異解析から特定することとした。



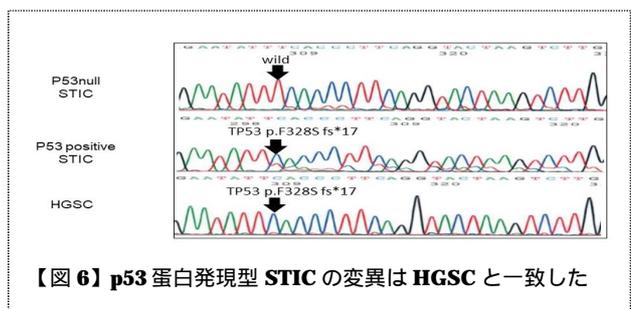
【図 5】p53 蛋白消失型 STIC と p53 蛋白発現型 STIC の蛋白発現は p53 蛋白を除いてすべて一致した

オカルト癌の起源となった STIC の同定

オカルト癌部の網羅的がん関連遺伝子検出 NGS パネル解析では TP53 p.F328fs*17 変異が検出された (Table 3)。2 つの STIC の Direct Sequence 解析では P53 positive STIC の TP53 変異は HGSC と一致し p53 negative (null) STIC は Wild であった (図 6)。解析結果より、今回の症例のオカルト癌は p53 positive の STIC が由来細胞であると考えられた。卵巣癌の織型診断は場合により、追加の化学療法薬選択の幅がひろがる可能性から症例の予後につながる望みがある。p53 染色は組織型診断上困難な症例を確認するために有用ではあるが、蛋白発現陰性の結果は診断に非有益である可能性もあるため必要によって TP53 変異の確認も考慮すべきと考えられた。なお本報告書に記載されたこれらの結果は論文として作成して報告した (J Gynecol Oncol. 2022 Mar 21. doi: 10.3802/jgo. 2022. 33. e50. Online ahead of print)。

Table 3 Gene list detected in HGSC by NGS

Gene_Name	Gene_ID	CHROM	HGVS.c	HGVS.p	VAF		Annotation_Impact		
					somatic	germline	SnpEff	Clinvar	Cosmic
SDHB	ENSG000001	chr1	c.766-2A>G		0.2		HIGH	N/A	N/A
CDC73	ENSG000001	chr1	c.829-1G>T		0.12		HIGH	N/A	N/A
RAD50	ENSG000001	chr5	c.2165delA	p.Lys722fs	0.05		HIGH	pathogenic	N/A
ROS1	ENSG000001	chr6	c.6247A>C		0.629	0.59	HIGH	N/A	Neutral (score 0.15)
TSC2	ENSG000001	chr16	c.3824_3822 p.Phe1275fs		0.16		HIGH	N/A	N/A
TP53	ENSG000001	chr17	c.983delT	p.Phe328fs	0.2		HIGH	N/A	N/A
BRCA1	ENSG000001	chr17	c.188T>A	p.Leu63*	0.77	0.43	HIGH	pathogenic	N/A



【図 6】p53 蛋白発現型 STIC の変異は HGSC と一致した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nanki Yoshiko, Chiyoda Tatsuyuki, Hirasawa Akira, Ookubo Aki, Itoh Manabu, Ueno Masaru, Akahane Tomoko, Kameyama Kaori, Yamagami Wataru, Kataoka Fumio, Aoki Daisuke.	4. 巻 10
2. 論文標題 Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumours applicable for drug sensitivity and resistance testing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69488-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshihama Tomoko, Hirasawa Akira, Sugano Kokichi, Yoshida Teruhiko, Ushima Mineko, Ueki Arisa, Akahane Tomoko, Nanki Yoshiko, Sakai Kensuke, Makabe Takeshi, Yamagami Wataru, Susumu Nobuyuki, Kameyama Kaori, Kosaki Kenjiro, Aoki Daisuke.	4. 巻 10
2. 論文標題 Germline multigene panel testing revealed a BRCA2 pathogenic variant in a patient with suspected Lynch syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal	6. 最初と最後の頁 6-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13691-020-00449-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akahane Tomoko, Hirasawa Akira, Imoto Issei, Okubo Aki, Itoh Manabu, Nanki Yoshiko, Yoshihama Tomoko, Tominaga Eichiro, Aoki Daisuke.	4. 巻 33
2. 論文標題 Establishment and Characterization of a New Malignant Peritoneal Mesothelioma Cell Line, KOG-1, From the Ascitic Fluid of a Patient With Pemetrexed Chemotherapy Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 272-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-019-00286-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akahane Tomoko, Masuda Kenta, Hirasawa Akira, Kobayashi Yusuke, Ueki Arisa, Kawaida Miho, Misu Kumiko, Nakamura Kohei, Nagai Shimpei, Chiyoda Tatsuyuki, Yamagami Wataru, Hayashi Shigenori, Kataoka Fumio, Banno Kouji, Sugano Kokichi, Okita Hajime, Kosaki Kenjiro, Nishihara Hiroshi, Aoki Daisuke.	4. 巻 33
2. 論文標題 TP53 variants in p53 signatures and the clonality of STICs in RRSO samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3802/jgo.2022.33.e50	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤羽智子, 平沢 晃, 富永英一郎, 井本逸勢, 大久保亜希, 伊藤 学, 南木佳子, 吉浜智子, 増田健太, 千代田達幸, 山上 亘, 片岡史夫, 青木大輔.
2. 発表標題 悪性腹膜中皮腫細胞株KOG-1の3次元立体培養と2次元平面培養によるPEM薬剤感受性の比較
3. 学会等名 第61回 日本臨床細胞学会総会春期大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nanki Yoshiko, Chiyoda Tatsuyuki, Hirasawa Akira, Akahane Tomoko, Yamagami Wataru, Kataoka Fumio, Tanaka Mamoru, Aoki Daisuke.
2. 発表標題 Primary tissue ovarian cancer organoids capture histological and genetical features of the original tumor which can be applied to drug sensitivity testing
3. 学会等名 第72回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤羽智子, 西原広史, 平沢 晃, 井本逸勢, 増田健太, 坂本一平, 野原祥夫, 谷嶋成樹, 青木大輔.
2. 発表標題 BRCA1 VUS保持卵巣癌例におけるバリエントの病的意義に関する検討
3. 学会等名 第26回 日本遺伝性腫瘍学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南木佳子, 千代田達幸, 平沢 晃, 大久保亜紀, 伊藤 学, 吉村拓馬, 赤羽智子, 山上 亘, 青木大輔.
2. 発表標題 Ovarian cancer organoids recapitulate genomic alterations of the parental tumors
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤羽智子, 西原広史, 平沢 晃, 井本逸勢, 坂本一平, 野原祥夫, 谷嶋成樹, 青木大輔.
2. 発表標題 卵巣癌発症との関連性が推測されたBRCA1遺伝子のVUSに関する検討
3. 学会等名 第5回 日本産科婦人科遺伝診療学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nanki Y, Hirasawa A, Chen Y, George A, Akahane T, Chiyoda T, Nomura H, Saal L, Tanaka M, Aoki D.
2. 発表標題 Circulating tumor DNA as a novel biomarker for recurrence and treatment response in ovarian cancer patients
3. 学会等名 第71回 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

〔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	山上 亘 (YAMAGAMI Wataru) (30348718)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	
研究 分担者	片岡 史夫 (KATAOKA Fumio) (40306824)	国際医療福祉大学・医学部・准教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------