

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390449

研究課題名（和文）上皮間葉移行誘導の分子機構解析による上皮性卵巣がんの浸潤・転移の病態解明

研究課題名（英文）Down regulation of antigen presentation pathway plays an important role in metastasis and progression of advanced stage of epithelial ovarian cancer.

研究代表者

田中憲一（TANAKA KENICHI）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10126427

研究成果の概要（和文）：

上皮性卵巣がんは近年我が国で増加、毎年 1 万人が罹患、約 6000 人が死亡するにもかかわらず、過去 20 年間治療成績は向上せず、有効な検診制度も確立されていない。進行期上皮性卵巣がん 1054 例（漿液性腺がん）を用いて遺伝子発現プロファイルによる予後予測を実施、遺伝子発現と予後を比較した結果、抗原提供システムの低下が予後不良群の特徴として観察された。以上の結果は癌免疫療法に組織適合抗原の活性化が必須であることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：

High-grade serous ovarian cancers are heterogeneous not only in terms of clinical outcome but also at the molecular level. Our aim was to establish a novel risk classification system based on a gene expression signature for predicting overall survival, leading to suggesting novel therapeutic strategies using EMT molecules for high-risk patients. This risk classification based on the gene expression signature is an accurate predictor of clinical outcome in patients with advanced stage high-grade serous ovarian cancer and has the potential to develop new therapeutic strategies for high-grade serous ovarian cancer patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣がん、EMT、抗原提供、遺伝子発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

食生活の西欧化、ホルモン環境の変化、少子化、あるいは晩婚化などの影響により、近年、本邦では卵巣がんの罹患率が急増している。卵巣がんは他のがんと異なり、診断された時は進行がんの状態であることが多い。それゆえにプラチナ製剤に加えタキサン製剤を用いたレジメンの導入により、治療成績は向上しているにも関わらず、進行期症例の5年生存率は40%前後と低く、女性生殖器系の腫瘍の中では死亡率第1位を占めている。卵巣がんは予後が不良なことより、早急に克服すべき腫瘍の一つであるが、現在用いられている形態観察に基づいた病理組織学的診断、臨床所見による分類では、腫瘍組織全体像の把握には至らず、依然、卵巣がんの病態は明らかでなく、生存率向上には寄与していない。これらの現状を踏まえて、網羅的な遺伝子発現解析の基盤テクノロジーであるDNAマイクロアレイ技術を用いて、卵巣がん組織内のmRNAの発現プロファイルを総合的に解析、これら体系的遺伝子発現情報と従来の組織学的分類による情報を組み合わせる卵巣がんの新しい病型診断法の確立を目指し、研究を行ったところ、上皮間葉移行(EMT)に関与しているといわれている Zinc-finger 型転写因子 ZEB2 の高発現と細胞間接着因子 CDH1 の発現低下が予後不良に強く働いていることが明らかになった。

EMT が誘導されると上皮細胞としての特性を失い、周辺組織に移動しやすい間葉系細胞としての特徴を獲得するため、

誘導を阻害、上皮細胞としての機能を保つことが、進行期卵巣がんの予後改善につながると考えられる。

2. 研究の目的

以上の先行研究の結果を踏まえて、本研究課題では研究テーマを EMT による上皮マーカー制御と増殖制御とするが、その前段階として、多施設共同研究で新規に数百例以上の卵巣がん組織を集積、遺伝子発現プロファイルデータと臨床病理学的情報を統合的に解析、予後予測に関与する遺伝子群を分離、上皮性卵巣がんにおける腫瘍の浸潤、進展に EMT 関連遺伝子群がいかに関わっているかを体系的に明らかにし、上皮マーカー抑制あるいは細胞増殖に働く KEY 遺伝子を抽出する。

3. 研究の方法

(1) 検体収集

乳がんあるいは肺がんなどにおける予臨床応用可能な予後予測に必要な検体数は実験モデルにもよるが、数百から1000例とされている。我々の先行研究の110例では不十分である事は明らかであり、引き続いて500例を目指し、検体収集を継続する。症例はFIGO 臨床進行期 III/IV、漿液腺がん、手術前の化学療法なし、術後の治療はタキサン/プラチナ併用化学療法法の症例に限定する。

(2) 遺伝子発現解析

・マイクロアレイによる解析

集積した症例を二群に分け、test set , validation set として用いる。

Test set の腫瘍組織より RNA を抽出、Agilent Whole Human Genome OligoMicroarray (41078 probes) を使用、解析を行う。

- データのオリティチェック (QC)による解析すべき遺伝子の抽出

以下の操作により、遺伝子発現データの標準化する。

発現の低い遺伝子、全サンプル間の標準偏差が小さい遺伝子を除外。

遺伝子発現の全分散を計算し、変動の大きい遺伝子を抽出。

- 予後予測インデックスの作成

S/N 比 (遺伝子毎に発現量の郡内平均の差と郡内標準偏差の平均の比) の高い遺伝子を抽出し、さらに pair wise 法により各遺伝子の判別性能をランキングする。

- テストセットにて確認された結果を Validation set を用いた検証実験を行う。これらのデータを基に症例の層別化を行い、各グループにおける予後予測インデックスの有用性を検証する。

(3) 上皮間葉移行および細胞増殖に的を絞ったカスタム PCR アレイによる遺伝子発現プロファイル解析

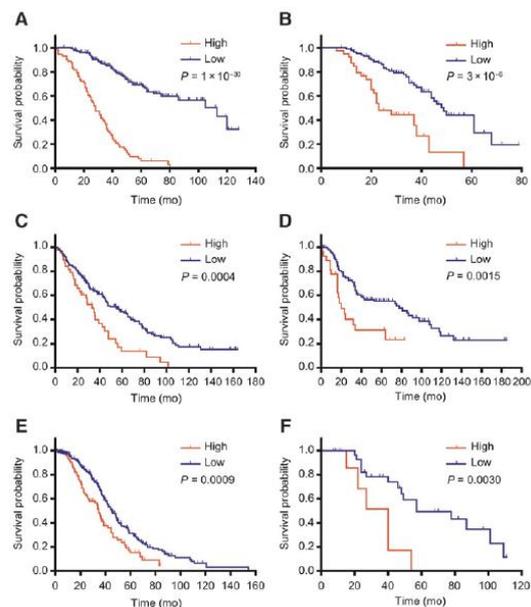
予後予測インデックスを構成する遺伝子は数百を超えると予測されるため、これら遺伝子群より EMT 誘導あるいは、細胞増殖に関与する遺伝子群を選出、カスタム PCR アレイを作成する。カスタムアレイを用いた遺伝子の発現プロファイルにそれぞれの症例の臨床情報を加えた統合的な解析を実施、上皮間葉移行および細胞増殖に関与する遺伝子群と生存率、抗がん剤耐性、転移の有無等臨床情報との相互関係を明らかにする。

4. 研究成果

進行期卵巣がん (漿液性腺がん) 六つの異なる基盤上の 1054 症例 (自験例 400 例、外部公開データ 654 例) の発現プロファイル解析を行った。まず、日本人の 260 例を対象に統計処理により 126 遺伝子による予後予測モデルを作成、次にその有用性を他の 5 つの基盤上にある 794 例で検証した。腫瘍組織の遺伝子の解析を行い、126 遺伝子の発現解析により、日本人のデータは言うに及ばず他の 5 つの基盤上の外部データで進行期卵巣がん症例の中で本当に予後の悪い症例を予測することに成功した。

(日本人データセット A : 多変量解析 $P = 4 \times 10^{-20}$ 、Toothill' s dataset, $P = 1 \times 10^{-5}$; Bonome' s dataset, $P = 0.0033$; Dressman' s dataset, $P = 0.0016$; TCGA dataset, $P = 0.0027$; 日本人データセット B, $P = 0.021$).

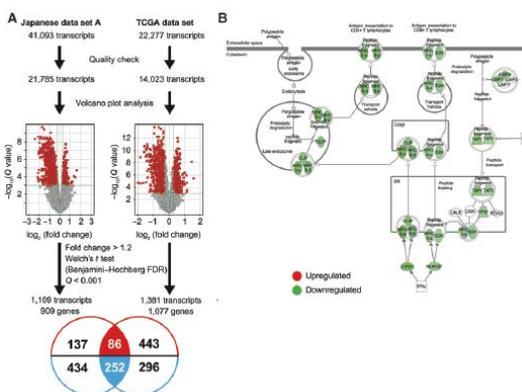
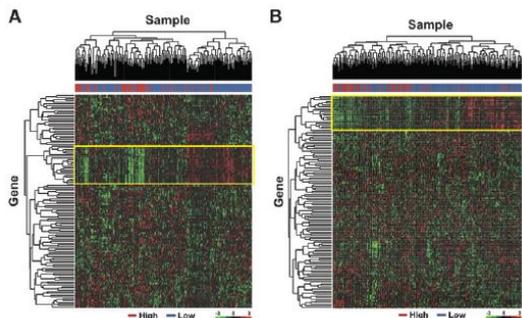
次いで、126 遺伝子の発現で予後良好群と不良群に分けたところ、 Kaplan-Meier 法で有意差が認められた。



予後予測モデルで分けられた良好群、不良群の遺伝子の変化を自験例400例とTCGA症例両

者で計測したところ、予後良好群で発現が低下、逆に予後不良群で発現が更新している遺伝子群が両者のグループで共通に認められた。

更に、これら遺伝子の機能解析をGO解析、Passway 解析したところ、予後不良群腫瘍組織では、免疫応答とりわけ細胞障害性T細胞へ腫瘍抗原を提示する機能が極端に低下している事が認められた。



126遺伝子による予後予測は画期的且つ信頼性の高いものであり、ハイグレード卵巣がんの中でも、とりわけ予後の悪い症例に対する新しい治療戦略の確立に有望と期待される。更に両群の発現遺伝子の解析の結果、p53 変異の頻度、細胞周期、増殖に関与する遺伝子の発現は変化せず、APM の顕著な低下と CD8 陽性腫瘍内浸潤リンパ球 (以下 TIL) の減少が予後不良群の特徴として認められた。この研究成果のうち特筆すべきは、予後が悪い腫瘍組織に共通する特徴として、組織適合性抗原が消失している事を発見した点である。その結果、細胞障害性T細胞が働く事が

できず、予後不良に結びつく事が明らかになった。散発的に組織適合性抗原の消失が予後不良に結びつく事は、卵巣がんのみならず、ほかのがんでも報告されていたが、本研究の様に1054例という多数の症例を用いた事のみならず、網羅的な遺伝子解析で、今日の結果を見出した点は、信頼性も高く、貴重な結果であろう。大多数の網羅的な遺伝子解析で組織適合性抗原の消失が予後不良に結びつく点を発見したのは、我々の報告が世界最初であり、高く評価されている。現在、卵巣がんに対するペプチド免疫療法については見るべき結果に乏しいがそれは、組織適合性抗原が消失している事を考慮せずに実施している点によるものと思われる。将来、我々の研究成果を踏まえ、消失した組織適合性抗原を再び戻す方法を加えた免疫療法の可能性を明らかにした点に、本研究の成果が卵巣がん患者に与える福音の将来性を認める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Yoshihara K, Tanaka K, 他27名 High risk ovarian cancer based on 126-gene expression signature is uniquely characterized by down-regulation of antigen presentation passway Clin. Cancer Res. 2012 18(5):1374-85 (査読あり)
2. Yoshihara K, Tanaka K, 他7名 Germline Copy Number Variations in BRCA1-Associated Ovarian Cancer Patients Genes, Chromosomes and Cancer 2011; 50:167-177 (査読あり)
3. Yoshihara K, Tanaka K, 他 14 名 Gene

expression profile for predicting survival in advanced-stage serous ovarian cancer across two independent datasets. PLoS One 2010;5: e9615 (査読あり)

〔学会発表〕(計 8件)

1. Yoshihara K. Tanaka K., 他 4 名 Gene expression profile for predicting survival in ovarian cancer across two independent datasets 第 101 回アメリカ癌学会 2011 年 4 月 12 日 Washington D.C. U. S. A.

2. 吉原弘祐、田中憲一、他 2 名 個別化医療を目的とした漿液性卵巣癌の予後予測プロフィールの同定
第 62 回日本産科婦人科学会学術集会 2011 年 8 月 29 日 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 憲一 (TANAKA KENICHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：10126427

(2) 研究分担者

八幡 哲郎 (YAHATA TETSURO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：90293232

吉原 弘祐 (YOSHIHARA KOUSUKE)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：40547535

関根 正幸 (SEKINE MASAYUKI)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：70345502

(3) 連携研究者

なし

