

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 4月30日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592104

研究課題名（和文）子宮内膜症性嚢胞の悪性転化に伴う癌関連遺伝子近傍の遺伝子変異の解析

研究課題名（英文）Gene mutations flanking tumor-related genes associated with malignant transformation of ovarian endometriosis

研究代表者

北脇 城（KITAWAKI JO）

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00204925

研究成果の概要（和文）：子宮内膜症性嚢胞（卵巣チョコレート嚢胞）は一般に良性腫瘍であるが、その0.7～1.6%が悪性転化して卵巣癌を発生する。今回、病理組織学的悪性転化基準を満たす卵巣癌12例を用い、同一切片内の内膜症、移行部および悪性の各組織から計31か所の loss of heterozygosity (LOH)を検出した。免疫組織染色ではアロマターゼのみが内膜症と癌組織間で染色強度の差を認めた。悪性転化に候補遺伝子の LOH が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Although ovarian endometriosis follows a benign course, the frequency of the malignant transformation of endometrioma is estimated at about 0.7–1.6%. Here we detected totally 31 loss of heterozygosity events in endometriosis, transitional and carcinoma tissues. Immunohistochemistry revealed that only aromatase was differentially expressed between endometriosis and carcinoma tissues. Our study suggested that LOH in some candidate gene loci may be involved in malignant transformation of endometriosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：子宮内膜症、悪性転化、卵巣癌、loss of heterozygosity、癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症の有病率は性成熟期女性の約10%、有病者数は国内で130万人、受療者数は12.8万人と推定され、少子少産化に伴って増加傾向にある疾患である。月経痛や慢性骨盤痛などの疼痛と不妊をきたし、女性のQOLを著しく障害する良慢性疾患である。病因は未だ不明であるが、逆流した月経血の一部が腹腔内に生着するとする移植説が有力で

ある。子宮内膜症性嚢胞は、子宮内膜症病変が卵巣内に発生し、チョコレート状の内容液をもつ嚢胞を形成する。卵巣チョコレート嚢胞とも呼ばれ、子宮内膜症患者の17–44%に発生する。子宮内膜症性嚢胞は20～30代に多く発生するため、腹腔鏡下に嚢胞摘出術を行い卵巣機能を温存する方法が標準的治療法である。

しかし、疫学的調査で子宮内膜症性嚢胞を

有する女性から卵巣癌、特に明細胞癌と類内膜癌の発生が多いことが示されてきた。明細胞癌と類内膜癌の約 5%には子宮内膜症病変が伴う。これらの「子宮内膜症合併卵巣癌」に対して、「子宮内膜症性嚢胞から悪性転化によって生じた卵巣癌」であることを証明するには、Sampson および Scott により提唱された厳格な組織学的基準を満たす必要がある。悪性転化の頻度は 0.7~1.6%である。

比較的若い女性に発生する良性疾患である子宮内膜症に対して卵巣機能を温存しなければならない一方、比較的高率の悪性転化のためにはできれば切除すべきであるという相反する点が臨床的なジレンマとなっており、この分野では現在国内外で最も注目されている話題のひとつである。

しかしながら、悪性転化の分子機構についてはあまり研究が進んでいない。一部の研究において、子宮内膜症および卵巣癌組織で loss of heterozygosity (LOH)の存在が示され、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異、PTEN、TP53、hMHL1、p16^{INK4a}、K-ras のメチル化やタンパク発現の消失などが報告されてきた。しかし、これらの研究は子宮内膜症組織や子宮内膜症合併卵巣癌組織を用いて行われたものであり、子宮内膜症から生じた卵巣癌を用いたものではなかった。これらは同時に存在する子宮内膜症が卵巣癌の発生源であるという仮定のもとに行われているが、必ずしもその証拠はない。さらに、子宮内膜症から悪性転化により生じた卵巣癌を証明しえた組織を多数例集めることは非常に困難であることも研究を妨げる一因となっている。

我々は約 15 年間子宮内膜症に特化して臨床、研究を行ってきた。子宮内膜症(Kitawaki et al, 1997)および卵巣癌(Kitawaki et al, 1997)におけるエストロゲン生成酵素アロマターゼの発現を初めて明らかにした。平成 10 年度からは世界に先駆けて子宮内膜症の遺伝子多型の解析に着手し、エストロゲン・レセプター α 遺伝子をはじめ、さまざまな免疫関連遺伝子やサイトカインなどの遺伝子多型が子宮内膜症の発生リスクに関連することを発表してきた(Kitawaki J et al, 2001, 2004ab, 2006ab, 2008)。また、悪性転化の問題にも早くから着目し、悪性転化に伴うアロマターゼの発現様式の変化を明らかにした(Kusuki et al, 2001)。

これらの経緯の中で、我々は子宮内膜症合併卵巣癌および悪性転化により生じた卵巣癌組織を多く収集してきた。そして、5 例の悪性転化卵巣癌組織を用いた予備的検討において、同一切片内の内膜症、移行部および悪性の各組織、および正常組織をマイクロダイセクションにより切り出し、各組織より抽出した DNA を解析したところ、癌関連遺伝

子は 1 例において PTEN のみに変異がみられ、LOH は 13 種類の中で 11 箇所検出した。このことから、従来知られている癌関連遺伝子には大きな変異がなく、その近傍の部位に LOH が高率に起こっている可能性がある。

2. 研究の目的

今回申請の研究では、子宮内膜症合併卵巣癌および悪性転化により生じた卵巣癌組織を用いて、同一切片内の内膜症、移行部および悪性の各組織をマイクロダイセクションにより切り出し、各組織より抽出した DNA より癌関連遺伝子の変異および LOH を解析し、癌関連遺伝子近傍の遺伝子変異を明らかにする。さらに、免疫組織染色により各組織間でのタンパク発現様式の差異について明らかにする。この研究成果により、卵巣癌の発生機序に迫るとともに、子宮内膜症性嚢胞の中で悪性化を起こしやすいものとそうでないものとの識別に応用が可能となり、臨床的にも特に有用であると期待できる。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜症合併卵巣癌および悪性転化卵巣癌の試料の追加収集

子宮内膜症性嚢胞よりの悪性転化卵巣癌組織は、その証明が困難であることから、非常に収集が困難である。症例はすべて卵巣癌発生前に子宮内膜症性嚢胞の病歴が明らかであり、病理組織学的に子宮内膜症の悪性転化の診断基準を満たす必要がある。

我々は長年の研究歴の中で現在までに 10 例の組織を収集しており、これに 20 例以上の子宮内膜症合併卵巣癌の組織を得ている。これは国内外を通じて最大規模である。しかし、さらに組織数を得るために、本研究期間には関連病院等よりの紹介を強化して多数の症例を収集する。

(2) 癌関連遺伝子の変異の解析

パラフィン包埋ブロックのうち、子宮内膜症組織が癌組織と連続している同一切片内で、子宮内膜症、移行部および癌の各組織、および正常組織をレーザー・マイクロダイセクションにより切り出す。抽出した DNA はごく微量であるので、目的の遺伝子を nested PCR により増幅し、GeneScan により塩基配列を解析する。

(3) LOH の解析

癌関連遺伝子の変異を解析するだけでは、おそらく十分な変異が得られないことが予想される。そこで、目的の遺伝子領域を nested PCR により増幅し、蛍光ラベルしたマイクロサテライト・マーカーを用いて ABI PRISM 377 シーケンサーキャピラリー電気泳動を行い、分析ソフトである GeneScan Collection および Peak Scanner を用いて LOH を解析する。

(4) タンパク発現様式の検討

子宮内膜症組織が癌組織と連続している同一切片を用いて、各種タンパクに対する抗体を使用してストレプトアビジン-ビオチン法により免疫組織化学染色を行う。使用する抗体は、各種癌遺伝子と癌抑制遺伝子産物、アポトーシス関連タンパク、ステロイド関連タンパクなどとする。

4. 研究成果

SampsonとScottの病理組織学的悪性転化基準を満たし明確な臨床病歴を示す卵巣癌12例を用いた。6本の染色体上の13種のマイクロサテライト・マーカーを用いて計31か所のLOHを検出した(雑誌論文⑤)。免疫組織染色では、アロマターゼが内膜症と癌組織間で染色強度の差を認めた。しかし、ステロイド・レセプターのER α 、ER β 、PgR、アポトーシス関連のFAS、FAS-Ligand、Bax、Bcl-2、そして癌関連のPTEN、P53、hMLH1、p16^{INK4a}は、全例で内膜症、移行部、癌の間で染色性に差がなかった。

検出したLOHの情報を基づき癌関連遺伝子近傍の悪性化に関与すると予想される遺伝子Xの変異に着目して検討中である。この研究成果により、卵巣癌の発生機序に迫るとともに、子宮内膜症性嚢胞の中で悪性化を起しやすいためとそうでないものとの識別に応用が可能となり、臨床的にも特に有用であると期待できる。

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40件)

- ① Miller PB, Parnell BA, Bushnell G, Tallman N, Forstein DA, Higdon HL 3rd, Kitawaki J, Lessey BA. Endometrial receptivity defects during IVF cycles with and without letrozole. Hum Reprod 27: 881-888, 2012. 査読有 10.1093/humrep/der452
- ② Yamanaka K, Xu B, Suganuma I, Kusuki I, Mita S, Shimizu Y, Mizuguchi K, Kitawaki J. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture. Fertil Steril 97: 477-482, 2012. 査読有 10.1016/j.fertnstert.2011.11.005
- ③ Kitawaki J, Kusuki I, Yamanaka K, Suganuma I. Maintenance therapy with dienogest following gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for endometriosis-associated

pelvic pain. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 157: 212-216, 2011. 査読有 10.1016/j.ejogrb.2011.03.012

- ④ Mori T, Sawada M, Kuroboshi H, Tatsumi H, Katsuyama M, Iwasaku K, Kitawaki J. Estrogen-Related Receptor α Expression and Function Are Associated With Vascular Endothelial Growth Factor in Human Cervical Cancer. Int J Gynecol Cancer 21: 609-615, 2011. 査読有 10.1097/IGC.0b013e3182017e9b
- ⑤ Xu B, Hamada S, Kusuki I, Itoh R, Kitawaki J. Possible involvement of loss of heterozygosity in malignant transformation of ovarian endometriosis. Gynecol Oncol 120: 239-246, 2011. 査読有 10.1016/j.ygyno.2010.10.036
- ⑥ Mori T, Hosokawa K, Sawada M, Kuroboshi H, Tatsumi H, Koshihara H, Okubo T, Kitawaki J. Neoadjuvant weekly carboplatin and paclitaxel followed by radical hysterectomy for locally advanced cervical cancer: long-term results. Int J Gynecol Cancer 20: 611-616, 2010. 査読有 10.1111/IGC.0b013e3181d80aa9

[学会発表] (計64件)

- ① Kitawaki J, Laparoscopic Surgery and Medical Management of Deep Infiltrating Endometriosis. 6th AAGL International Congress on Minimally Invasive Gynecology in conjunction with 12th APAGE Annual Congress hosted by JSGOE, 2011年12月11日, Osaka
- ② 北脇 城、エストロゲンとプロゲステロゲンの種類と特徴、第26回日本女性医学学会、2011年11月12日、神戸国際会議場(神戸市)
- ③ Kitawaki J, Kusuki I, Yamanaka K, Suganuma I. Sequential administration of gonadotropin-releasing hormone agonist followed by dienogest maintains the relief of endometriosis-associated pelvic pain. 11th World Congress on Endometriosis. 19th International Pelvic Pain Society Annual Scientific Meeting, 2011年9月5日, Montpellier, France
- ④ 北脇 城、子宮内膜症診断治療の最前線、第63回日本産科婦人科学会、2011年8月31日、リーガロイヤルホテル(大阪市)
- ⑤ Kitawaki J, Management of endometriosis in Japan. 19th International Pelvic Pain Society Annual Scientific Meeting, 2011年5月27日, Istanbul, Turkey

- ⑥ 北脇 城、中高年女性に対するホルモン補充療法の新しい展開 ホルモン補充療法に用いられる黄体ホルモンの種類と特徴、第 84 回日本内分泌学会、2011 年 4 月 23 日、神戸国際展示場（神戸市）
- ⑦ 北脇 城、機能性月経困難症と器質性月経困難症 Update. 第 32 回日本エンドメトリオーシス学会、2011 年 1 月 23 日、東京
- ⑧ 北脇 城、子宮内膜症の新しい治療戦略. 日本産科婦人科学会北日本地方部会. 2010 年 9 月 19 日、金沢
- ⑨ 北脇 城、エストロゲンのシグナル伝達機構 Update. 第 122 回近畿産科婦人科学会. 2010 年 6 月 20 日、京都
- ⑩ 北脇 城、子宮内膜症の治療ストラテジー. 第 129 回日本産科婦人科学会東北連合地方部会. 2010 年 5 月 23 日、盛岡
- ⑪ 北脇 城、不妊治療における内視鏡手術の意義：子宮内膜症. 第 27 回日本受精着床学会、2009 年 8 月 7 日、京都
- ⑫ 北脇 城、黄体ホルモン. 第 24 回日本更年期医学会、2009 年 10 月 3 日、青森
- ⑬ 北脇 城、子宮内膜症の治療最前線. 第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会、2009 年 4 月 3 日、京都

[図書] (計 8 件)

- ① 北脇 城 (分担執筆)、医学書院、今日の治療指針 2012 版、2012、1955 頁(1069-1070)
- ② 北脇 城 (分担執筆)、京都大学学術出版会、卵子学、2011、1195 頁(512-520)
- ③ 北脇 城 (分担執筆)、日本臨牀社、子宮腺筋症・子宮内膜症における最新の動向、2011、528 頁(14-19)
- ④ 北脇 城 (分担執筆)、日本医事新報社、よくわかる病態生理 12 婦人科疾患、2009、255 頁(196-198, 199-202)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北脇 城 (KITAWAKI JO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00204925