

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 1日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791524

研究課題名（和文） 卵巣子宮内膜症の癌化過程におけるミスマッチ修復異常の関与

研究課題名（英文） Involvement of mismatch repair abnormalities in the malignant transformation of ovarian endometriosis

研究代表者

布施谷 千穂（FUSEYA CHIHO）

信州大学・医学部附属病院・助教（診療）

研究者番号：50447736

研究成果の概要（和文）：

子宮内膜症の癌化過程へのミスマッチ修復(MMR)機構異常の関与を検討した。MMR 蛋白発現は、正所性子宮内膜、卵巣子宮内膜症、卵巣癌の順に減少し、マイクロサテライト不安定性陽性率は、逆に増加した。さらに正常子宮内膜腺上皮細胞を炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)存在下で長期培養したところ、MMR 蛋白発現が抑制された。これらのことから、炎症によって誘導される MMR 機構異常が子宮内膜症の癌化過程に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the mismatch repair (MMR) abnormalities in the carcinogenetic process of endometriosis were analyzed. The immunohistochemical expressions of mismatch repair proteins were step-wisely decreased in normal entopic endometrium, endometriosis, and ovarian carcinoma. Inversely, the step-wisely increasing frequencies of microsatellite instability in normal entopic endometrium, endometriosis, and ovarian carcinoma were observed. In addition, the down-regulations of MMR proteins were observed in cultured normal endometrial glandular cells under the condition with inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6). These findings suggest that mismatch repair abnormalities, which are induced by inflammation, might be involved in the malignant transformation of ovarian endometriosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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、癌化、ミスマッチ修復

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、子宮以外で子宮内膜腺上皮と間質を含む子宮内膜組織の存在によって特徴づけられる婦人科疾患で

ある。中でも、卵巣に発生する卵巣子宮内膜症は、生殖期間に月経様の出血が蓄積した結果として、チョコレート状の液体を含む嚢胞を形成する良性腫瘍であ

る。しかし、これまでに卵巣子宮内膜症から発生したと考えられる卵巣癌の症例や、子宮内膜症は正常子宮内膜そのものとは異なる腫瘍性増殖能を持つことが報告されている。さらに、最近、Kobayashiらは卵巣子宮内膜症の17年間の追跡調査において、卵巣子宮内膜症を有する患者からの卵巣癌の発生は、卵巣子宮内膜症を有しないコントロール群と比べて相対危険率は12.4倍であることを報告した(Kobayashi, et al. Eur J Ob&Gyn Reprod Biol.2008)。このことから、卵巣子宮内膜症は、“癌化”する可能性がある疾患といえる。我々は、信州大学附属病院と長野県内の関連病院で10年間に手術療法が行われた卵巣癌543例と境界悪性腫瘍252例の患者の超音波所見をさかのぼって検討した。その結果、卵巣癌の中でも類内膜腺癌および明細胞腺癌は、特に卵巣子宮内膜症を合併した症例が高頻度であった(Horiuchi, et al. Gynecol Oncol.2003)。以上の検討から、卵巣子宮内膜症から卵巣癌、とりわけ類内膜腺癌や明細胞腺癌が発生する過程が存在するものと考えられた。

近年の分子学的研究で、卵巣子宮内膜症から卵巣癌への悪性転化においてp16^{INK4a}、PTEN遺伝子などの異常が報告されているが、未だその詳細は不明である(Paola-Vigano et al. Human Reprod. Update 2006)。子宮内膜症はその形態学的特徴や内分泌学的特徴から、発癌過程における子宮内膜癌との類似性の存在が示唆されている。子宮内膜癌発生の初期過程にはミスマッチ修復(mismatch repair:MMR)異常が関与している。MMR異常が生じるとゲノム上に存在するmicrosatellite DNA repeatの回数が増減し、microsatellite instability(MSI)陽性となる。子宮内膜癌では、MSI陽性が約20%に認められ、これが癌化に関与していると考えられる(Koshiyama, et al, Cancer J, 1998)。加えて、子宮内膜症においてもMMRに関連するhMLH1のメチル化異常が報告されており(Martini M, et al, Int J Cancer, 2002)、子宮内膜組織から構成される子宮内膜症の癌化過程に、MMR機構の異常が関与していることが推測されている。一方、卵巣癌では一般的にMMR遺伝子の異常は稀であることから、卵巣子宮内膜症の癌化におけるMMR機構の異常が極めて重要な意味を有する可能性が高い。

一方、長期経過観察した卵巣子宮内膜症症例は、癌化する頻度が高いという報

告から(Kobayashi, et al. Eur J Ob&Gyn Reprod Biol.2008)、癌化のプロセスには内膜症組織を取り囲む微小環境が関連していることが推測される。子宮内膜症の発症や進行に伴い、腹水、血清、卵巣内膜症性嚢胞内のTNF- α 、IL-6、IL-8等の様々なサイトカインが上昇する(Paola-Vigano, et al, Human Reprod, 2006)。最近、これらの炎症性サイトカインが大腸癌の発生に関連していることが報告されたが(Floer, et al, Am J Physiol Gastrointest liver Physiol, 2008)、子宮内膜症の癌化に関与しているか否かは明らかではない。また、卵巣子宮内膜症は性周期において嚢胞内に出血を繰り返していることから、腫瘍内容液の影響、すなわち内膜症細胞をとりかこむ微小環境microenvironmentが癌化のプロセスに関連していることが推測される。

2. 研究の目的

本研究では子宮内膜症の癌化過程にMMR機構の異常が関与しているか否かを検討することを目的とする。さらにMMR機構とin vitroでの微小環境の変化(炎症性サイトカインの存在、低酸素)との関連を検討し、卵巣子宮内膜症の発癌過程に関連する分子病理学的因子を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

【免疫組織化学染色によるMMR蛋白発現の検討】患者の同意を得て採取した卵巣癌160症例、卵巣子宮内膜症356症例より卵巣子宮内膜症30例、卵巣子宮内膜症合併卵巣癌25例、明細胞腺癌14例、類内膜腺癌12例を抽出し、代表的なMMR蛋白であるhMLH1、hMSH2の発現を免疫染色にて検討し、200細胞中の陽性細胞数を陽性細胞率(positivity index ; PI)として評価する。

【マイクロサテライト不安定性(MSI)の検討】これらのうち46例のDNAをマイクロダイセクション法にて抽出し、Promega MSI Analysis Systemを使用してマイクロサテライト不安定性(MSI)の有無を検討し、臨床病理学的因子との相関を解析する。

【MSIターゲット遺伝子変異の検討】上記のマイクロダイセクション法で抽出したDNAを用い、MSIのターゲット遺伝子として知られる、TGF- β RII、PTEN、BAX、hMSH6とHNF-1 β 遺伝子におけるモノヌクレオチドリピート

変異の有無をシーケンス法を用いて明らかとし、MSI との相関性を検討する。

【MSI と PTEN 遺伝子変異】

MSI と PTEN 遺伝子変異の相関性も検討する。

【炎症性サイトカイン存在下での MMR 蛋白発現変化の検討】

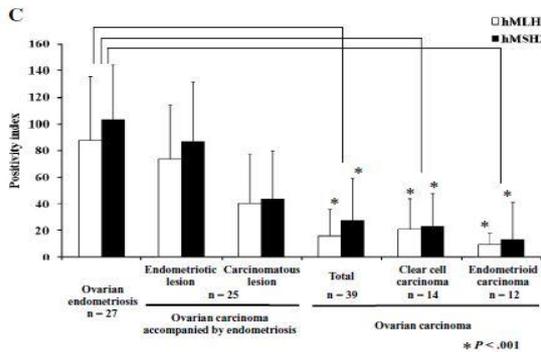
ヒト正常子宮内膜上皮細胞、不死化卵巣上皮細胞、卵巣癌細胞株を、TNF- α 、IL-6、LPS などの炎症性サイトカイン存在下で培養し、MMR 発現の変化を RT-PCR 法、Western Blot 法を用いて検討する。さらに、これらの細胞を低酸素下でも培養し、MMR 発現の変化を検討する。

4. 研究成果

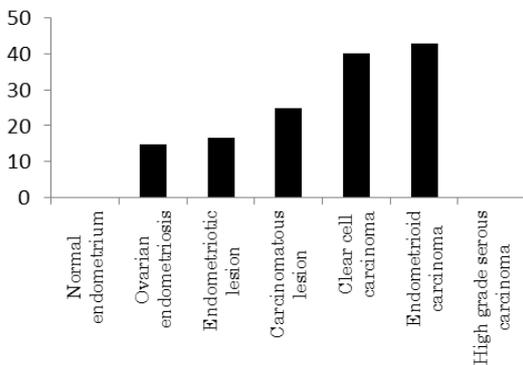
【各組織での MMR 蛋白発現】

MMR 蛋白発現は、正所性子宮内膜、卵巣子宮内膜症、子宮内膜症合併卵巣癌の内膜部分、癌部分、卵巣癌の順に減少し、癌で有意に低下していた。(P<0.05)。(図 1 参照)

【図 1】 hMLH1, hMSH2 発現



【図 2】 各組織での MSI-H 頻度



【各組織での MSI 陽性率】

MSI 陽性率は正所性子宮内膜 0%、卵巣

子宮内膜症 14.8%、卵巣子宮内膜症合併卵巣癌子宮内膜部分 16.7%、同癌部分 25.0%、卵巣明細胞癌 40%、卵巣類内膜癌 42.9%と段階的な上昇が認められたが (P<0.05)、内膜症とは関連が薄いとされる卵巣漿液性腺癌では 0%であった。(図 2 参照)

【MSI と MSI ターゲット遺伝子および PTEN 遺伝子変異】

MSI と MSI ターゲット遺伝子とされる TGF- β RII、PTEN、BAX、hMSH6 と HNF-1 β 遺伝子におけるモノヌクレオチドリピート変異には関連を見いだせなかったが、PTEN 変異は MSI-H (MSI 高頻度：5 つのマイクロサテライト領域中 2 つ以上が MSI を示す) を示す卵巣子宮内膜症合併卵巣癌の 2/3 例と高頻度に見いだされたが、MSI-S (MSI 低頻度：5 つのマイクロサテライト領域中 MSI を示すのは 1 つ以下) では、0/9 例であり、PTEN 変異は MSI-H に関連すると思われた。

【炎症と MMR 蛋白発現】

MSI と臨床病理学的背景の比較では、MSI-H 症例で白血球数と CRP 値が有意に高く (P<0.05)、MMR 蛋白発現は有意に低値であった (P<0.05)。そこで、さらに正常子宮内膜腺上皮細胞を炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)存在下で長期培養し、MMR 蛋白発現の変化を検討したところ、MMR 蛋白発現の抑制が観察された。

これらのことから、子宮内膜症には MMR 機構の異常が存在し、炎症によって誘導される MMR 機構の異常が子宮内膜症から卵巣癌への発癌過程に関与する可能性が示唆された。

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 3 件)

① Fuseya C, Horiuchi A, Hayashi A, Suzuki A, Miyamoto T, Hayashi T, Shiozawa T. Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair abnormalities and microsatellite instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis. Hum Pathol. 2012 May 22. [Epub ahead of print] (査読あり)

② Horiuchi A, Hayashi T, Kikuchi N, Hayashi A, Fuseya C, Shiozawa T,

Konishi I. Hypoxia upregulates ovarian cancer invasiveness via the binding of HIF-1 α to a hypoxia-induced, methylation-free hypoxia response element of S100A4 gene. Int J Cancer. 2012 Jan 27. doi: 10.1002/ijc.27448. [Epub ahead of print] (査読有り)

- ③ Hayashi A, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi T, Fuseya C, Suzuki A, Konishi I, Shiozawa T. Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. Int J Cancer. 2010;127(6):1332-46. (査読有り)
[学会発表] (計 8 件)
- ① 布施谷千穂、堀内晶子、他：慢性炎症は卵巣子宮内膜症における mismatch repair(MMR)異常に関与する 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 ポスター 2011 年 8 月 30 日 大阪
- ② 高津亜希子、布施谷千穂、他：LEGH(lobular endocervical glandular hyperplasia)は悪性腺腫の前駆病変か？ 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 ポスター 2011 年 8 月 30 日 大阪
- ③ 林晶子、堀内晶子、布施谷千穂、他：卵巣癌細胞における Histone deacetylase(HDAC)阻害剤と抗癌剤の併用効果 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会 ポスター 2011 年 8 月 30 日 大阪
- ④ Fuseya C, Horiuchi A, 他：Involvement of mismatch repair(MMR) abnormality in the malignant transformation of ovarian endometriosis. International Gynecologic Cancer Society(IGCS2010) 2010 年 10 月 23 日～10 月 26 日 ポスター Praha
- ⑤ 布施谷千穂、堀内晶子、他：卵巣子宮内膜症の癌化における mismatch repair(MMR)異常の関与 第 69 回日本癌学会学術総会 ポスター 2010 年 9 月 22 日～9 月 24 日 大阪
- ⑥ 布施谷千穂、堀内晶子、他：卵巣子宮内膜症の癌化におけるミスマッチ修復機構異常の関与 第 9 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 口演 2010 年 9 月 10 日 大津
- ⑦ 布施谷千穂、堀内晶子、他：慢性炎症は卵巣子宮内膜症における mismatch repair(MMR)異常に関与する 生殖医学フォーラム 口演 2010 年 6 月 4 日～5 日 佐賀
- ⑧ 布施谷千穂、堀内晶子、他：卵巣子宮内膜症における mismatch repair(MMR)異常の関与 第 62 回日本産科婦人科学会学術

講演会 ポスター 2010 年 4 月 23 日～25 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布施谷 千穂 (FUSEYA CHIHO)
信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)
研究者番号：50447736

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：