

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 25 年 2 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890036

研究課題名（和文）前駆病変に着目した卵巣明細胞腺癌研究

研究課題名（英文）Investigation of the development of ovarian clear cell adenocarcinoma with emphasis on its precursor

研究代表者

前田 大地 (MAEDA DAICHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30585500

研究成果の概要（和文）：近年の網羅的遺伝子解析によって明細胞腺癌の約半数に *ARID1A* 遺伝子の変異が認められることが明らかになった。*ARID1A* は卵巣明細胞腺癌の発生に関わる主要な遺伝子と考えられ、その変異は前駆病変の段階から存在すると想定される。本研究で我々は、*ARID1A* 遺伝子の変異が *ARID1A* 蛋白の発現消失につながることを突き止め、免疫組織化学的手法で明細胞腺癌の中から *ARID1A* 変異群を選び出すことに成功した。さらに、明細胞腺癌を *ARID1A* 変異群と非変異群に分けて臨床病理学的な比較検討を行い、両群の組織像に有意な違いがないこと、変異群において腹膜播種の頻度が高いものの overall survival に差がないことを示した。これらの結果は、*ARID1A* が明細胞腺癌の progression や behavior よりもむしろ tumor initiation に関与していることを示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：Recent genome-wide analysis has demonstrated that somatic mutations in *ARID1A* are the most common molecular genetic changes in ovarian clear cell adenocarcinoma (CCA). *ARID1A* mutations which occurred in approximately half of CCA cases. In this study, we first correlated *ARID1A* mutation status and *ARID1A* immunoreactivity then applied immunohistochemistry to determine if there is any clinicopathological features associated with the loss of *ARID1A* expression in a total of 149 CCA cases. We demonstrated that loss of *ARID1A* expression was associated with *ARID1A* inactivating mutations in CCA ($p=0.0073$). *ARID1A* immunoreactivity was undetectable or very weak in 88 (59%) of 149 CCAs. There was no statistically significant difference of *ARID1A* negative and positive cases in terms of histopathological features (structural patterns and nuclear atypia), age, clinical stage, overall survival, and frequency of lymph node metastasis. However, we observed that loss of *ARID1A* expression correlated with lower chance of peritoneal dissemination ($p<0.05$). In conclusion, this study provides the first analysis of *ARID1A* mutations and clinicopathological features and we demonstrate that mutations in *ARID1A* resulted in loss of *ARID1A* protein expression in ovarian carcinomas and there was no significant difference of *ARID1A* positive and negative cases in all the clinical parameters examined except for frequency of peritoneal dissemination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：卵巣、明細胞腺癌、ARID1A

1. 研究開始当初の背景

卵巣腫瘍は、正常卵巣の初期発生との対比の研究をもとに表層上皮性・間質性腫瘍、性索間質性腫瘍、胚細胞腫瘍、卵巣網やその他の腫瘍、に分類されている。卵巣癌は卵巣表層上皮性・間質性腫瘍の中で悪性の臨床経過を示す腫瘍群であり、病理医にはその正確な組織診断が常に求められる。

卵巣癌を含む卵巣表層上皮性・間質性腫瘍の発生機序に関しては、その発生母地も含めて、未解明な部分が多い。「表層上皮性・間質性腫瘍」という分類名に見られるように、これらの腫瘍の上皮成分が卵巣表層上皮由来であるとする説が古くから唱えられており、広く受け入れられてきた。その根拠としては、第一に、正常卵巣に存在する唯一の上皮成分が卵巣表層上皮、あるいは表層上皮が陥入して生じる表層上皮封入嚢胞であることが挙げられる。また、組織学的に卵巣の表層上皮性・間質性腫瘍の上皮成分と Muller 管由来の組織（卵管、子宮内膜腺、子宮頸管腺等）との間には多くの類似点が見出される。Muller 管と卵巣表層上皮が発生過程において共通の中腎堤体腔上皮から生じることから、卵巣表層上皮には Muller 管化生 (Mullerian metaplasia) を起こしたり、Muller 管系の組織像を示す卵巣腫瘍の母地になるポテンシャルがあると考えられてきた。ただし、卵巣腫瘍はその解剖学的特性上、非常に腫大した状態で発見されることが多く、切除された時点で腫瘍が卵巣の大半を置換している。そして、卵巣の表層上皮性・間質性腫瘍と既存の表層上皮との連続性を組織学的に証明することは極めて困難である。従って、これらの腫瘍の全てを表層上皮由来とするには少なからず無理があり、他の可能性が常に探索されてきた。

組織学的に卵巣表層上皮性・間質性腫瘍は漿液性 (serous) 腫瘍、粘液性 (mucinous) 腫瘍、類内膜 (endometrioid) 腫瘍、明細胞 (clear cell) 腫瘍の4種類に大別されており、それぞれにつき、良性腫瘍 (cystadenoma)、境界悪性腫瘍 (borderline tumor)、癌 (carcinoma) といったカテゴリーが定められている。上記の4組織型のうち、「良性腫瘍 → 境界悪性腫瘍 → 癌」という stepwise な発癌過程を経ると考えられているのは漿液性腺癌の約 10% を占める low-grade serous adenocarcinoma と粘液性腺癌こととまる。これらの癌では、しばしば同一腫瘍内に前駆病変とみなしうる良性腫瘍あるいは境界悪性腫瘍の成分が混在している。一方、高異型度の漿液性腺癌 (high-grade serous adenocarcinoma)、類内膜腺癌、明細胞腺癌では良性、境界悪性腫瘍の併存を認めることは稀であり、これらの腫瘍は *de novo* 発癌によって

生じると考えられている。前述の通り、従来これらの腫瘍の起原は卵巣表層上皮に求められてきた。しかし、類内膜腺癌と明細胞腺癌の背景卵巣には高頻度に内膜症性病変を認めることが繰り返し報告されており、現在では類内膜腺癌と明細胞腺癌の少なくとも一部、場合によっては大部分が内膜症性の上皮由来である (すなわち卵巣表層上皮由来ではない) と考えられている。また驚くべきことに、high grade serous adenocarcinoma に関しては、その大部分の起原が卵管採上皮や遠位卵管上皮にあることがここ数年で明らかになってきた。すなわち、従来卵巣の high grade serous adenocarcinoma と考えられていた腫瘍は本質的には「卵管癌の骨盤腔への広がり的一部分」であったのである。

このように同じ卵巣表層上皮性・間質性腫瘍でも、組織型ごとに発生の経路、前駆病変の種類等が大きく異なる。近年の遺伝子レベルの検討においても、*TP53*, *KRAS/BRAF*, *PIK3CA* の変異がそれぞれ high-grade serous adenocarcinoma, low-grade serous adenocarcinoma, clear cell adenocarcinoma に特異的に認められることが分かってきた。卵巣癌を研究するにあたっては組織型ごとのアプローチがかつてなく重要となってきている。すなわち、漿液性腺癌 (low-grade と high-grade)、粘液性腺癌、類内膜腺癌、明細胞腺癌をそれぞれ別々の生物として捉えていく視点が必要である。また、現在に至るまで卵巣癌の分類が純形態学的に行われてきた事実を鑑みれば、組織形態と分子生物学的特徴とをつなぐ知見が鍵を握ってくると思われる。

卵巣明細胞腺癌 (clear cell adenocarcinoma; CCA) は特徴的な組織像を示す卵巣癌の subtype で、欧米に比べて日本における発症頻度が高いことが知られている。明細胞腺癌は卵巣癌の中でもひと際化学療法抵抗性であり、その pathophysiology を解明することは日本の婦人科医、病理医にとって重要な課題であり続けてきた。そのような状況下、2010 年に Science 誌と New England Journal of Medicine 誌に「卵巣癌の中では明細胞腺癌と一部の類内膜腺癌に特異的に ARID1A の変異が検出される」という内容の論文が掲載された。いずれも網羅的遺伝子解析を用いた研究成果で、明細胞腺癌における ARID1A 変異の頻度は 50% 程度と非常に高く、新たな腫瘍関連遺伝子として大きな注目を集めた。

ARID1A は BAF250a という蛋白 (SWI-SNF chromatin remodeling complex の一員) を encode しているが、発癌における役割は今の

ところ未解明と言っよい。

2. 研究の目的

- (1) 明細胞腺癌における ARID1A 遺伝子変異と ARID1A 蛋白の発現の相関を見ること
- (2) ARID1A 蛋白の発現異常と臨床病理学的因子との関連を検討し、明細胞腺癌における ARID1A の役割を明らかにすること

3. 研究の方法

(1) Tissue microarray の作成

明細胞腺癌 149 例を対象とした。まず、ホルマリン固定パラフィン包埋された卵巣明細胞腺癌検体を用いて tissue microarray (TMA) を作成した。各症例につき、最低 2 個の core を打ち抜いた。

(2) 免疫組織化学

卵巣明細胞腺癌の TMA から 4 μm の切片を作成し、ARID1A 抗体 (1:25) を用いて免疫染色を行った。脱パラフィン後にクエン酸 buffer (pH 6.0) を用いて、オートクレーブ (120°C、5 分) によって抗原賦活化を施行した。その後の過程は Ventana Benchmark® XT autostainer (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ) の標準的なプロトコールに従った。ARID1A の発現は核の染色性をもって評価した。

(3) ARID1A 遺伝子変異

上記 149 例のうち 12 例は共同研究者の既報論文において ARID1A 遺伝子の変異が検索されており、今回はその結果をふまえ、蛋白発現との相関を見た。

(4) 臨床病理学的検討

形態学的観点からは、腫瘍細胞の核異型の強さ (nuclear atypia)、腫瘍の構築 (structural pattern) と ARID1A 発現との相関を見た。また、年齢、腫瘍進行期、腹膜播種有無、リンパ節転移の有無、生存期間といった臨床的事項に関して ARID1A 発現との相関を見た。

4. 研究成果

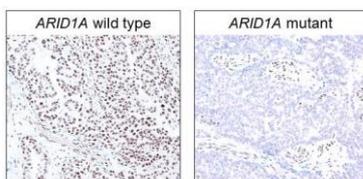
(1) 卵巣明細胞腺癌の ARID1A 発現

卵巣明細胞腺癌 149 例中 88 例 (59%) に ARID1A 蛋白の発現消失を認めた。

(2) ARID1A 遺伝子変異と蛋白発現の関係

ARID1A 変異群では 9 例全例において ARID1A 蛋白の発現消失が認められた。ARID1A 非変異群では、3 例中 1 例のみに ARID1A 蛋白の発現消失が見られた。 (p=0.0073) (図 1)

図 1 明細胞腺癌の ARID1A 発現



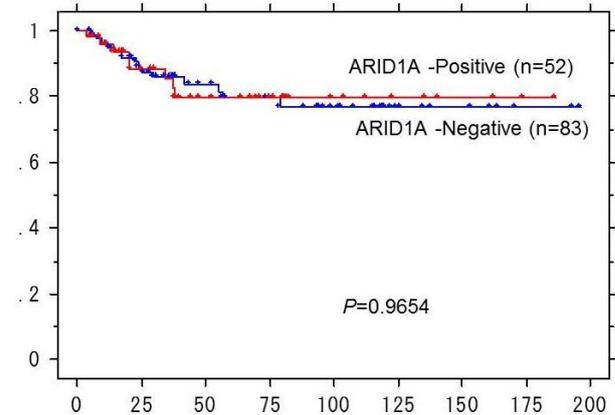
(3) 臨床病理学的検討

ARID1A 蛋白発現の消失と組織形態との相関は見られなかった。ARID1A 発現消失群では腹膜播種の頻度が高い傾向がみられた。(表 1) ただし、生存解析を行ったところ ARID1A 陽性群と陰性群の間に有意な差は認められなかった。(図 2)

表 1 ARID1A 発現と臨床病理学的因子の相関

Clinical characteristics	ARID1A expression		P
	Positive	Negative	
Age (n=89)			
≥ 50	18 (31%)	40 (69%)	0.30
< 50	13 (42%)	18 (58%)	
Stage (n = 121)			
I, II	38 (42%)	52 (58%)	0.98
III, IV	13 (42%)	18 (58%)	
Peritoneal dissemination (n = 79)			
Negative	19 (29%)	47(71%)	0.023*
Positive	8 (61%)	5 (39%)	
Lymph node metastasis (n = 70)			
Negative	10 (36%)	38 (64%)	0.86
Positive	5 (23%)	17 (77%)	
Nuclear grade (n = 70)			
Negative	10 (36%)	38 (64%)	0.86
Positive	5 (23%)	17 (77%)	

図 2 ARID1A 発現と予後との相関



本研究により、ARID1A の免疫染色が変異の有無を知るうえで有用であることが明らかになった。また、ARID1A が明細胞腺癌の progression や behavior よりもむしろ tumor initiation に関与していることが示唆された。

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 4 件)

1. β -catenin (CTNNB1) S33C mutation in ovarian microcystic stromal tumors.

Maeda D, Shibahara J, Sakuma T, Isobe M, Teshima S, Mori M, Oda K, Nakagawa S, Taketani Y, Ishikawa S, Fukayama M.

Am J Surg Pathol. 2011 Oct;35(10):1429-40.

2. Clinicopathological significance of loss of ARID1A immunoreactivity in ovarian clear cell carcinoma

Maeda D, Mao TL, Fukayama M, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y and Shih IM.

Int J Mol Sci. 2010, Dec; 11, 5120-8.

3. Rsf-1 (HBXAP) expression is associated with advanced stage and lymph node metastasis in ovarian clear cell carcinoma.

Maeda D, Chen X, Guan B, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M, Wang TL, Shih IM.

Int J Gynecol Pathol. 2011 Jan;30(1):30-5.

4. Mucosal carcinoma of the fallopian tube coexists with ovarian cancer of serous subtype only: a study of Japanese cases.

Maeda D, Ota S, Takazawa Y, Ohashi K, Mori M, Imamura T, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M.

Virchows Arch. 2010 Nov;457(5):597-608.

[学会発表] (計 6 件)

1. 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 30 日 [口演]

卵巣腫瘍の新疾患概念「Microcystic Stromal Tumor」の概説

前田大地, 柴原純二、佐久間貴彦、深山正久

2. United States and Canadian Academy of Pathology, 2012 Annual Meeting
March 17-March 23, 2012, Vancouver, Canada.

[Poster Presentation]

Microcystic stromal tumor is a distinct ovarian neoplasm characterized by β -catenin alteration

Maeda D, Shibahara J, Sakuma T, Sueyoshi K, Sakata A, Noguchi M and Fukayama M.

3. 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 29 日 [口演]

ワークショップ 10 (WS-10) 「卵巣腫瘍の基礎と臨床：明細胞腺癌の病理像、病態解析そして治療の最前線」

卵巣明細胞腺癌における Glypican-3 発現

前田大地, 高澤豊、太田聡、深山正久

4. The 15th Japan-Korea Cancer Research Workshop
Tumor microenvironment and progress in breast cancer research
December 22, 2010, Incheon, Korea

[Platform Presentation]

A subset of tumors formerly regarded as “ovarian cancer” is of tubal epithelial origin: A pathological analysis of Japanese ovarian cancer cases by means of extensive sectioning

Daichi Maeda, Shumpei Ishikawa and Masashi Fukayama.

5. United States and Canadian Academy of Pathology, 2011 Annual Meeting
February 26-March 4, 2011, Washington D. C.

[Platform Presentation]

Clinicopathological significance of ARID1A immunoreactivity in ovarian clear cell carcinoma

6. Daichi Maeda, Tsui-Lien Mao, Masashi Fukayama, Tian-Li Wang and Ie-Ming Shih.

[Poster Presentation]

Immunohistochemical differentiation of

ovarian clear cell adenocarcinomas and
yolk sac tumors using CK7, EMA, CA125,
SALL4, and AFP antibodies

Daichi Maeda, Satoshi Ota, Yutaka Takazawa
and Masashi Fukayama.

〔図書〕（計 1 件）

漿液性腺癌

前田大地

病理と臨床 第 29 卷 (2011) 8 号,
pp830-834.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 大地 (MAEDA DAICHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30585500

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：