

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590394

研究課題名(和文) 子宮内膜症による鉄過剰に起因する卵巣癌発症の分子メカニズムの解明とその予後予測

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms and prognostic perspectives for ovarian cancer induced by iron overload due to endometriosis

研究代表者

山下 依子 (Yamashita, Yoriko)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90303643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣の内膜症性嚢胞内への繰り返す出血に伴う鉄の過剰沈着によって起こる酸化ストレスによって類内膜腺癌と明細胞腺癌が発症することが近年報告された。本研究期間において、我々が卵巣明細胞腺癌の遺伝子変化についてアレイCGH法を用いて解析すると、Met遺伝子の増幅が高頻度におこっており、予後不良因子であることを報告した。また、子宮内膜症患者との関連が報告されたANRIL遺伝子と共同して作用するCBX7の発現が卵巣明細胞腺癌の予後不良因子であることについても報告した。さらに、内膜症の間質細胞の役割についても検討し、報告した。

研究成果の概要(英文)：Previous reports indicated that ovarian endometrioid and clear cell adenocarcinoma develop in association with oxidative stress due to excess of iron deposit. In this term, we performed array CGH analysis to find Met gene amplification in a certain proportion of ovarian clear cell adenocarcinoma samples correlated with worse prognosis (Yamashita et al. PLoS One 2013). Expression of CBX7, which is known to collaborate with the ANRIL gene reported to be associated with endometriosis, also had relationship with worse prognosis of the patients (Shinjo K, Yamashita Y et al. Int J Cancer 2014). We also analyzed the role of ectopic stromal cells in endometriotic cysts (Kobayashi H, Yamashita Y et al Fertil Steril 2012).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：卵巣明細胞腺癌 子宮内膜症 Met 酸化ストレス CBX7

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣明細胞腺癌は化学療法に抵抗性であるため同病期の卵巣腺癌のなかで予後が悪いが、発癌や化学療法抵抗性の獲得の原因となる分子メカニズムについては未だ明らかでない。本邦では卵巣癌のなかで明細胞腺癌の割合が他の国々と比較して高く、このような地域差も一因となって明細胞腺癌の遺伝子解析はもっとも遅れているとされている。最近 PI3 キナーゼの活性化変異が明細胞腺癌の30%で見られるとの報告がなされたが、遺伝子増幅や欠損についての報告はほとんどなく、遺伝子異常の詳細は未だ不明である。一方、卵巣明細胞腺癌は高頻度に子宮内膜症を合併しており、内膜症組織からの異所性の出血に伴う鉄の過剰沈着が発癌の原因となっていると考えられる。

### 2. 研究の目的

Fe-NTA 誘発ラット腎癌では PI3 キナーゼ / AKT の経路の上流の受容体型チロシンキナーゼである Met の遺伝子増幅と CDK インヒビターである p16INK4a の欠損が特徴である。卵巣明細胞腺癌の臨床検体を用いたパイロットスタディーでも同様の結果が得られていることから、特に Met 経路の活性化が鉄過剰における酸化ストレス発癌の最大の特徴であると考えている。Met の過剰発現は卵巣癌全体の予後不良因子であるが、明細胞腺癌についての報告は現時点ではなされていない。我々の研究によって Met 経路の活性化が卵巣明細胞腺癌の発癌の key pathway となることが示されれば、今後 Met のシグナル伝達系をターゲットとした治療法へと応用が進むと期待される。

### 3. 研究の方法

最初に卵巣明細胞腺癌のアレイ CGH 解析を行って明細胞腺癌に特異的な遺伝子異常を明らかにする。同時に子宮内膜症上皮及び間質細胞を培養して不死化細胞株を樹立する。この細胞に酸化ストレスを与えた培養条件下で発現アレイ解析及び LC/MS・MS 解析を行い、どのような分子が発現するかを調べる。最後に卵巣明細胞腺癌の細胞株を用いて次世代シーケンサーによる RNA のシーケンシングを行い、non-coding RNA の発現についても解析する。最終的には内膜症から発癌に至る経路を分子の相互関係を含めて明らかにしたい。

### 4. 研究成果

卵巣明細胞腺癌の遺伝子変化についてアレイ CGH 法を用いて解析すると、Met 遺伝子の増幅が高頻度に起こっており、予後不良因子であることを報告した(Yamashita ら PLoS One 2013)。また、子宮内膜症患者との関連が報告された ANRIL 遺伝子と共同して作用する CBX7 の発現が卵巣明細胞腺癌の予後不良因子であることについても報告した(Shinjo

K, Yamashita Y ら Int J Cancer 2014。さらに、内膜症の間質細胞の役割についても検討し、報告した(Kobayashi H, Yamashita Y ら Fertil Steril 2012)。

### 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)(すべて査読あり、計 19 件)

Yamashita Y, Nagasaka T, Naiki-Ito A, Sato S, Suzuki S, Toyokuni S, Ito M, Takahashi S. Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. Mod Pathol. 2014 年 doi: 10.1038/modpathol.2014.61.

[Epub ahead of print]

Jiang L, Yamashita Y, Chew SH, Akatsuka S, Ukai S, Wang S, Nagai H, Okazaki Y, Takahashi T, Toyokuni S. Connective tissue growth factor and beta-catenin constitute an autocrine loop for activation in rat sarcomatoid mesothelioma. J Pathol. 2014 年 doi: 10.1002/path.4377. [Epub ahead of print]

Sato S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Komiya M, Ne L, Kato H, Sagawa H, Yamashita Y, Shirai T, Takahashi S.

Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. J Toxicol Pathol. 2014 年 doi:

10.1293/tox.2013-0052. [Epub ahead of print]

Tsujiuchi T, Natsume A, Motomura K, Kondo G, Ranjit M, Hachisu R, Sugimura I, Tomita S, Takehara I, Woolley M, Barua NU, Gill SS, Bienemann AS, Yamashita Y, Toyokuni S, Wakabayashi T. Preclinical evaluation of an O(6)-methylguanine-DNA

methyltransferase-siRNA/liposome complex administered by convection-enhanced delivery to rat and porcine brains. *Am J Transl Res.* 6 卷 2 号 ( 頁 : 169-78 ), 2014 年 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3902228/>

Fujii K, [Yamashita Y](#), Yamamoto T, Takahashi K, Hashimoto K, Miyata T, Kawai K, Kikkawa F, [Toyokuni S](#), Nagasaka T. Ovarian mucinous tumors arising from mature cystic teratomas-a molecular genetic approach for understanding the cellular origin. *Hum Pathol.* 45 卷 4 号 ( 頁 : 717-24 ), 2014 年 doi: 10.1016/j.humpath.2013.10.031.

Shinjo K, [Yamashita Y](#), Yamamoto E, Akatsuka S, Uno N, Kamiya A, Niimi K, Sakaguchi Y, Nagasaka T, Takahashi T, Shibata K, Kajiyama H, Kikkawa F, [Toyokuni S](#). Expression of chromobox homolog 7 (CBX7) is associated with poor prognosis in ovarian clear cell adenocarcinoma via TRAIL-induced apoptotic pathway regulation. *Int J Cancer.* 135 卷 2 号 ( 頁 : 308-18 ), 2014 年. doi: 10.1002/ijc.28692.

Chew SH, Okazaki Y, Nagai H, Misawa N, Akatsuka S, Yamashita K, Jiang L, [Yamashita Y](#), Noguchi M, Hosoda K, Sekido Y, Takahashi T, [Toyokuni S](#). Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. *Carcinogenesis.* 35 卷 1 号 ( 頁 : 164-72 ), 2014 年 doi: 10.1093/carcin/bgt267.

[Yamashita Y](#), Ito Y, Isomura H, Takemura N, Okamoto A, Motomura K, Tsujiuchi T, Natsume A, Wakabayashi T, [Toyokuni S](#), Tsurumi T. Lack of presence of the human cytomegalovirus in human glioblastoma. *Mod Pathol.* 2013 年 doi:

10.1038/modpathol.2013.219. [Epub ahead of print]. ( 本論文の内容が中日新聞他に掲載されました )

Suzuki S, Shiraga K, Sato S, Punfa W, Naiki-Ito A, [Yamashita Y](#), Shirai T, Takahashi S. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Cancer Sci.* 104 卷 12 号 ( 頁 : 1711-7 ), 2013 年 doi: 10.1111/cas.12292.

Tokuda N, Numata S, Li X, Nomura T, Takizawa M, Kondo Y, [Yamashita Y](#), Hashimoto N, Kiyono T, Urano T, Furukawa K, Furukawa K. 4GalT6 is involved in the synthesis of lactosylceramide with less intensity than 4GalT5. *Glycobiology.* 23 卷 10 号 ( 頁 : 1175-83 ), 2013 年 doi: 10.1093/glycob/cwt054.

[Yamashita Y](#), Akatsuka S, Shinjo K, [Yatabe Y](#), Kobayashi H, Seko H, Kajiyama H, Kikkawa F, Takahashi T, [Toyokuni S](#). Met is the most frequently amplified gene in endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma and correlates with worsened prognosis. *PLoS One.* 8 卷 3 号 ( 頁 : e57724 ), 2013 年 doi:

10.1371/journal.pone.0057724. Akatsuka S, [Yamashita Y](#), Ohara H, Liu YT, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H,

Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagama H, Toyokuni S. Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. *PLoS One*. 7 卷 8 号 ( 頁:e43403 ), 2012 年 doi: 10.1371/journal.pone.0043403.

Jiang L, Akatsuka S, Nagai H, Chew SH, Ohara H, Okazaki Y, Yamashita Y, Yoshikawa Y, Yasui H, Ikuta K, Sasaki K, Kohgo Y, Hirano S, Shinohara Y, Kohyama N, Takahashi T, Toyokuni S. Iron overload signature in chrysotile-induced malignant mesothelioma. *J Pathol*. 228 卷 3 号 ( 頁:366-77 ), doi: 10.1002/path.4075. 2012 年

Kobayashi H, Yamashita Y, Iwase A, Yoshikawa Y, Yasui H, Kawai Y, Uchida K, Uno N, Akatsuka S, Takahashi T, Kikkawa F, Toyokuni S. The ferroimmunomodulatory role of ectopic endometriotic stromal cells in ovarian endometriosis. *Fertil Steril*. 98 卷 2 号 ( 頁: 415-22 ), 2012 年 doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.047.

Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Yamashita Y, Akatsuka S, Ishihara T, Yamashita K, Yoshikawa Y, Yasui H, Jiang L, Ohara H, Takahashi T, Ichihara G, Kostarelos K, Miyata Y, Shinohara H and Toyokuni S. Diameter and rigidity of multi-walled carbon nanotubes are critical factors in

mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 卷 49 号 ( 頁: E1330-8 ), 2011 年 doi: 10.1073/pnas.1110013108.

Yamashita Y, Kajiura D, Tang L, Hasegawa Y, Kinoshita T, Nakamura S, Akatsuka S, Toyokuni S, and Mori N. XCR1 expression and biased VH gene usage are distinct features of diffuse large B-cell lymphoma initially manifesting in the bone marrow. *Am J Clin Pathol*. 135 卷 4 号 ( 頁:556-64 ), 2011 年 doi: 10.1309/AJCPCTDC5PY3LXBP.

Toyokuni S, Hirao A, Wada T, Nagai R, Date A, Yoshii T, Akatsuka S, Yamashita Y, Kawada A. Age- and sun exposure-dependent differences in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and N-(carboxymethyl)lysine in human epidermis. *J Clin Biochem Nutr*. 49 卷 2 号 ( 頁: 121-4 ), 2011 年 doi: 10.3164/jcfn.11-05.

Sugimoto A, Kanda T, Yamashita Y, Murata T, Saito S, Kawashima D, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T. Spatiotemporally Different DNA Repair Systems participating During Epstein-Barr Virus Genome Maturation. *J.Virol*. 85 卷 13 号 ( 頁: 6127-35 ), 2011 年 doi: 10.1128/JVI.00258-11.

Isomura H, Stinski MF, Murata T, Yamashita Y, Kanda T, Toyokuni S, Tsurumi T. The human cytomegalovirus gene products essential for late viral gene expression assemble into pre-replication complexes before viral DNA replication. J.Virol. 85 卷 13 号 (頁: 6629-44), 2011 年 doi: 10.1128/JVI.00384-11.

[学会発表](計 12 件)

山下 依子

膠芽腫はヒトサイトメガロウイルス陰性である。第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 24 日~26 日 広島

山下 依子、藤井 佳穂、高橋 智、豊國 伸哉、長坂 徹郎

卵巣粘液性腫瘍は成熟奇形腫より発生する-分子遺伝学的アプローチによる組織起源の解明-

第 103 回日本病理学会総会 2014 年 広島 4 月 24 日~26 日

Yamashita Y, Shinjo K, Akatsuka S, Toyokuni S. CBX7 expression is associated with poor prognosis in ovarian clear cell adenocarcinoma via TRAIL-induced apoptotic pathway regulation. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRRRI 2014), 2014 年 3 月 23 日~26 日 京都

山下 依子、藤井 佳穂、梶山 広明、吉川 史隆、高橋 智、豊國 伸哉、長坂 徹郎

卵巣奇形腫に合併する粘液性腫瘍の遺伝学的解析 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3 日~5 日 横浜  
山下 依子、新城 加奈子、豊國 伸

哉、長坂 徹郎

卵巣明細胞腺癌におけるポリコーム蛋白 CBX7 の役割の解析

第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6 日~8 日 札幌

Yamashita Y, Shinjo K, Yamamoto E, Akatuka S, Takahashi T, Kajiyama H, Kikkawa F, Toyokuni S. Expression of chromobox homolog 7 (Cbx7) is associated with poor prognosis in ovarian clear cell adenocarcinoma via regulating TRAIL-induced apoptotic pathway. 103th Annual meeting of the American Association for Cancer Research, 2013 年 4 月 6 日~10 日 Washington DC, USA

新城 加奈子、山下 依子、豊國 伸哉、吉川 史隆

卵巣明細胞腺癌において CBX7 の発現は予後不良因子である。

第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日~21 日 札幌

山下 依子、宇野 希望、赤塚 慎也、豊國 伸哉

卵巣明細胞性腺癌における non-coding RNA 'ANRIL' の発現の検討

第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 26 日~28 日 東京

Yamashita Y, Akatsuka S, Yatabe Y, Toyokuni S. Array CGH Analysis Reveals Amplification of Met and AKT2 in Clear Cell Carcinoma of the Ovary

101th Annual meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology, 2012 年 3 月 17 日~23 日 Vancouver, Canada

Yamashita Y, Yatabe Y, Akatsuka S, Kajiyama H, Kikkawa F, Takahashi T,

Toyokuni S. Met Amplification is a Molecular Hallmark in Endometriosis-associated Ovarian Clear Cell Carcinoma and Correlates with Worse Prognosis. 16<sup>th</sup> European Multidisciplinary Cancer Congress , 2011年9月22日 ~27日 Stockholm, Sweden

山下 依子、小林 浩晴、赤塚 慎也、永井 裕崇、吉川 史隆、高橋 隆、豊國 伸哉

異所性子宮間質細胞の卵巣明細胞腺癌発生における役割について

第70回日本癌学会学術総会 2011年10月1日~3日 名古屋

山下 依子、小林 浩晴、赤塚 慎也、宇野 希望、谷田部 恭、豊國 伸哉

子宮内膜症における発癌メカニズム解明の試み

第100回日本病理学会総会 2011年4月28日~30日 東京

〔図書〕(計 3 件)

山下 依子(訳) , 第18章 女性生殖器 ロビンス基礎病理学第9版 , 豊國伸哉 監訳 エルゼビア・ジャパン社 , 2014年, 発行予定

Yoriko Yamashita and Shinya

Toyokuni , Endometriosis associated ovarian cancer - the role of oxidative stress

- , Endometriosis - Basic

Concepts and Current

Research Trends Edited by

Koel Chaudhury and

Baidyanath Chakravarty,

InTech, (頁 : 311-24) , 2012

年, (査読あり)

山下 依子(訳) , 第19章

女性生殖器 ロビンス基礎病

理学第8版, 豊國伸哉、高橋

雅英 監訳 エルゼビア・ジャパン社 , 2011年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 依子 (YAMASHITA, Yoriko)

2012年8月まで名古屋大学・大学院医学系

研究科・講師/2012年9月より名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 90303643

(2) 研究分担者

豊國 伸哉 (TOYOKUNI, Shinya)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 90252460

(3) 連携研究者

谷田部 恭 (YATABE, Yasushi)

愛知県がんセンター中央病院・遺伝子病理診断部・部長

研究者番号 : 90280809