

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791844

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌の新規癌抑制遺伝子 ARID1A の変異と抗癌剤耐性機構との関連

研究課題名(英文) Loss of ARID1A, a tumor suppressor gene, expression is related to the mechanism of chemoresistance in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

石川 雅子 (ISHIKAWA, MASAKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50467718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞腺癌における新規癌抑制遺伝子 ARID1A の、遺伝子増幅の頻度、臨床病理学的因子との関連、予後、抗癌剤感受性について検討した。ARID1A の遺伝子変異は高頻度(57%)に認められ、ARID1A 発現消失は臨床進行期 III、IV 期、腫瘍マーカー CA125 値の高値と有意に正の相関を認めた。ARID1A 発現消失は無増悪生存率の低下と有意に相関したが、全生存率との有意な相関はみられなかった。また ARID1A の発現消失は有意に化学療法抵抗性と相関した ($P=0.04$)。以上のことから ARID1A の発現消失は卵巣癌明細胞腺癌の早期再発、抗癌剤耐性に関連し、有力なバイオマーカーとなり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recently, the ARID1A gene has been identified as a novel tumor suppressor in ovarian clear cell carcinoma (OCCC). The current study was designed to evaluate whether ARID1A was a prognostic factor for progression, survival, and chemoresistance in OCCC. Loss of ARID1A expression was identified in 9 (15.0%) of 60 OCCC samples. Loss of ARID1A correlated with shorter progression-free survival (PFS) ($P<0.01$) and tended to correlate with shorter overall survival in patients with OCCC treated with platinum-based chemotherapy. When data were stratified for the multivariate analysis, only the loss of ARID1A expression remained a significant predictor of reduced PFS ($P=0.03$). Tumors with loss of ARID1A were more likely to be chemoresistant than tumors with positive ARID1A (100.0 vs 40.0%, $P=0.04$). This study demonstrates that loss of ARID1A in OCCC is a negative prognostic factor in patients. Measurement of ARID1A expression may be a method to predict resistance in patients with OCCC.

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：癌 ゲノム 癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

本邦での卵巣癌における明細胞腺癌の発生頻度は24.8%であり、30年間で約5倍に増加している。卵巣明細胞腺癌は白金製剤を主体とする現在の化学療法に抵抗性で、極めて予後不良であるが、その分子生物学的特徴はほとんど解明されていない。今後、治療成績向上のためには、卵巣明細胞腺癌の分子生物学的特徴を解明し、その特徴にターゲットを絞った創薬が必要と考えられる。卵巣明細胞腺癌における新規癌抑制遺伝子 ARID1A に焦点を絞り、遺伝子増幅の頻度、臨床病理学的因子との関連、予後、抗癌剤感受性について検討してきた。

2. 研究の目的

卵巣明細胞腺癌特有の癌抑制遺伝子として ARID1A が報告されたが、臨床病理学的意義は不明であった。今回、卵巣明細胞腺癌における新規癌抑制遺伝子 ARID1A の発現と臨床病理学因子、予後との関連について検討し、バイオマーカーとなり得るかも視野に入れ検討した。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌と ARID1A について

60例の卵巣明細胞腺癌症例において ARID1A のタンパク質発現レベルを免疫染色法で検討し、臨床病理学的因子との関連について検討した。また予後との関連についても検討した。使用した卵巣癌組織は倫理委委員会の承認のもと、患者の同意は取得されている。全例術後に白金製剤主体の化学療法が施行されている。

(2) 子宮頸癌と ARID1A について

(1)と同様に91例の子宮頸癌症例において ARID1A のタンパク質発現レベルを免疫染色法で検討し、臨床病理学的因子、予後との関連について検討した。

(3) 子宮体癌と ARID1A について

(1)と同様に111例の子宮体癌症例において ARID1A のタンパク質発現レベルを免疫染色法で検討し、臨床病理学的因子、予後との関連について検討した。

(4) 卵巣癌と PIK3CA について

①卵巣癌症例において PIK3CA 変異と臨床病理学的因子、予後との関連について検討した。細胞株を用い、卵巣明細胞腺癌における機能解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌組織型ごとの ARID1A 発現について

明細胞腺癌では ARID1A のタンパク質発現の消失は15% (9/60) に認められた。漿液性腺癌では100% (17/17) で発現陽性であり、明細胞腺癌において有意に発現消失率は高かった ($P < 0.01$)。【表1】

	Negative (%)	Positive (%)	P-value
OCCCs	9 (15)	51 (85)	$P < 0.01$
HSOCs	0 (0)	17 (100)	

表1

(2) 卵巣明細胞腺癌における ARID1A 発現消失と臨床病理学的因子の関連について
ARID1A の発現消失は臨床進行期 III, IV 期、高 CA125 値と有意に正の相関を認めた。【表2】

Factors	Patients	ARID1A immunostaining		P-value
		Negative	Positive	
FIGO stage				
I, II	45	4	41	0.02
III, IV	15	5	10	
CA125, U/ml				
<90	30	1	29	0.01
≥90	30	8	22	
Age (years)				
<54	30	5	25	0.72
≥54	30	4	26	
Endometriosis				
Without	32	5	27	0.89
With	28	4	24	
Ki-67				
Low	30	4	26	0.72
High	30	5	25	
Chemotherapy				
CPT-11+CDDP	21	6	15	0.03
CBDCa+taxane	39	3	36	
Residual tumor				
<2 cm	48	6	42	0.28
≥2 cm	12	3	9	

表2

(3) 卵巣明細胞腺癌における ARID1A の発現消失と予後の関連について

ARID1A の発現消失は無増悪生存率の低下と有意に相関していたが、全生存率との有意な相関はみられなかった。多変量解析の結果、無増悪生存率に関しては ARID1A の発現消失は独立予後因子であった。【図1a, 1b】

【表3】

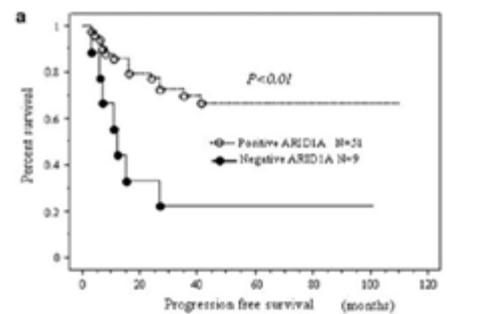


図1a: ARID1A の発現消失は無増悪生存率の低下と有意に相関した ($P < 0.01$)

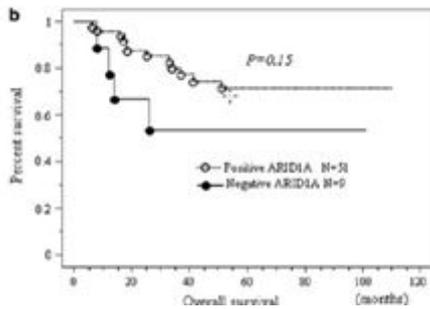


図 1b: ARID1A の発現消失と全生存率との間に有意な相関はみられなかった。

Table 3 Univariate and multivariate analysis of progression-free prognostic factors in patients with ovarian clear cell carcinoma

Factors	Patients	Univariate			Multivariate		
		Hazard ratio	95% CI	P-value	Hazard ratio	95% CI	P-value
FIGO stage							
I, II	45						
III, IV	15	9.2	3.2-26.8	<0.01	2.3	0.6-8.9	0.22
CA125 (U/mL)							
<90	30						
≥90	30	5.4	1.5-18.8	0.01	1.6	0.5-4.9	0.41
Age (years)							
<54	30						
≥54	30	2.1	0.7-6.0	0.17	NA	NA	NA
Endometriosis							
Without	32						
With	28	1.8	0.7-4.5	0.19	NA	NA	NA
Ki-67							
Low	30						
High	30	1.7	0.7-4.0	0.23	NA	NA	NA
Residual tumor							
<2 cm	48						
≥2 cm	12	6.1	2.0-18.2	<0.01	3.1	0.9-10.9	0.07
Chemotherapy							
CPT-11+CHOP	21						
CRSCh+taxane	39	0.6	0.3-1.4	0.02	NA	NA	NA
ARID1A immunostaining							
Negative	9						
Positive	51	4	1.6-9.9	<0.01	3.1	1.1-8.8	0.03

表 3: 多変量解析の結果, 無増悪生存率に関して ARID1A の発現消失は独立予後因子であった。

(4) 卵巣明細胞腺癌における ARID1A の発現消失率と化学療法抵抗性について

卵巣明細胞腺癌 60 例中 14 例に術後の評価可能病変が存在し, ARID1A の発現消失率は Responder で 0% (0/6), Non Responder は 50% (4/8) で有意に化学療法抵抗性と相関した (P=0.04) . 【表 4】

	Responder (%)	Non-responder (%)	P
Negative	0 (0)	4 (100)	0.0404
Positive	6 (60)	4 (40)	

表 4: ARID1A の発現の消失は化学療法抵抗性と有意に相関した (P=0.04)

(5) 子宮頸癌組織型ごとの ARID1A 発現について

子宮頸部腺癌/子宮頸部腺扁平上皮癌で ARID1A の消失は 31.1% (14/45) に認められ, 子宮頸部腺扁平上皮癌の 6.5% (3/46) と比較し有意に高かった (p=0.0017) .

(6) 子宮頸部腺癌/子宮頸部腺扁平上皮癌における ARID1A 発現消失と臨床病理学的因子との相関, 予後との相関について

子宮頸部腺癌/子宮頸部腺扁平上皮癌にお

ける ARID1A の消失は FIGO 進行期, 脈管侵襲, リンパ節転移, 年齢, Ki67 陽性などの臨床病理学的因子との相関を認めなかった。

また, 全生存期間, 無増悪生存期間とも相関しなかった。

(7) 子宮体癌における ARID1A 発現消失と, 臨床病理学的因子との相関, 予後との相関について

子宮体癌の 24% (27/111) に ARID1A の消失を認めたが, FIGO 進行期, グレード, 筋層浸潤, リンパ節転移, 脈管侵襲, BMI, 閉経の有無, 年齢, エストロゲンレセプター, プロゲステロンレセプター陽性などの臨床病理学的因子との相関は認めなかった。また PTEN, p53, Her2, MLH1 の発現との相関は認めなかった。全生存期間, 無増悪生存期間とも相関しなかった。

(8) 卵巣癌組織型ごとの PIK3CA 変異について

卵巣明細胞腺癌で PIK3CA 変異は 28.6% (16/56) にみられたが, 卵巣漿液性腺癌では 15 例中 1 例もみられなかった。

(9) 卵巣明細胞腺癌における PIK3CA 変異と臨床病理学的因子の関連について

卵巣明細胞腺癌において, 54 歳以下で有意に PIK3CA の変異を認めたが, それ以外の因子 (進行期, 残存腫瘍の有無, 子宮内膜症の有無など) で有意差は認めなかった。【表 5】

Factors	Patients	PIK3CA mutation		P
		Negative	Positive	
FIGO stage				
I, II	42	30	12	0
III, IV	14	10	4	
CA125 (U/mL)				
<90	28	19	9	.35
≥90	28	21	7	
Age (y)				
<54	30	18	12	.042
≥54	26	22	4	
Endometriosis				
Without	29	23	6	.176
With	27	17	10	
Ki-67				
Low	28	21	7	.35
High	28	19	9	
Residual tumor (cm)				
<2	45	32	13	.9153
≥2	11	8	3	
p-AKT expression				
Low	30	20	10	.3968
High	26	20	6	
p-mTOR expression				
Low	18	10	8	.0703
High	38	30	8	

Abbreviation: CA125, cancer antigen 125.

表 5: 54 歳以下で有意に PIK3CA の変異を認めた (P=0.042) がそれ以外の因子で有意差を認めなかった。

(10) 卵巣明細胞腺癌における PIK3CA 変異と予後の関連について

PIK3CA 変異群では、全生存期間が有意に延長した(p=0.0342)。【図 2a, 2b】

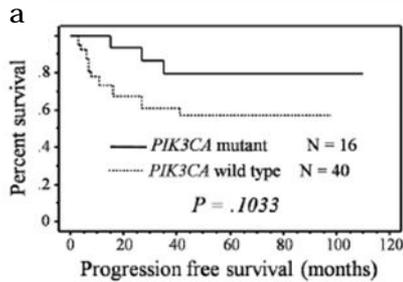


図 2a: PIK3CA 変異群で無増悪生存期間との間に有意な相関はみられなかった。

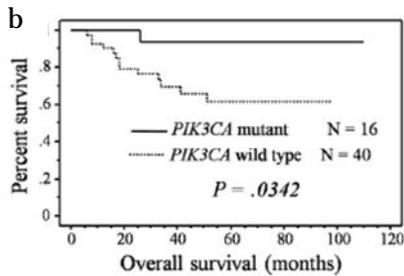


図 2b PIK3CA 変異群では全生存期間が有意に延長した(p=0.0342)。

(11) 卵巣癌細胞株を用いた検討

細胞株を用いた検討では、明細胞腺癌細胞株 9 株中 3 株、漿液性腺癌細胞株 4 株中 1 株に PIK3CA 変異を認め、PI3K の下流標的である p-AKT と p-mTOR の発現がみられた【図 3】。

PIK3CA 変異と PI3K/AKT/mTOR 系の阻害剤の感受性に相関はなく、この系路は他のシグナルによっても活性化される可能性が示された。【図 4】

以上の事から PIK3CA 変異は、卵巣明細胞腺癌において予後良好の指標となるが、PI3K/AKT/mTOR 阻害剤の有効性を判断するバイオマーカーにはなり得ない事が示唆された。

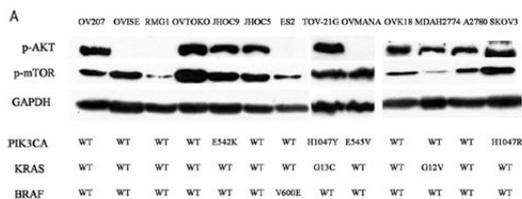


図 3: 明細胞腺癌細胞株 9 株中 3 株、漿液性腺癌細胞株 4 株中 1 株に PIK3CA 変異を認めた。

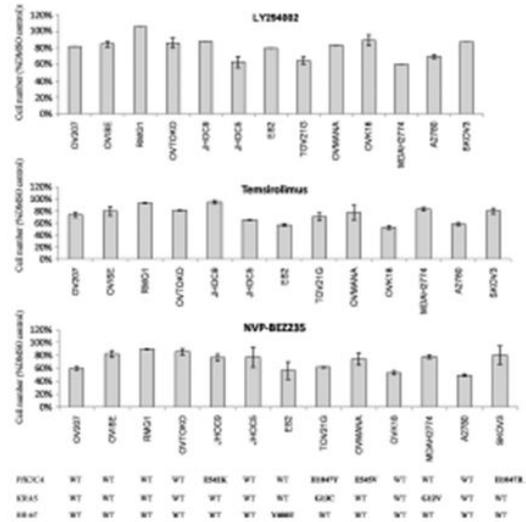


図 5: PIK3CA 変異と PI3K/AKT/mTOR 系の阻害剤の感受性に相関は認められなかった。

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 18 件)

- Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Ishikawa M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Sato E, Iida K, Nakayama N, Ishikawa N, Miyazaki K.: ESR1 gene amplification in endometrial carcinomas: A clinicopathological analysis. **Anticancer Res.**, 33: 3775-3781, 2013
- Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Sato E, Iida K, Nakayama N, Ishikawa N, Miyazaki K.: KRAS and MAPK1 gene amplification in type II ovarian carcinomas. **Int J Mol Sci.**, 14: 13748-13762, 2013
- Rahman MT, Nakayama K, Ishikawa M, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Iida K, Miyazaki K.: Fatty acid synthase is a potential therapeutic target in estrogen receptor-/progesterone receptor-positive endometrioid endometrial cancer. **Oncology**, 84: 166-173, 2013
- Rahman M, Nakayama K, Rahman MT, Nakayama N, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa

- M**, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.: PPP2R1A mutation is a rare event in ovarian carcinoma across histological subtypes. **Anticancer Res.**, 33: 113-118, 2013
- 5 Katagiri H, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Katagiri A, Ishibashi T, **Ishikawa M**, Iida K, Nakayama S, Otsuki Y, Miyazaki K.: Is ATP7B a predictive marker in patients with ovarian carcinoma treated with platinum-taxane combination chemotherapy? **Int J Gynecol Cancer**, 23: 60-64, 2013
 - 6 Rahman M, Nakayama K, Rahman MT, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, **Ishikawa M**, Iida K, Miyazaki K.: Clinicopathological analysis of loss of AT-rich interactive domain 1A expression in endometrial cancer. **Hum Pathol.**, 44: 103-109, 2013
 - 7 Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, **Ishikawa M**, Iida K, Nakayama S, Otsuki S, Miyazaki K.: Notch3 overexpression as potential therapeutic target in advanced stage chemoresistant ovarian cancer. **Am J Clin Pathol.**, 138: 535-544, 2012
 - 8 Rahman MT, Nakayama K, **Ishikawa M**, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Iida K, Yamada T, Miyazaki K.: NAC1, a BTB/POZ protein overexpressed in uterine sarcomas. **Anticancer Res.**, 32: 3841-3845, 2012
 - 9 Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, **Ishikawa M**, Iida K, Nakayama N, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.: Gene amplification of ZNF217 located at chr20q13.2 is associated with lymph node metastasis in ovarian clear cell carcinoma. **Anticancer Res.**, 32: 3091-3095, 2012
 - 10 Rahman M, Nakayama K, Rahman MT, Nakayama N, **Ishikawa M**, Katagiri A, Iida K, Nakayama S, Otsuki Y, Shih IeM, Miyazaki K.: Clinicopathologic and biological analysis of PIK3CA mutation in ovarian clear cell carcinoma. **Hum Pathol.**, 43: 2197-2206, 2012
 - 11 Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, **Ishikawa M**, Iida K, Nakayama N, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.: Fatty acid synthase expression associated with NAC1 is a potential therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas. **Br J Cancer**, 107: 300-307, 2012
 - 12 Katagiri A, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Katagiri H, **Ishikawa M**, Ishibashi T, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.: Frequent loss of tumor suppressor ARID1A protein expression in adenocarcinomas/adenosquamous carcinomas of the uterine cervix. **Int J Gynecol Cancer**, 22: 208-212, 2012
 - 13 Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Nakayama N, **Ishikawa M**, Katagiri A, Iida K, Nakayama S, Otsuki Y, Shih IeM, Miyazaki K.: Prognostic and therapeutic impact of the chromosome 20q13.2 ZNF217 locus amplification in ovarian clear cell carcinoma. **Cancer**, 118: 2846-2857, 2012
 - 14 Katagiri A, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Katagiri H, Nakayama N, **Ishikawa M**, Ishibashi T, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, Miyazaki K.: Loss of ARID1A expression is related to shorter progression-free survival and chemoresistance in ovarian clear cell carcinoma. **Mod Pathol.**, 25: 282-288, 2012
 - 15 Yeasmin S, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, **Ishikawa M**, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Otsuki Y, Kobayashi H, Nakayama S, Miyazaki K.: Biological and clinical significance of NAC1 expression in cervical carcinomas: a

comparative study between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas/adenosquamous carcinomas.

Hum Pathol., 43: 506-519, 2012

- 16 Iida K, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, **Ishikawa M**, Katagiri A, Yeasmin S, Otsuki Y, Kobayashi H, Nakayama S, Miyazaki K.: EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EGFR pathway a novel therapeutic target.

Br J Cancer, 105: 420-427, 2011

- 17 Yeasmin S, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, **Ishikawa M**, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Miyazaki K.: MKK4 acts as a potential tumor suppressor in ovarian cancer.

Tumour Biol., 32: 661-670, 2011

- 18 Yeasmin S, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, **Ishikawa M**, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Miyazaki K.: Loss of MKK4 expression in ovarian cancer: a potential role for the epithelial to mesenchymal transition.

Int J Cancer, 128: 94-104, 2011

[学会発表](計3件)

1. **石川雅子**, 中山健太郎、中山真美、片桐 浩、片桐敦子、佐藤絵美、飯田幸司、Mohammed Tanjimur Rahman、Munmun Rahman、宮崎康二
卵巣癌における NAC1 pathway に基づいた創薬への展開、(婦人科がんにおけるトランスレーショナルリサーチ、シーズの探索から臨床応用まで)
The 3rd Biennial Meeting of ASGO,
2013年12月15日、ウエスティン都ホテル京都、京都市
2. 中山健太郎、中山真美、**石川雅子**、片桐 浩、片桐敦子、佐藤絵美、飯田幸司、Mohammed Tanjimur Rahman、Munmun Rahman、宮崎康二
卵巣癌における NAC1 pathway に基づいた創薬への展開、(婦人科がんにおけるトランスレーショナルリサーチ、シ

ーズの探索から臨床応用まで)

第72回 日本癌学会学術総会、2013年10月3日、パシフィコ横浜、横浜市

3. 中山健太郎、**石川雅子**、片桐 浩、片桐敦子、石橋朋佳、佐藤絵美、Mohammed Tanjimur Rahman、Munmun Rahman、飯田幸司、中山真美、宮崎康二
新規癌関連転写因子 NAC1 を標的とした卵巣癌治療法の開発、(卵巣癌の Molecular Medicine)
第54回 日本婦人科腫瘍学会、2013年7月20日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川雅子 (Masako Ishikawa)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50467718

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

()