

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592531

研究課題名(和文)子宮体癌の術後再発予測方法の開発

研究課題名(英文)Development of prediction system of recurrence for endometrial cancer

研究代表者

片岡 史夫(Kataoka, Fumio)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40306824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体癌は、合併症を有する症例が多いため治療の縮小化が望まれている。治療の縮小には再発を正確に予測できる診断方法が必須である。現行では、術後病理診断結果に基づいて再発リスクが評価されるが、その精度は良好とは言えず、病理診断の質には施設間格差が存在することも問題点である。我々の構築した遺伝子発現解析による子宮体癌再発予測モデルは、現行の病理診断より効率的に再発リスクを予測可能であった。また、特にカスタムアレイによる再発予測モデルでは、再発低リスクに分類される症例が32%増加し、これらの症例では術後の化学療法を省略できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the relationship between the expression profile pattern and prognosis of endometrial cancer, simultaneously in both cancer cells and associated stroma. We established a formula based on the gene expression profile of cancer and stroma to predict the recurrence using a logistic regression model. We estimated the accuracy of the formula using the 0.632 method. The estimated areas under the curve (AUC) of ROC in cancer and stroma, which were used to predict recurrence, were 0.800 and 0.758, respectively. The moderate accuracies to predict recurrence were achieved by the formula based on the gene expression profile of cancer and stroma. The established formula may predict the risk of recurrence more efficiently than conventional pathological diagnosis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌 マイクロアレイ解析 再発予測

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は早期発見が可能で予後も良好であるが、合併症を有する症例が多いため治療の縮小化が望まれている。治療の縮小には再発を正確に予測できる診断方法が必須である。子宮体癌は、現在術後病理診断所見に基づいた再発リスク分類で低リスク群・中リスク群・高リスク群に分類されているが、その精度は良好とは言えずまた施設間格差も大きい (Obstet Gynecol 2007)。そのため新 FIGO 分類では腹水細胞診がリスク分類の項目より除外され、筋層浸潤および頸管浸潤の基準も変更されることになり、新しいリスク分類の確立は急務である (Int J Gynaecol Obstet 2009)。

(1) 発現解析によるリスク診断

Ferguson らは、アレイ解析により子宮体癌の再発を予測できるモデルの構築を試みたが、診断精度には問題があり実用化にはいたっていない (Clin Cancer Res 2005)。我々はこれまで卵巣癌や子宮体癌の再発を予測できる遺伝子を報告してきた (Clin Cancer Res 2005, Human Pathol 2007, 2011, Br J Cancer 2008, Int J Gynecol Cancer 2010, Gynecol Oncol 2010)。特に卵巣癌では間質の癌線維芽細胞および癌細胞で EGR1 が産生され、その発現量が卵巣癌の予後と関連することを報告した (Genes, Chromosomes and Cancer 2012)。また、子宮体癌では実質と間質の発現解析を実施し、実質および間質の共通に発現し再発に関与している遺伝子が多数存在し、重要であることを見出した。そして選別した遺伝子よりカスタムアレイを作成して、重要遺伝子をしばりこみ、再発予測モデルを構築した。構築したモデルは現行の病理診断より良好な精度であったが、モデルは少数例で作成したため症例数を追加することで精度が向上することが期待される。また実用化を考えた場合、アレイに基づいた手技では臨床検体 (凍結組織) の取り扱いが難しく、またコストも高いという問題点がある。

(2) 血中遊離 DNA 測定によるリスク診断

近年、肺癌や前立腺癌において、血清中の遊離 DNA レベルの変化が早期診断や予後予測のバイオマーカーとして有用である可能性が報告されている。我々は遊離 DNA 断片の alu 配列を血清中遊離 DNA のサロゲートマーカー

として、定量的 PCR 法で測定する方法を確立した。そして子宮体癌 25 例で術前後の血清中遊離 DNA を測定し、その変化で再発が予測できる可能性を報告した。25 例中、術後に遊離 DNA レベルが低下した 19 例では再発例を認めなかったのに対し、低下しなかった 6 例では 3 例の再発を認めた (Int J Gynecol Cancer 2012)。しかし alu 配列は癌特異的ではなく、非癌症例でも高値を示す症例があるため、癌特異的なマーカーが検出できれば更に精度の向上が期待できる。我々は子宮体癌で特異的にメチル化をきたしている部位を MeDIP-Sequence 法にて複数探索しており、メチル化を遊離 DNA のサロゲートマーカーとして用いることで精度の向上を目指すことを考えた。

2. 研究の目的

本研究では、多数例で子宮体癌の術後再発予測モデルを構築することで精度を上げ、施設間格差を検証するため多施設の検体で再現性を解析し、一般施設でも取り扱いが容易なパラフィン包埋組織を用い、コストの低い PCR 法による手技を開発する。更に当該遺伝子の機能を解析し、新規分子標的の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現解析による子宮体癌再発予測モデルの確立

多施設より子宮体癌低リスク・中リスク例の凍結組織を集積し、RNA isolation kit (Qiagen 社)にて RNA を抽出する。抽出した RNA を Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent 社)にて標識し、カスタムアレイにて発現解析を実施する。これまで施行した例と合わせて 300 例で再発予測モデルを確立し精度を検証する。

子宮体癌低リスク・中リスク例のパラフィン包埋組織を 200 例集積して、RNA isolation kit (Qiagen 社)にて RNA を抽出する。前年度で決定した遺伝子を対象として定量的 PCR 法を施行し再発予測モデルを作成する。決定した遺伝子を対象に抗体を作成し、免疫組織化学的検討により候補遺伝子の蛋白レベルでの臨床的意義を確認する。そして子宮体癌細胞株を用いて当該遺伝子の機能解析を実施する。当該遺伝子の強制発現または siRNA による発現抑制で、細胞性 (増殖能、浸潤能、

移動能、造腫瘍能)や薬剤感受性の変化を検討する。

(2) 血中遊離 DNA 測定による再発予測モデルの確立

保有している血清(子宮体癌 75 例, 健康人 92 例, 婦人科良性疾患 35 例)で, メチル化 DNA を遊離 DNA のサロゲートマーカーとして定量的 PCR で定量し, 特異性を検証する。80 例の子宮体癌術前, 術後 1, 3, 7, 14 日目の血清, 当院外来管理中の 120 例の子宮体癌術後症例の血清を集積する。

次に特異性を確認したメチル化 DNA を遊離 DNA のサロゲートマーカーとして, 集積した術前後の血清および体癌術後症例の血清で定量的 PCR を施行し定量を行う。そして, 術前後の変化および再発前後の変化を検証することで有用性を検証する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現解析による子宮体癌再発予測モデルの構築

子宮体癌において, 癌実質と間質の両者の遺伝子発現解析を実施し, 癌実質および間質に共通して発現し再発に関与している遺伝子が多数存在し, 重要であることを見出した。そして, 選別した遺伝子よりカスタムアレイを作成して, 重要遺伝子を 20 個にしぼりこみ, 68 例で再発予測モデルを構築した。構築したモデルは現行の病理診断による再発リスク分類と比較して良好な精度であった。複数の施設より集積した子宮体癌 136 症例の凍結組織検体より RNA を抽出した。抽出した RNA を Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent 社)にて標識し, カスタムアレイにて発現解析を実施し, 再発予測モデルの精度および施設間の再現性を検証した。結果は, 症例数を増加させた場合でも構築したモデルは現行の病理診断より効率的に再発リスクを予測可能であった。また, 特にカスタムアレイによる再発予測モデルでは, 再発低リスクに分類される症例が 32% 増加し, これらの症例では術後の化学療法を省略できる可能性が示唆された。

(2) 血中遊離 DNA 測定による再発予測モデルの確立

保有している血清で, メチル化 DNA を遊離 DNA のサロゲートマーカーとして定量的 PCR で

の定量を施行した。先行研究では, メチル化 DNA 量が子宮体癌の予後と相関することが予想されたが, 検討の結果差は認められなかった。原因としては, 検討症例において再発イベントが少なかったことが考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- (1) Iguchi Y, Ito YM, Kataoka E, Nomura H, Tanaka H, Chiyoda T, Hashimoto S, Nishimura S, Takano M, Yamagami W, Susumu N, Aoki D, Tsuda H. Simultaneous analysis of the gene expression profiles of cancer and stromal cells in endometrial cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2014, Sep;53(9):725-37. doi: 10.1002/gcc.22182 [査読有]
- (2) Akahane T, Hirasawa A, Tsuda H, Kataoka E, Nishimura S, Tanaka H, Tominaga E, Nomura H, Chiyoda T, Iguchi Y, Yamagami W, Susumu N, Aoki D. The origin of stroma surrounding epithelial ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Pathol*. 2013 Jan;32(1):26-30. doi: 10.1097/PGP.0b013e3182518533. [査読有]

[学会発表](計 2 件)

- (1) 井口蓉子, 津田浩史, 片岡史夫, 野村弘行, 千代田達幸, 平沢晃, 富永英一郎, 山上亘, 進伸幸, 青木大輔, 吉村泰典
子宮体癌の再発を予測できる間質遺伝子の発現に基づいた卵巢癌症例のグループ化
第64回日本産科婦人科学会学術講演会
兵庫県神戸市 神戸ポートピアホテル, 神戸国際展示場
2012年04月13日~2012年04月15日
- (2) 野村弘行, 津田浩史, 片岡史夫, 千代田達幸, 井口蓉子, 山上亘, 富永英一郎, 進伸幸, 青木大輔, 吉村泰典
子宮体癌および上皮性卵巢癌症例における血漿中遊離DNA量に関する検討
第64回日本産科婦人科学会学術講演会
兵庫県神戸市 神戸ポートピアホテル, 神戸国際展示場
2012年04月13日~2012年04月15日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称：子宮体癌再発を予測するためのバイオマーカー

発明者：津田浩史，伊藤陽一

権利者：同上

種類：特許

番号：2013-192478

取得年月日：2013年9月30日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

慶應義塾大学 医学部 産婦人科学教室
婦人科腫瘍研究室 生体分子解析部門
<http://www.obgy.med.keio.ac.jp/04research/06gy2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 史夫 (KATAOKA FUMIO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40306824

(2) 研究分担者

津田 浩史 (TSUDA HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00434880