

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462611

研究課題名(和文) 異所性子宮内膜症から卵巣明細胞癌および類内膜腺癌への悪性転化機構に関する検討

研究課題名(英文) The origin of ovarian clear cell carcinoma and endometrioid carcinoma malignant transformation from endometriosis

研究代表者

赤羽 智子 (Akahane, Tomoko)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40398699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究から卵巣癌は単一の性質をもった疾患ではなく、組織型により発癌起源細胞や発癌機序が異なることが解明されている。本研究は子宮内膜症を発癌起源細胞とする卵巣癌の発癌メカニズムの解明を目的としている。今回、明細胞癌および類内膜癌の子宮内膜症から癌へと移行する組織の遺伝子および蛋白発現解析を行ったところ、遺伝子変異解析結果が漿液性癌の特性と類似していることが判明した。結果より、子宮内膜症から発生したと推測される卵巣癌の一部は、漿液性腺癌が混在し、卵管上皮由来の漿液性癌である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：A recent study, ovarian cancer is not single character, carcinogenesis original cell and carcinogenesis mechanisms have been elucidated to be different by histopathological type. This study is to clarify the carcinogenic mechanism of ovarian cancer from endometriosis. Analyzed of gene mutation and protein expression in endometriosis co-existence clear cell carcinoma and endometrial cancer. TP53 gene mutations were similar to the characteristics of the serous cancer. These results may suggest that ovarian cancer of origin from endometriosis were mixed serous cancer of origin from fallopian tube epithelial cell.

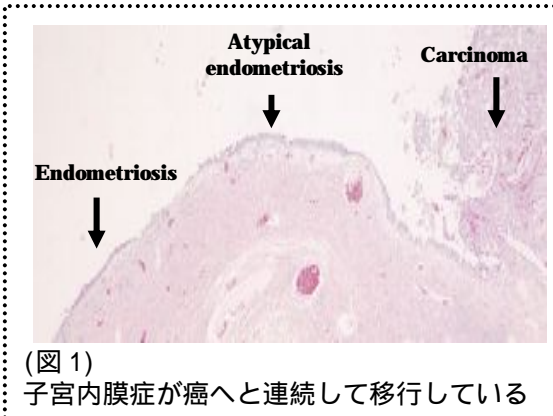
研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の中でも卵巣明細胞癌 (Ovarian Clear Cell Carcinoma) および卵巣類内膜癌 (Ovarian Endometrioid carcinoma) は、他の組織型と比較し、同一組織標本中に子宮内膜症の共存が多いことから、子宮内膜症が両腫瘍の発癌母地であることが 1925 年より推測されている (Sampson Arch Surg 1925)

(図 1)。



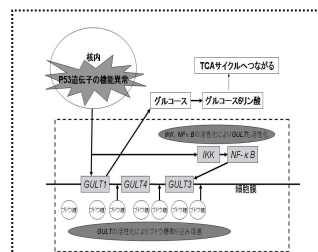
当科症例においてもその合併率は粘液性腺癌 37.5%、漿液性腺癌 8.5% に比較し、卵巣明細胞癌 63.1%、卵巣類内膜癌 47.9% と非常に高率である (2012 年 6 月現在)。しかし本来良性であるはずの子宮内膜症細胞が癌化に至るメカニズムの詳細は現在に至っても解明されていない。近年の研究より本来良性であるはずの子宮内膜症細胞にも染色体異常、特に 17q 染色体の異常が高頻度に検出されることや (Sato et al. Cancer Res 2000)、子宮内膜症が不妊要因とされる原発性不妊患者の卵巣癌罹患相対危険率は 2.48 と高率であることが報告されている (Brinton LA Fertil Steril 2004)。また、日本産婦人科学会生殖内分泌委員会報告においては子宮内膜症が卵巣癌と共存する罹患者が 30 代という比較的若年層において増加しているとされる。これより子宮内膜症は前癌病変としての可能性を否定できないにも関わらず、現代社会における少子晩婚化の影響や環境要因などより子宮内膜症罹患者は増加傾向にある。このような背景のもと、現在までの研

究において以下結果を解明してきた。

(1) 子宮内膜症から連続性に癌へ移行している明細胞癌・類内膜癌症例の病理切片より、子宮内膜症、異型子宮内症、癌の各部位を Laser Capture Microdissection 法にて単離し、TP53 遺伝子変異の検出を行った。その結果、TP53 遺伝子の変異は明細胞癌組織中に共存して見られる子宮内膜症細胞のみに検出され (30%)、類内膜癌では全く検出されなかった (Akahane T et al. Int J Gynecol Pathol, 2007)。これより明細胞癌と類内膜癌の発癌は同一細胞が発生母地と推測されているにも関わらず、子宮内膜症の発生した段階で遺伝子の性質が異なっていることが推測された。

(2) 子宮内膜症から類内膜癌/明細胞癌の移行病変をもつ標本において、エストロゲン受容体 (ER) とプロゲステロン受容体 (PR) の発現を免疫組織染色にて比較した。ER、PR は子宮内膜症細胞にはともに発現していたが、癌部へと移行する組織にて、類内膜癌では強発現する傾向にある一方、明細胞癌では発現が消失していた。本検討より、子宮内膜症から明細胞癌への発癌には、ステロイドホルモン感受性からの離脱が関与していると推察され、この差異が異なる組織型への分化を示す一要因であることを報告した (Akahane T et al. Int J Gynecol Pathol, 2005)。

近年、癌細胞は TP53 遺伝子の機能異常により、解糖系を亢進させて自らの増殖に必要なグリコーゲンを産生することが明らかとなっている (Kawauchi K Net cell Biol 2008)。明細胞癌は癌細胞の細胞質内にグリコーゲンの貯留を特徴



(図 2) 細胞内グリコーゲン代謝経路

を促進させ、この違いが異なる組織型へと分化させる要因ではないかと推測される(図 2)。類内膜癌および明細胞癌は子宮内膜症といった同一細胞が発癌起源と推測されているにも関わらず、明細胞癌は類内膜癌と比較して抗がん剤奏功性や予後が大きくことなる。子宮内膜症が性質の大きく異なる組織型へと分化するメカニズムは治療や予後等の関連から解明すべき急務の課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、子宮内膜症が発生起源と推測されている卵巣類内膜癌および卵巣明細胞癌について、培養条件下にて構築した子宮内膜症モデルと臨床検体の双方から子宮内膜症が明細胞腺癌および類内膜腺癌に至る機構の解明を行い、個別化治療法の確立へと応用することである。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞条件下における子宮内膜上皮組織の構築と3次元培養法の確立

これまで子宮内膜症からの癌化には遺伝的要因やホルモン活性の離脱を報告してきた。しかし文献的には環境要因の関与も発癌との関連を指摘されている(Mandai M et al *J Clin Oncol* 2009)。申請者はこれまでに培養細胞条件下にて生体内に近い状態を作り出し実験を行うことを目的に重層扁平上皮組織の作製を行ってきた(Kamioka N, Akahane T et al *Biophys Res Commun*, 2010)。本研究では、その方法を応用し子宮内膜組織を作製し、培養条件下で子宮内膜症からの癌化に関与すると考えられる環境要因作り出すことで、子宮内膜細胞が癌化に至るメカニズムを解明した。

子宮内膜間質組織の作製

子宮内膜細胞または卵巣嚢腫患者由来の細胞より、0.05%トリプシン 0.02%EDTA 液または0.05%コラゲナーゼ液内で上皮細胞と間質細胞を分離する。細胞培養用6穴プラスチック

クプレートとCell Culture Insert 内にて組織培養用コラーゲン Type -P と子宮内膜間質細胞を混合させ、メッシュに分注、37℃にて一晩インキュベートしてゲルを固め子宮内膜間質組織を作製する。

子宮内膜上皮細胞の重層

上記で使用したコラゲナーゼ液または EDTA 液を遠心し、子宮内膜上皮細胞成分を回収する。上清を取り除き培地に再懸濁し生細胞数をカウント後、至適細胞数をコラゲナーゼ間質細胞に重層する。

上皮細胞の分化

3日間培養後、上皮を空気露出させて細胞分化し子宮内膜組織を構築する。

遺伝子改変および環境因子の添加

作製した組織に子宮内膜症からの癌化に関与が疑われる遺伝子をリポフェクタミンまたは他の遺伝子導入法を使用して改変する。また卵巣嚢腫内容物またはそれに近い条件を作り添加することで細胞形態の変化を検出する。

(2) 臨床検体を使用した子宮内膜症からの発癌メカニズム解析

明細胞癌に付随する子宮内膜症細胞には TP53 遺伝子の異常を検出している(Akahane T et al. *Int J Gynecol Pathol*, 2007)。TP53 遺伝子は 17 番染色体上に存在する遺伝子であり、明細胞癌には 17q 染色体異常が報告されていることから(Hirasawa et al *Clin Cancer Res*. 2003)、明細胞腺癌には 17 番染色体上の遺伝子またはこれに関わる遺伝子のシグナル伝達に関与する遺伝子の異常が予測される。本研究では手術時に採取した組織より切片を作製し、子宮内膜症/異型内膜症/明細胞癌/類内膜癌の各部位を Laser Capture Microdissection にて個々の細胞を採取して以下の検討をおこなった。

特徴的なマーカーの個別発現解析

子宮内膜症から癌へと移行する各組織の細胞について mRNA の発現を real-time PCR 法で定量確認する。同様に、各組織における

蛋白発現について免疫組織染色およびウエスタンプロッキング法にて個々の所見に特徴的な発現解析を実施した。

特定マーカーと臨床データとの比較患者検体より解析された個別のマーカーと子宮内膜症の有無等、臨床データを比較し有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞条件下における子宮内膜上皮組織の構築と3次元培養法の確立

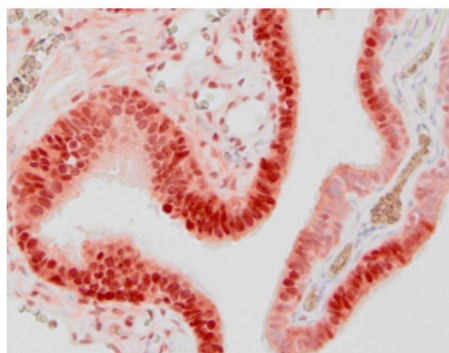
3次元培養にて重層する上皮細胞の安定的細胞株作成のため、患者検体より採取した上皮細胞について細胞株の樹立を行った。その結果、正常細胞では樹立は可能とならなかったが、症的に希少である腹膜中皮腫の細胞株が人工的操作を必要とせず、安定的に樹立可能となった。腹膜中皮腫は症例自体が希少であるため、商品化された細胞株も少数であることから、今回樹立された細胞が希少な生物資源として有用であることが考えられる。

(2) 臨床検体を使用した子宮内膜症からの発癌メカニズム解析

本研究内にて、子宮内膜症から癌へと移行する組織の遺伝子および蛋白発現解析を行った。研究実施期間中において、類内膜癌/明細胞癌の解析を実施していたが、遺伝子変異解析の結果が漿液性癌の特性と類似していることが判明した。文献的にも、低分化の類内膜癌/明細胞癌は漿液性腺癌の亜型であるといった報告がされている(Gurung A et al *Histopathology* 2013)。そこで漿液性腺癌についても同様の解析を行うこととし、組織型別に卵巣癌の発癌機序について解明した。症例は本研究内容と同様に、同一組織内に異型の無い卵管上皮細胞と癌組織が共存する症例について、各組織の遺伝子および蛋白レベルでの解析を行った。

その結果、BRCA遺伝子変異保持者にて、リスク低減両側卵管卵巣摘出術施行例(以下RRSO

例)の卵管上皮細胞には、形態学的に異型が確認できなくとも、p53蛋白の発現が認められた(図3)。さらに、RRSO例の卵巣を詳細



(図3) 卵管上皮細胞の p53 染色

に検索すると、RRSO施行例のうち、1例にはオカルト癌が検出され、これを報告した(Hirasawa A, Akahane T, et al *Jpn J Clin Oncol* 2014)。そこで、BRCA遺伝子変異保持者にて卵巣癌をすでに発症した6症例の癌組織のp53染色を施行したところ、すべての例にp53発現が陽性となった。しかし、その組織型は6例中4例が漿液性癌であり、2例は類内膜腺癌であった。この結果より、これまで子宮内膜症から発生したと推測された類内膜腺癌の一部は、漿液性腺癌と混在していることが推測された

近年の研究より、卵巣癌は卵巣本体より発生する単一の性質をもった疾患ではなく、組織型により発癌起源細胞や発癌機序が異なることが解明され、漿液性腺癌は卵管上皮の異型細胞が卵巣本体に移行して発症するとされ、類内膜および明細胞癌は卵巣に発生する子宮内膜症嚢胞病変に含まれる異所性子宮内膜症上皮細胞が起源であり、粘液性癌は消化管または子宮頸部の癌細胞が移行して発症するなど異なることが明らかとなった。卵巣癌は婦人科腫瘍の中でも比較的進行して発見される症例が多く予後や生存率が低い。その理由として卵巣は腹腔内に存在するため、体表面からの検診や細胞採取等が困難であり、検診には向かない臓器であることがあ

げられる。このような背景から卵巣癌早期発見を目指した臨床応用可能な技術の開発が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Akira Hirasawa, Kazuya Makita, Tomoko Akahane, Wataru Yamagami, Takeshi Makabe, Megumi Yokota, Yuko Horiba, Mariko Ogawa, Shigehisa Yanamoto, Rhota Deshimaru, Eiichiro Tominaga, Kouji Banno, Nobuyuki Susumu, and Daisuke Aoki. Osteoporosis is less frequent in endometrial cancer survivors with hypertriglyceridemia. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, (査読有), 45(1): 127-131, 2015. doi: 10.1093/jjco/hyu164.
2. Megumi Yokota, Akira Hirasawa, Kazuya Makita, Tomoko Akahane, Kensuke Sakai, Takeshi Makabe, Yuko Horiba, Wataru Yamagami, Mariko Ogawa, Takashi Iwata, Shigehisa Yanamoto, Ryota Deshimaru, Kouji Banno, Nobuyuki Susumu, Daisuke Aoki. Polymorphisms of estrogen metabolism-related genes *ESR1*, *UGT2B17* and *UGT1A1* are not associated with osteoporosis in surgically menopausal Japanese women. *DPrz Menopauzalny*; (査読有), 14(3): 161-167, 2015. doi:10.5114/pm.2015.54339. Epub 2015 Sep 30.
3. Akira Hirasawa, Kenta Masuda, Tomoko Akahane, Ueki A, Yokota M, Tomohiko Tsuruta, Nomura H, Fumio Kataoka, Eiichiro Tominaga, Kouji Banno, Kazuya Makita, Nobuyuki Susumu, Kouichi Sugano, Kenji Kosaki, Kaori Kameyama, Daisuke Aoki. Family history and *BRCA1/BRCA2* status among Japanese ovarian cancer patients and occult cancer in a *BRCA1* mutant case. *Jpn J Clin Oncol*; (査読有), 44(1): 49-46. 2014. doi: 10.1093/jjco/hyt171. Epub 2013 Nov 11.
4. Akira Hirasawa, Takeru Zama, Tomoko Akahane, Hiroyuki Nomura, Fumio Kataoka, Koichiro Saito, Keisuke Okubo, Eiichiro Tominaga, Kazuya Makita, Nobuyuki Susumu, Kenjiro Kosaki, Yusuke Tanigawara, Daisuke Aoki. Polymorphisms of *UGT1A1* gene predict adverse effects of irinotecan treatment for gynecologic cancer in Japanese. *J Hum Genet*; (査

読有), 58: 794-798, 2013. doi: 10.1038/jhg.2013.105. Epub 2013 Oct 3.

5. Tomoko Akahane, Akira Hirasawa, Hiroshi Tsuda, Fumio Kataoka, Nishimura S, Eiichiro Tominaga, Hiroyuki Nomura, Chiyoda, Iguchi Y, Wataru Yamagami, Nobuyuki Susumu, Daisuke Aoki. The origin of stroma surrounding epithelial ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Pathol* (査読有) 32: 26-30. 2013. doi: 10.1097/PGP.0b013e3182518533.
6. Akira Hirasawa, Makita K, Tomoko Akahane, Megumi Yokota, Wataru Yamagami, Kouji Banno, Nobuyuki Susumu, Daisuke Aoki. Hyper triglyceridemia is frequent in endometrial cancer survivors. *Jpn J Clin Oncol*; (査読有), 43(11):1087-1092, 2013. doi:10.1093/jjco/hyt125.
7. Akira Hirasawa, Kenta Masuda, Tomoko Akahane, Tomohiko Tsuruta, Kouji Banno, Kazuya Makita, Nobuyuki Susumu, Hiromitsu Jinno, Yuko Kitagawa, Kokichi Sugano, Kenjiro Kosaki, Daisuke Aoki. Establishment of a system for performing risk-reducing salpingo-oophorectomy for *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers in Japan: Our challenges for the future. *Jpn J Clin Oncol*(査読有) 43: 515-519. 2013. doi: 10.1093/jjco/hyt036. Epub 2013 Mar 13.
8. Akira Hirasawa, Takashi Sato, Mari Ueno, Tomoko Akahane, Nobuyuki Susumu, Tomoko Betsuyaku, Daisuke Aoki. Distinguishing between lymphangioleiomyomatosis and carcinomatous peritonitis in an ovarian cancer patient. *J Clin Oncol*; (査読有), 31: e427-29. 2013. doi: 10.1200/JCO.2012.45.3019. Epub 2013 Jun 10.

〔学会発表〕(計11件)

1. 赤羽智子(代表), 平沢 晃, 増田健太, 眞壁 健, 坂井健良, 吉浜智子, 山上 亘, 野村弘行, 片岡史夫, 阪埜浩司, 進 伸幸, 青木大輔. 婦人科疾患バイオバンクの現状と家族性腫瘍のスクリーニングに関する検討. 第1回日本産科婦人科遺伝子診療学会 2015.12.18-19 長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

2. 赤羽智子(代表), 平沢 晃, 増田健太, 野田朋美, 西尾 浩, 仲村 勝, 山上 亘, 森定 徹, 野村弘行, 片岡史夫, 岩田 卓, 田中京子, 富永英一郎, 鈴木 淳, 阪埜浩司, 牧田和也, 進 伸幸, 青木大輔. 慶應義塾大学医学部産婦人科におけるバイオバンク. 第 60 回日本人類遺伝学会. 2015.10.14-17
京王プラザホテル(東京都新宿区)
 3. 赤羽智子(代表), 平沢 晃, 富永英一郎, 青木大輔. 細胞診標本中に出現する微量細胞からの遺伝子解析. 第 56 回 日本臨床細胞学会総会(春期大会) 2015.6.12-14
松江テルサ・くびきメッセ (島根県 松江市)
 4. 赤羽智子(代表), 平沢 晃, 増田健太, 片岡史夫, 富永英一郎, 阪埜浩司, 進伸幸, 田中 守, 青木大輔. *BRCA1/2* 遺伝子生殖細胞変異例における良性卵管上皮細胞の p53 蛋白発現と *TP53* 遺伝子変異の意義. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2015. 4. 10-12. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 5. 赤羽智子(代表), 平沢 晃, 片岡 史夫, 増田 健太, 富永 英一郎, 阪埜 浩司, 進 伸幸, 亀山 香織, 青木 大輔. *BRCA1/2* 遺伝子変異保持者の卵管上皮細胞における p53 と MDM2 の発現の検討. 第 55 回日本組織細胞化学学会学術講演会 2014.9.27-28 松本 M ウイング (長野県松本市)
 6. Tomoko Akahane(代表), Akira Hirasawa, Fumio Kataoka, Kenta Masuda, Hiroyuki Nomura, Kouji Banno, Eiichiro Tominaga, Nobuyuki Susumu and Daisuke Aoki. P53 status and LOH of *BRCA1* in HBOC and *BRCA1/2* mutant carrier. 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sept 26-28 2014. Pacifico YOKOHAMA (神奈川県横浜市)
 7. 赤羽智子(代表), 富永英一郎, 平沢 晃, 片岡史夫, 野村弘行, 増田健太, 阪埜浩司, 進 伸幸, 吉村泰典, 青木大輔. *BRCA1/2* 遺伝子変異例における卵管上皮細胞の p53 特性に関する検討. P53 status of fallopian tubes in patients with *BRCA1* or *BRCA2* mutant. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 2014.4.18-20
東京国際フォーラム (東京都千代田区)
 8. 赤羽智子(代表), 富永 英一郎, 片岡史夫, 野村弘行, 鶴田 智彦, 植木有紗, 阪埜浩司, 進 伸幸, 菅野康吉, 小崎健次郎, 亀山香織, 青木大輔. 日本人卵巣癌における血縁腫瘍歴の頻度および *BRCA1/2* 遺伝子変異保持者卵管細胞の p53 変異に関する検討. 第 58 回日本人類遺伝学会 2013.11.21-23
江陽グランドホテル (宮城県仙台市)
 9. Tomoko Akahane(代表), Akira Hirasawa, Kenta Masuda, Tomohiko Tsuruta, Hiroyuki Nomura, Fumio Kataoka, Eiichiro Tominaga, Kouji Banno, Nobuyuki Susumu, Kaori Kameyama Daisuke Aoki. *TP53* status of fallopian tubes in *BRCA1* or *BRCA2* mutant patients. 第 72 回日本癌学会 2013.10.3-5
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 10. 赤羽智子(代表), 富永 英一郎, 平沢 晃, 片岡 史夫, 増田 健太, 植木有紗, 阪埜 浩司, 進 伸幸, 亀山 香織, 青木 大輔. *BRCA1/2* 遺伝子変異保持者における卵管上皮細胞の p53 status とその意義. 第 52 回日本臨床細胞学会秋期大会 2013.11.2-3
グランキューブ大阪 (大阪府大阪市)
 11. 赤羽智子(代表), 富永英一郎, 山上 亘, 野村弘行, 片岡史夫, 平沢 晃, 進 伸幸, 青木大輔. 抄録細胞診検体からの遺伝子診断を志向した微量細胞からの遺伝子解析の試み. 第 54 回日本臨床細胞学会総会(春期大会) 2013.6.1-2
高輪プリンスホテル (東京都港区)
- [図書] (計 0 件)
[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
[その他]
ホームページ等
<http://www.obgy.med.keio.ac.jp/04research/00index.html>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
赤羽 智子 (Tomoko Akahane)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号 : 40398699
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし