

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462616

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌の臨床的特殊性からのバイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Search for the biomarkers for the survival of patients of ovarian clear cell adenocarcinoma

研究代表者

高倉 聡 (TAKAKURA, Satoshi)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：60256401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：I期卵巣明細胞腺癌(CCC)ではIC2/IC3期がIA/IC1期に比べ有意に予後不良であること、IA/IC1期ではoptimal staging categoryが独立予後因子となることを証明した。CCCでは治療前の血小板数、ヘモグロビン、CRPが独立予後因子となることを見出した。CCC手術検体の免疫組織学的検討から、IL-6R高発現例は低発現例に比べ有意に予後不良であり、IL-6Rは独立予後因子であることを証明した。CCC細胞株でIL-6R si RNAや抗ヒトIL-6R抗体(tocilizumab)を用いたIL-6Rの抑制による抗腫瘍効果を証明した。

研究成果の概要(英文)：The multivariate analysis indicated that non-optimal staging surgery predicted worse recurrence-free survival (RFS) than the optimal staging surgery in stages IA/IC1 ovarian clear cell adenocarcinoma (CCC) patients by a retrospective review of 165 stage I CCC patients. The multivariate analysis indicated that advanced stages, hyperhemoglobinemia, thrombocytosis, higher creatinine level, and higher C-reactive protein level predicted worse PFS by a retrospective review of 98 CCC patients. A total of 84 CCC cases collected from primary surgical specimens were evaluated by the immunohistochemical analysis for IL-6R and phosphorylated Stat3, and we found that high IL-6R expression correlated with poor patient survival by the multivariate analyses, suggesting that IL-6/IL-6R signaling pathway could be implicated in the progression of CCC. Inhibition of endogenous IL-6R including tocilizumab in CCC cells did reduce cell invasion ability and restored their response to cytotoxic reagent.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 明細胞腺癌 バイオマーカー IL-6 IL-6R

1. 研究開始当初の背景

日本女性の卵巣がん罹患数は毎年約 7000 人を超え、2007 年には 4420 人が卵巣がんで死亡している。上皮性卵巣癌は主に 4 つの組織型に分類されるが、本邦では化学療法に抵抗性で予後不良な明細胞腺癌が 15~20% と欧米に比較し著しく多い。卵巣明細胞腺癌に対しては後方視的検討 (Takano M, Int J Clin Oncol, 2007) や前方視的の第 2 相試験 JGOG3014 の結果 (Takakura S et al, Int J Gynecol Cancer 2010) から、卵巣癌標準療法のパクリタキセル・カルボプラチン (TC) 療法とイリノテカン・シスプラチン併用療法 (CPT-P 療法) を比較する第 3 相試験 GCIG/JGOG3017 が行われたが、化学療法による予後改善は限定的であると思われた。一方、卵巣明細胞腺癌では卵巣癌の代表的腫瘍マーカーの CA125 は漿液性腺癌と比べ低値であることが多く、その感度・特異度はいずれも低いため、新規バイオマーカーが必要である。

卵巣明細胞腺癌は本邦に多く発生する予後不良な疾患であるが、我々は以下に示す 3 つの臨床的特徴、1) 卵巣子宮内膜症性嚢胞から発生する点、2) 炎症との関連、3) 血栓症を合併する点に注目した。

卵巣明細胞腺癌はその多くが卵巣子宮内膜症性嚢胞から発生するという臨床的特徴を有する。また、逆に卵巣子宮内膜症性嚢胞の約 1% に明細胞腺癌や類内膜腺癌などの卵巣癌が発生し、それらで最近高頻度の ARID1A 変異による BAF250a 蛋白の発現消失が報告された (Wiegand KC, N Engl J Med, 2010)。変異が起こる原因は不明であるが、卵巣子宮内膜症性嚢胞内の高濃度の鉄による酸化ストレスが各種遺伝子の変異を起こす原因であると考えられている (Yamada Y, Int J Gynecol Cancer 2011)。実際、内膜症性嚢胞内溶液では酸化ストレスの程度を示す lipid peroxidase (LPO)、細胞傷害の指標である LDH、DNA 傷害の指標である 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) 濃度が高いことが報告されている (Mandai M et al, Int J Gynecol Cancer 2007)。

卵巣癌では炎症との関連も注目されており、卵巣癌患者の血清・腹水の炎症性サイトカインである IL-6 発現量と患者予後の相関が報告され (Plante M et al, Cancer, 1994)。我々は上皮性卵巣癌 50 症例を対象とした免疫関連遺伝子の網羅的発現解析により、卵巣癌の病理組織型を特徴づける発現プロファイルを見いだしたが、卵巣明細胞腺癌では Th2 サイトカイン優位な発現パターンを呈し、特に IL-6、次いで IL-8 が高発現していた (Yanahara N et al, Int J Oncol 2012)。また、血清 CRP 濃度と卵巣癌発癌リスクの相関 (Toliola AT, Annals Oncol, 2011) も報告されている。なお、血清 IL-6・IL-8・CRP 濃度を含んだ多変量モデルは CA125 単独より卵巣癌診断において高い正診率が報告されているが、症例の多くは漿液性腺癌であり明細胞

腺癌は十分検討されていない (Edge II T et al, J Cancer Res Clin Oncol 2010)。

卵巣明細胞腺癌では凝固異常により血栓症を合併するという臨床的特徴を有し、合併例は予後不良であるとされている。卵巣明細胞腺癌では下肢深部静脈血栓症や脳梗塞が診断の契機になることもあり、再発時にはこれら血栓症も再発し、それらの際には血中 D-ダイマーも高値となっていることも多々経験する。

2. 研究の目的

本研究「卵巣明細胞腺癌の臨床的特殊性からのバイオマーカーの同定」は卵巣明細胞腺癌の 3 つの臨床的特徴に、1) 卵巣子宮内膜症性嚢胞から発生する点、2) 炎症との関連、3) 血栓症を合併する点に注目し、それらに関連する物質を卵巣明細胞腺癌の診断・治療効果判定・予後予測・再発診断のバイオマーカーになりうるかを検討することを目的とし計画した。

3. 研究の方法

(1) 卵巣明細胞腺癌における臨床病理学的予後因子同定のための後方視的解析

2000-2009 年の卵巣明細胞腺癌症例のデータベース化を行い、予後因子を log-lank 法による単変量解析・Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析により探索した。

(2) 卵巣明細胞腺癌における予後に関与する臨床検査項目の同定のための後方視的解析

2000-2012 年の卵巣明細胞腺癌 98 症例ならびに卵巣漿液性腺癌 103 症例を対象とし、一般的な臨床病理学的予後因子に加え、治療前の臨床検査値 (CA125、PT-INR、APTT、fibrinogen、D-dimer、白血球数、ヘモグロビン、血小板数、AST、ALT、LDH、Cr、TP、アルブミン、CRP) のデータベース化を行い、進行期・組織型別の各種臨床検査項目の異常値率・平均値を算出、また、log-lank 法による単変量解析・Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析により予後判定のバイオマーカー候補を探索した。

(3) 卵巣明細胞腺癌における予後に関与するバイオマーカー同定のための前方視的解析

2013-2015 年の卵巣明細胞腺癌症例を比較対象とする卵巣漿液性腺癌、卵巣子宮内膜症性嚢胞症例と共に前方視的症例集積を行い (2) と同様にデータベース化し、log-lank 法による単変量解析・Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析により予後判定のバイオマーカー候補を探索する準備を行った。

(4) 卵巣明細胞腺癌の発生や臨床的特徴に関与すると考えられる蛋白の手術検体を用いた免疫組織学的発現解析

2000-2012 年の卵巣明細胞腺癌 84 例の手術検体パラフィンブロックより未染スライドを作成し、過去の報告を参考に自動免疫組織

装置を用いて IL-6R、pStat3、BAF250a の免疫染色を行い (ペンタナ XT システムベンチマーク, Roche Diagnostics 使用)、発現の有無・強度・局在などによりスコアリングした。この、年齢、進行期、残存腫瘍径、子宮内膜症の有無などの一般的な臨床検査値にこれらの発現に関して、log-rank 法による単変量解析・Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析により予後判定のバイオマーカー候補を探索した。

(5) 卵巣明細胞腺癌細胞株における IL-6R 抑制による抗腫瘍効果の検討

卵巣明細胞腺癌細胞株で IL-6RsiRNA や抗ヒト IL-6R 抗体 (tocilizumab) を用いた IL-6R 抑制による抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 卵巣明細胞腺癌における臨床病理学的予後因子同定のための後方視的解析

2000 - 2009 年の卵巣明細胞腺癌症例のデータベース化と臨床病理学的予後因子を解析し、I 期癌では IC2 期・IC3 期が IA 期・IC1 期に比べ有意に予後不良であること (図 1)、また、IA 期・IC1 期では optimal staging category が独立予後因子となることを証明した (図 2)。

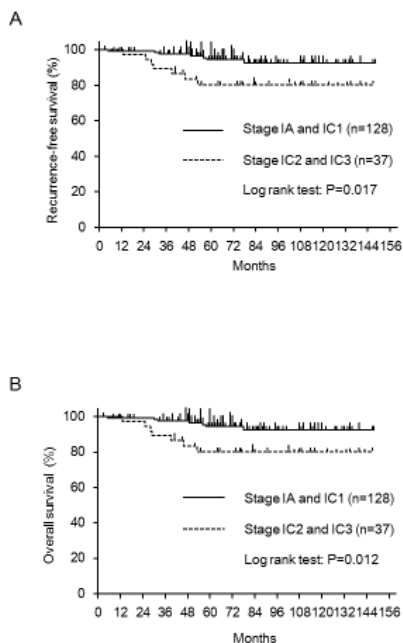


図 1 Kaplan-Meier curves for recurrence-free survival (RFS: A) and overall survival (OS: B) in patients with stages IA/IC1 and stages IC2/IC3.

Significant differences were observed in RFS and OS between patients with stages IA/ IC1 and stages IC2/IC3 (RFS: $p=0.017$; OS: $p=0.012$)

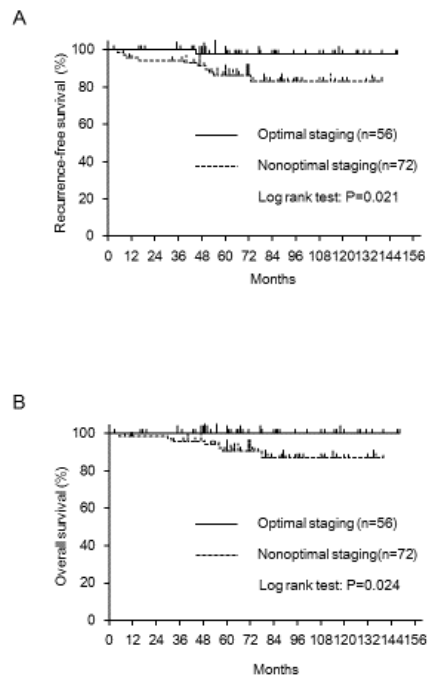


図 2 Kaplan-Meier curves for recurrence-free survival (RFS: A) and overall survival (OS: B) in patients with stages IA/IC1 by surgical staging category.

Significant differences were observed in RFS and OS between patients optimally and non-optimally staged (RFS: $p=0.021$; OS: $p=0.024$).

(2) 卵巣明細胞腺癌における予後に関与する臨床検査項目の同定のための後方視的解析

2010-2012 年の卵巣明細胞腺癌症例のデータベース化とその解析から PT-INR、Fibrinogen、D-dimer、血小板数、ヘモグロビン、CRP、LDH、アルブミンが高率に異常値を示し、血小板数、ヘモグロビン、CRP が独立予後因子となることを見出した (図 3、4)。

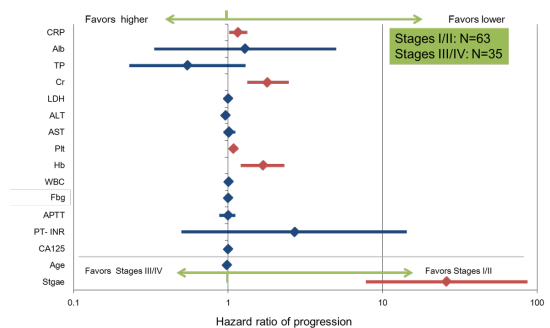


図 3 Relative risk of progression in patients with clear cell adenocarcinoma using Cox regression model

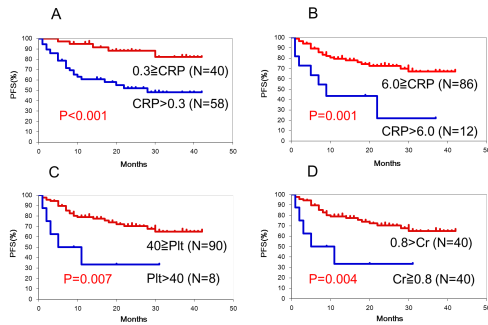


図4 Kaplan-Meier curves for progression-free survival in patients with clear cell carcinoma by broken down by C-reactive protein level (CRP, A: 0.3 mg/dl, B: 6.0mg/dl), platelet count (Plt, C: 40×10⁴ / μL) and creatinine level (Cr, D: 0.8mg/dL)

(3) 卵巣明細胞腺癌における予後に関するバイオマーカー同定のための前方視的解析

2013-2015 年は比較対象とする卵巣漿液性腺癌や卵巣子宮内膜症性嚢胞症例と共に前方視的な症例集積を行い、各種予後因子・臨床検査値のデータベース化を行った。2年間の観察期間の後、上記予後因子について検証する。

(4) 卵巣明細胞腺癌の発生や臨床的特徴に關与すると考えられる蛋白の手術検体を用いた免疫組織学的発現解析

データベース化した 2012 年までの症例の手術検体を用いて IL-6R、pStat3、BAF250a の免疫組織学的検討を行い、IL-6R 高発現例は低発現例に比べ有意に予後不良であること(図5)、また、IL-6R 発現は FIGO 進行期、残存腫瘍径と共に独立予後因子となることを証明した。pStat3、BAF250a 発現と予後相関は認められなかった。

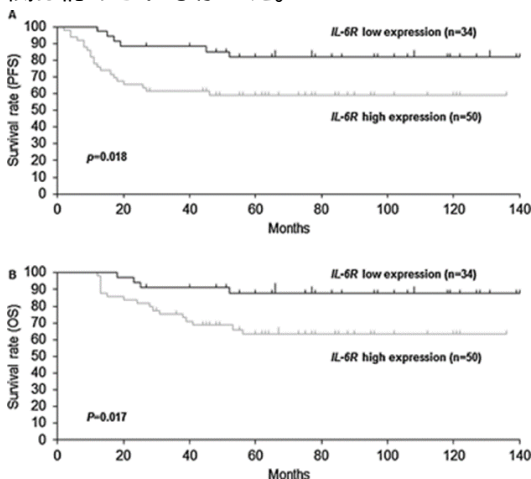


図5 Kaplan-Meier curve. Kaplan-Meier curves and P-values for PFS (A) and OS (B) in the

context of IL-6R expression are shown.

(5) 卵巣明細胞腺癌細胞株における IL-6R 抑制による抗腫瘍効果の検討

卵巣明細胞腺癌の発癌には炎症が関与することが言われているが、本研究では血中 CRP 高値や免疫組織学的な IL-6R 高発現が予後不良因子にもなることが示唆された。我々はさらに IL6/STAT3 シグナルに着目し研究を進めた。卵巣明細胞腺癌細胞株で IL-6R siRNA や抗ヒト IL-6R 抗体 (tocilizumab) を用いた IL-6R の抑制により、細胞浸潤能の低下やシスプラチンによる抗腫瘍効果の増強を明らかにした(図6)。

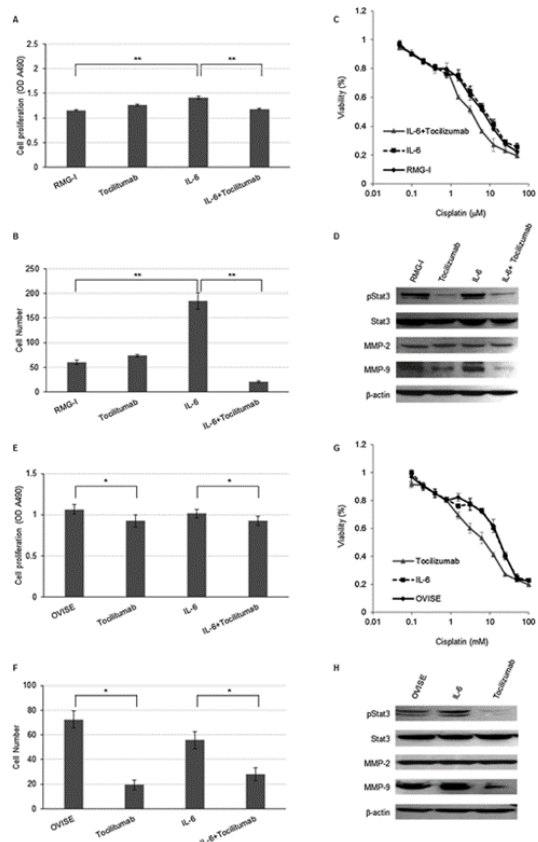


図6 Effects of Tocilizumab on CCC Cell Biology. (A-D) RMG-I was used for the model cell line with moderate expression level of both IL-6R and IL-6. (E-H) OVISE was used for the model cell line with moderate IL-6R and high IL-6 expression.

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 5 件)

Yanai N, Hirata Y, Yamaguchi N, Noguchi Y, Saito M, Nagata C, Takakura S, Yamada K, Okamoto A: Antitumor effects of interleukin-6 (IL-6)/interleukin-6 receptor (IL-6R) signaling pathway inhibition in clear

cell carcinoma of the ovary. Mol Carcinog, 55: 832-841, 2016.

Nagata C, Tanabe H, Takakura S, Narui C, Saito M, Yanaihara N, Okamoto A: Randomized controlled trial of enoxaparin versus intermittent pneumatic compression for venous thromboembolism prevention in Japanese surgical patients with gynecologic malignancy. J Obstet Gynaecol Res 41: 1440-1448, 2015.

Okamoto A, Sehoul J, Yanaihara N, Hirata Y, Braicu I, Kim BG, Takakura S, Saito M, Yanagida S, Takenaka M, Yamaguchi N, Morikawa A, Tanabe H, Yamada K, Yoshihara K, Enomoto T, Itamochi H, Kigawa J, Matsumura N, Konishi I, Aida S, Aoki Y, Ishii N, Ochiai K, Akiyama T, Urashima M: Somatic copy number alterations associated with Japanese or endometriosis in ovarian clear cell adenocarcinoma. PLoS One 10: e0116977, 2015.

Saitou M, Iida Y, Komazaki H, Narui C, Matsuno K, Kawabata A, Ueda K, Tanabe H, Takakura S, Isonishi S, Sasaki H, Okamoto A: Success rate and safety of tumor debulking with diaphragmatic surgery for advanced epithelial ovarian cancer and peritoneal cancer. Arch Gynecol Obstet 291:641-646, 2015.

Suzuki K, Takakura S, Saito M, Morikawa A, Suzuki J, Takahashi K, Nagata C, Yanaihara N, Tanabe H, Okamoto A: Impact of surgical staging in stage I clear cell adenocarcinoma of the ovary. Int J Gynecol Cancer 24:1181-1189, 2014.

〔学会発表〕(計 13件)

Yukiko Noguchi, Nozomu Yanaihara, Misato Saito, Satoshi Takakura, Aikou Okamoto. Global cancer-related microRNA expression analysis in epithelial ovarian cancer. 第68回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2016年4月.

Ayako Kawabata, Nozomu Yanaihara, Yukihiro Hirata, Takafumi Kuroda, Kazuaki Takahashi, Asuka Morikawa, Yasushi Iida, Hirokuni Takano, Seiji Isonishi, Kazuhiko Ochiai, Takako Kiyokawa, Aikou Okamoto. Interleukin-6 Expression and its Relationship with Clinicopathological Features including ARID1A Expression in Stage I Clear Cell Carcinoma of the Ovary. 第68回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2016年4月.

高倉 聡:何を伝え、何を指すか? どう繋ぐ拡大手術と低侵襲手術 卵巣がん早期例の縮小手術の可能性から進行例のdebulking. 第57回日本婦人科腫瘍学会, シンポジウム4, 盛岡市, 2015年8月.

鈴木 佳世, 斎藤 元章, 川畑 絢子, 鈴木 二郎, 飯田 泰志, 上田 和, 矢内原 臨, 田部 宏, 高野 浩邦, 山田 恭輔, 磯西 成治, 落合 和彦, 佐々木 寛, 高倉 聡, 岡本 愛光: staging laparotomyでFIGO1期とした卵巣癌の術後化学療法の意義. 第57回日本婦人科腫瘍学会, ミニワークショップ4, 盛岡市, 2015年8月.

鳴井 千景, 田部 宏, 高倉 聡, 永吉 陽子, 駒崎 裕美, 丸田 剛徳, 井上 桃子, 高野 浩邦, 磯西 成治, 落合 和彦, 佐々木 寛, 岡本 愛光. カルボプラチン過敏性反応を発症した上皮性卵巣癌症例に対するプラチナ製剤再投与. 第67回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜, 2015年4月.

川畑 絢子, 平田 幸広, 清川 貴子, 斎藤 美里, 小田嶋 俊, 久田 裕恵, 野口 大斗, 鈴木 佳世, 野口 幸子, 山口 乃里子, 矢内原 臨, 岡本 愛光. I期卵巣明細胞腺癌におけるARID1A発現の臨床病理学的検討. 第67回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜, 2015年4月.

矢内原 臨, 浦島 充佳, 平田 幸広, 竹中 将貴, 斎藤 美里, 吉原 弘祐, 榎本 隆之, 板持 広明, 紀川 純三, 松村 謙臣, 小西 郁生, 岡本 愛光. 卵巣明細胞腺癌の生物的特徴を規定する体細胞性コピー数変化の検討. 第67回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜, 2015年4月.

駒崎 裕美, 高倉 聡, 鈴木 二郎, 中島 恵子, 永吉 陽子, 永田 知映, 矢内原 臨, 田部 宏, 磯西 成治, 落合 和彦, 佐々木 寛, 岡本 愛光. 臨床検査値からみた卵巣明細胞腺癌と漿液性腺癌の違い. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2014年4月.

竹中 将貴, 河野 隆志, 矢内原 臨, 岡本 愛光. 次世代シーケンサーを用いた日本人卵巣がん治療関連遺伝子異常プロファイリング. 第66回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2014年4月.

佐藤 佳世, 高倉 聡, 矢内原 臨, 田部 宏, 森川 あすか, 鈴木 二郎, 永田 知映, 斎藤 元章, 磯西 成治, 落合 和彦, 佐々木 寛, 岡本 愛光. Surgical stagingの完遂度とI期卵巣明細胞腺癌の予後. 第65回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌, 2013年5月.

斎藤 元章, 飯田 泰志, 駒崎 裕美, 上田 和, 矢内原 臨, 田部 宏, 高倉 聡, 高野 浩邦, 山田 恭輔, 佐々木 寛, 落合 和彦, 岡本 愛光. 進行上皮性卵巣癌・腹膜癌に対する横隔膜ストリッピン

グ術を含む腫瘍減量術の安全性と完遂度.
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会,
札幌, 2013 年 5 月 .

平田 幸広, 矢内原 臨, 山口 乃里子,
落合 和徳, 岡本 愛光 . MicroRNA-21
overexpression through the 17q21-24
amplification regulates PTEN tumor
suppressor gene expression in ovarian
clear cell carcinoma . 第 65 回日本産科
婦人科学会学術講演会, 札幌, 2013 年 5
月 .

Chie Nagata, Hiroshi Tanabe, Satoshi
Takakura, Chikage Hayashi, Momoko
Inoue, Toshiyuki Seki, Motoaki Saito,
Nozomu Yanaihara, Kyosuke Yamada,
Hiroshi Sasaki, Kazunori Ochiai, Aikou
Okamoto . Randomized controlled trial
of enoxaparin versus intermittent
pneumatic compression for venous
thromboembolism prevention in
surgical patients with gynecologic
malignancy . 第 65 回日本産科婦人科学会
学術講演会, 札幌, 2013 年 5 月 .

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高倉 聡 (TAKAKURA, Satoshi)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60256401

(2) 研究分担者

矢内原 臨 (YANA IHARA, Nozomu)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20349624

山田 恭輔 (YAMADA, Kyosuke)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30230452

(3) 連携研究者

なし