

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861505

研究課題名(和文) FISH法を用いたPTEN遺伝子異常による子宮内膜癌早期診断の検討

研究課題名(英文) PTEN protein expression and gene alteration as a diagnostic tool for earliest endometrial cancer

研究代表者

西村 由香里(Nishimura, Yukari)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：30361017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：LBC法を用いた子宮内膜細胞診に遺伝子解析を併用することでより精度の高い子宮内膜癌の診断が可能かを検討することを目的とし、PTEN遺伝子の欠失および蛋白発現を子宮内膜細胞診材料にて解析した。子宮内膜癌症例においては正常子宮内膜や子宮内膜増殖症に比べPTEN蛋白が減少していた。LBC標本でのPTEN遺伝子異常の検出においては、現在は前処理法などを追加し安定したシグナルを検出するプロトコルを検討中である。

研究成果の概要(英文)：To establish the accurate diagnostic tool for the endometrial cancer, we analyzed the PTEN protein expression and gene loss of endometrial carcinoma using liquid-based cytology (LBC). PTEN protein expression was decreased in endometrial cancer compared to normal and endometrial hyperplasia. FISH assessment for PTEN gene in LBC slide needs the pretreatment to detect the clear fluorescent signal. We are considering a new protocol to detect a stable fluorescence signal in LBC slides.

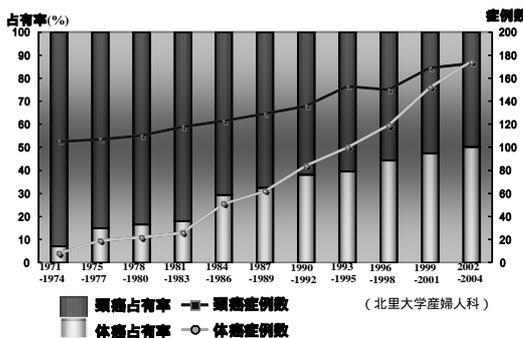
研究分野：細胞診断学

キーワード：子宮内膜癌 PTEN Liquid-based cytology 免疫細胞化学 FISH

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は相対的・持続的高エストロゲンの持続刺激を背景とし、DNA 修復遺伝子のメチル化異常や PTEN、K-ras などのシグナル伝達の異常により癌化することが報告されている。近年では著しい増加がみられている(図1)が現在のところ子宮内膜癌の早期発見に有用な腫瘍マーカーはなく、子宮内膜細胞診は子宮内膜癌の早期発見に有用なスクリーニング検査法として用いられている。しかしながら子宮内膜細胞診は頸部細胞診に比し診断精度が低く、形態学的診断の限界を補完し得る新たな診断法の必要性が高まっている。そこで我々は、従来より行われている子宮内膜細胞診に近年米国にて開発された液状化検体細胞診(Liquid-based cytology; LBC)を応用し、形態学的解析と遺伝子解析を同時に行うことでより精度の高い診断が行えるのではないかと考え研究を行ってきた。LBC法は採取した細胞すべてを固定保存する手法であり、従来法とは異なり形態学的検査と遺伝子学的検査を同時に行うことが可能となる。LBC法を用いた子宮頸部細胞診では HPV-DNA 検査を併用した有用性が評価され、子宮頸部病変の検出に貢献しているが、子宮内膜細胞診は欧米諸国では行われておらずその有性は評価されていない。

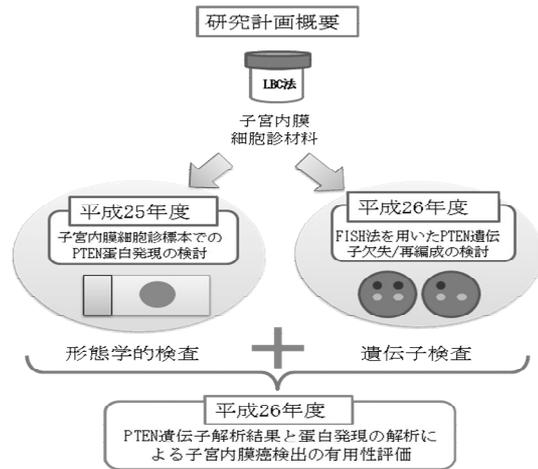
図1. 北里大学病院における子宮頸癌と子宮体癌の症例数と占有率



2. 研究の目的

本邦では従来からの子宮内膜細胞診の形態学的診断技術の蓄積があり、LBC法による新たな技術を応用して現状の問題点を解決しながら、遺伝子検査を追加しさらに精度の高い検査法を開発するのが本研究の目的である。本研究ではLBC法による子宮内膜細胞診を形態学的解析のみではなく、いまだ解析が十分に行われていない遺伝子解析を用いた子宮内膜癌の検査法を構築することを目的としている。子宮内膜癌において高頻度に認められる PTEN の遺伝子異常を、LBC法にて固定保存した細胞を用いて検討する。PTEN 遺伝子異常の探索にはエクソン1~9と隣接するイントロン領域のシーケンス解析、プロモーター解析、欠失/再編成の解析などが行われるが、臨床検査としての応用を考慮すると、現在の病理組織検査で行われている免疫染色を用いた蛋白発現や蛍光 in situ

ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization; FISH)法による欠失/再編成の解析が最も有用であると考え。正常子宮内膜、前癌病変である子宮内膜増殖症および子宮内膜癌を対象として評価し、子宮内膜病変の診断法としての有用性を検討し、検出率の高い子宮内膜細胞診検査法を確立することを目的とする。



3. 研究の方法

(1) LBC法を用いた子宮内膜細胞診による形態学的解析

LBC法により固定された子宮内膜細胞診材料を用い BD Diagnostics, Diagnostic TriPath社の作製技術に従い、複数枚のLBC細胞診標本を作製した。各々の症例において1枚は従来法と同様にパパニコロウ染色を行い、形態学的観察を行った。

(2) PTEN 蛋白発現の解析

作製した未染 LBC 標本において抗 PTEN 抗体 (Clone 6H2.1, Cascade Bioscience 社) 検出システムにはニチレイ社の高感度 Polymer 法 (Histofine Simple stain MAX-PO MULTI) を用いて免疫細胞化学染色を行い、蛋白発現を検討した。

(3) LBC 標本を用いた FISH

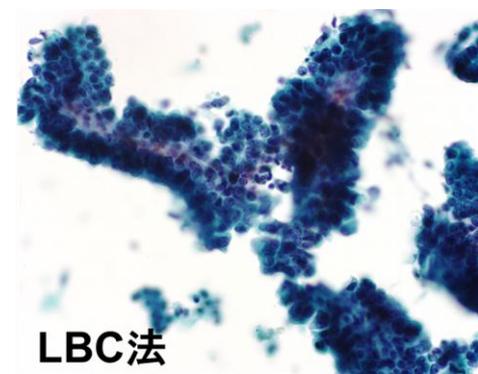
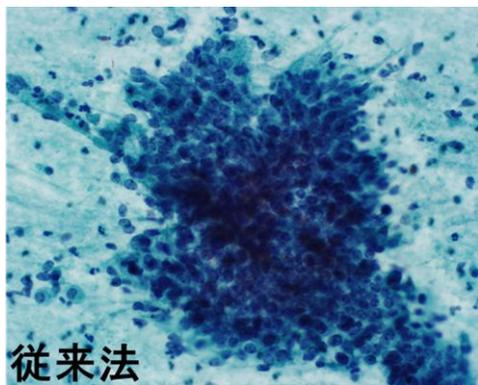
Agilent 社の FISH プローブ PTEN (10q23.31) / CEP® 10 Dual-Color Probe、DAKO 社の FISH Cytology Kit を用い LBC 標本にて PTEN 遺伝子の欠失/再編成の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) LBC法を用いた子宮内膜細胞診による形態学的解析

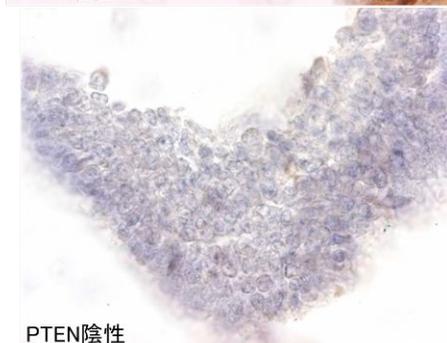
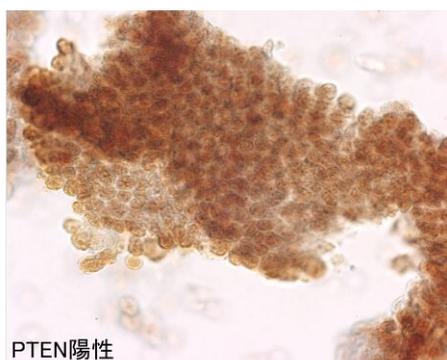
LBC法で作製した標本は従来法に比べ背景が清明なことが多く、重積性の著しい細胞集塊でも細胞の詳細な観察が可能であった。しかしながら、従来法にて高分化型類内膜腺癌の特徴とされる辺縁不整樹枝状の所見はLBC標本では確認し難いことがわかった。LBC標本を顕微鏡する際には従来法とは異なった細胞観察が求められLBC標本を実際に

診断に応用する際にはある程度の慣らし期間が必要であると思われた。



## (2) PTEN 蛋白発現の解析

PTEN 蛋白の発現は、正常子宮内膜では解析した症例 8 例全例において発現していた。子宮内膜癌の前癌病変とされる子宮内膜増殖症では 10 例中 7 例、類内膜腺癌においては 25 例中 10 例に PTEN の発現を認めた。PTEN 蛋白発現は子宮内膜の発癌の早期から消失が認められ、癌化に関与していることが示唆された。



## (3) LBC 標本を用いた FISH

LBC 標本において PTEN 遺伝子、およびセントロメア 10 に対するプローブを用いた検討を行ったが、従来法に比べ LBC 標本では明瞭なシグナルが観察し難いことがわかった。今回の検討に用いた LBC 標本作製法である SurePath 法は固定保存液中にエタノールやメタノール、イソプロパノールのほかにもホルムアルデヒドが含まれており、通常の細胞診標本用の FISH プロトコルを改良する必要があると考えられた。現在は、LBC 標本において明瞭なシグナルを検出するプロトコルを確立するため、カルノア固定液による再固定、界面活性剤を用いた温浴処理、酵素処理などの検討を行っている。

## 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 2 件)

(1) 荒井 ゆり子、西村 由香里、川村 瑞穂、松本 和将、三枝 信、佐藤 雄一、大部 誠、服部 学. 尿道原発の明細胞腺癌の 1 例. 日本臨床細胞学会神奈川県支部会誌. 査読有. 19 巻 1 号 : 30-34. 2014.

(2) 服部 学、西村 由香里、荒井 ゆり子、柿沼 廣邦、横山 大、町田 大輔、山下 和也、三枝 信、佐藤 雄一、大部 誠. 細胞診標本における乾燥再水和法の有用性に関する検討. 日本臨床細胞学会神奈川県支部会誌. 査読有. 18 巻 1 号 : 21-27. 2013.

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) 田中 圭、西村 由香里、荒井 ゆり子、柿沼 廣邦、町田 大輔、山下 和也、松本 和将、大部 誠、佐藤 雄一、服部 学. アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法における最適作製法の確立およびその特徴. 第 53 回日本臨床細胞学会秋期大会. 下関市民会館・海峡メッセ下関、下関市生涯学習プラザ (山口県下関市). 2014.11.8.

(2) 服部 学、西村 由香里、荒井 ゆり子、柿沼 廣邦、横山 大、町田 大輔、山下 和也、三枝 信、佐藤 雄一、大部 誠. 細胞検査士養成の現状と将来 北里大学における細胞検査士養成教育 4 年制大学としての学部一環・一貫教育. 第 53 回日本臨床細胞学会秋期大会. 下関市民会館・海峡メッセ下関、下関市生涯学習プラザ (山口県下関市). 2014.11.8.

(3) 田中 圭、西村 由香里、荒井 ゆり子、柿沼 廣邦、町田 大輔、山下 和也、松本 和将、大部 誠、佐藤 雄一、服部 学. アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法の検討. 第 33 回日本臨床細胞学会神奈川県支部学術集会. 相模原南メディカルセンター (神奈川県相模原市). 2014.10.4.

(4) 荒井ゆり子、服部 学、西村由香里、柿沼廣邦、山下和也、川村瑞穂、松本和将、三枝 信、大部 誠. 尿道に発生した明細胞腺癌の1例. 第32回日本臨床細胞学会神奈川県支部学術集会. 相模原南メディカルセンター(神奈川県相模原市) 2013.9.28.

(5) 藤田 奈央、南 尚、松本 和将、長塩 亮、西村 由香里、服部 学、佐藤 雄一. pT1G3膀胱癌患者血清中の腫瘍関連抗原に対する自己抗体の探索と評価. 第102回日本病理学会(北海道札幌市) 2013.6.7.

(6) 町田 大輔、西村 由香里、柿沼 廣邦、服部 学、山下 和也、渡辺 純、上坊 敏子、三上 哲夫、大部 誠、三枝 信. ワークショップ「内膜のLBC」子宮内膜LBCにおける形態学的特性と応用. 第54回日本臨床細胞学会総会. グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール(東京都品川) 2013.6.2.

(7) 齋藤 純江、柿沼 廣邦、西村 由香里、服部 学、山下 和也、佐藤 雄一、伊豫田 明、佐藤 之俊、三上 哲夫、三枝 信. 肺低分化型腺癌と扁平上皮癌の鑑別診断における免疫細胞化学法の有用性. 第54回日本臨床細胞学会総会. グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール(東京都品川) 2013.6.2.

(8) 服部 学、西村 由香里、荒井 ゆり子、柿沼 廣邦、町田 大輔、山下 和也、松本 和将、三枝 信、佐藤 雄一、大部 誠. アンブレラ類似細胞を伴う膀胱尿路上皮癌における組織細胞学的検討. 第54回日本臨床細胞学会総会. グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都品川) 2013.6.1.

(9) 荒井 ゆり子、服部 学、西村 由香里、藤田 奈央、柿沼 廣邦、山下 和也、松本 和将、三枝 信、佐藤 雄一、大部 誠. 膀胱尿路上皮癌におけるCD147/EMMPRINの発現. 第54回日本臨床細胞学会総会. グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都品川) 2013.6.1.

(10) 柿沼 廣邦、齋藤 純江、西村 由香里、服部 学、山下 和也、小川 史洋、伊豫田 明、佐藤 之俊、三上 哲夫、三枝 信. 肺がんの組織別細胞診 原発性肺扁平上皮癌の細胞所見. 第54回日本臨床細胞学会総会. グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都品川) 2013.6.1.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 由香里 (NISHIMURA, YUKARI)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：30361017