

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460422

研究課題名(和文) 発癌を特徴づける炎症性背景と、単球のマクロファージ分化におけるシグナル経路の解明

研究課題名(英文) Investigation of tumor microenvironment and signaling cascade of monocyte differentiation into macrophages.

研究代表者

古屋 充子 (FURUYA, Mitsuko)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10361445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：稀少がんを対象に、腫瘍部および前癌病変をマイクロダイセクションしてDNA、RNAを抽出し、遺伝子変化の解析を進めた。形態変化と遺伝子変化との相関に対して不明の点が多いいくつかのがん抑制遺伝子に着目した。

FLCNの胚細胞異常を有する場合、腎臓を主体にセカンドヒットやヘテロ接合性消失が認められた。しかしセカンドヒットが認められない症例においても蛋白質レベルでFLCNの顕著な減弱が認められた。メチル化は確認できなかった。ドミナントネガティブ効果により蛋白発現が抑制されている可能性が最も考えられた。

数例の腎癌において初代培養株を作成した。1例はSV40T抗原により不死化した。

研究成果の概要(英文)：We investigated genotype-phenotype correlation in rare tumors, mainly those with FLCN germline mutations, using surgically resected specimens.

Approximately 40% of tumors with FLCN germline mutations had second hits or loss of heterozygosities. Those without second hits also demonstrated suppressed expression of FLCN at protein level, indicating that mutant FLCN had dominant-negative effects.

We successfully established some primary culture tumor cells from surgically resected renal tumors harboring FLCN germline mutations. We also established one immortalized cells using SV40T antigen.

研究分野：人体病理

キーワード：がん関連遺伝子 染色体 コピー数 前がん病変

1. 研究開始当初の背景

癌の進展においては、癌細胞自身の異常 (癌抑制遺伝子や癌遺伝子異常) に加え、癌組織周囲の炎症性微小環境が鍵となる。我々は病理学的特徴から発癌と癌進展における癌細胞側の異常とともに癌炎症による高 IFN- γ 環境下での炎症細胞側の異常について知見を重ねてきた。

2. 研究の目的

生殖泌尿器癌を主な対象として、責任遺伝子の変化と腫瘍形態の関連について治療標的になりうるシグナルに絞って検討するとともに、炎症細胞に分化する単球系細胞における分化障害から病態を反映するマーカーを探索する。

3. 研究の方法

対象癌(婦人科癌と腎癌)を用いて腫瘍と血液とから DNA, RNA, 蛋白質を抽出し、コピー数変化、転写段階での異常、蛋白質発現などを検討した。免疫染色により発現変動のある細胞を組織中で特定した。

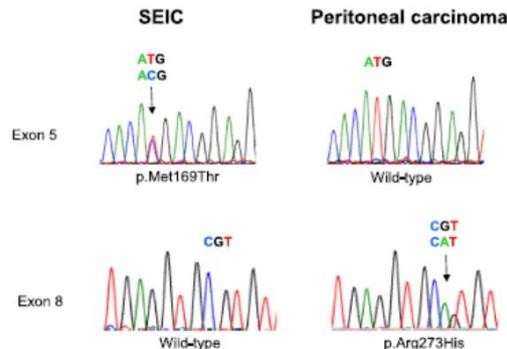
4. 研究成果

(1) 内膜症を背景とした卵巣癌部では CD163 (+) CXCL4 (-) マクロファージが多数浸潤し、IFN- γ 高発現癌症例においてこれらのマクロファージから suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) が減弱している知見を得た。発現誘導に miR30d と miR155 に関連が示唆されるデータを得たが有意差は得られなかった。

(2) 子宮内膜ポリープを背景として閉経期に発症する高悪性度子宮漿液性上皮内癌 (serous endometrial intraepithelial carcinoma: SEIC) において6例中1例に FBXW7 のミスセンス変異が同定され、発癌初期段階から FBXW7 が関与している可能性が示唆された。SEIC 周囲の異型腺管にも免疫染色で FBXW7, Cyclin E の陽性像がみられ、変異解析を支持する結果であった。また SEIC 部位では背景となるポリープ腺管にはホルモン受容体発現が保たれていたが間質細胞ではしばしば減弱していた。SEIC と周囲異型腺管にホルモン受容体減弱と HER2 発現が協調性に起こっていたことから、閉経期患者に発症する本疾患には、発癌微小環境にポリープ間質細胞が何らかの役割を果たしていることが示唆された。

(3) 上記 SEIC は病変が限局性であれば予後良好であるが、浸潤性が乏しいにもかかわらず予後不良例があることが知られており、2014年のWHO分類では独立した組織型として記載されるようになった。しかし臨床進行期I期相当例のフォロー中再発に関するまとまった情報がなく、術後5年以降のフォロー是非については論じられていなかった。こ

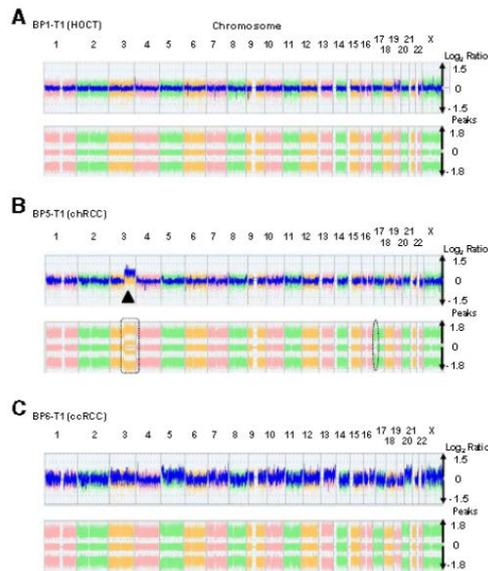
のため術後8年を経て腹腔内漿液性癌を発症した症例について原発の SEIC 晩期再発か、或いは2重癌か判断困難な症例を解析した。形態的には両者とも同様であったが、ホルモン受容体や WT-1 の免疫染色では SEIC が陰性であったのに対し腹膜癌では一部陽性であった。



(図1)

マイクロダイセクションした SEIC と腹腔癌を比較したところ、両者とも p53 一塩基変異が認められた。しかし変異箇所が相互排他的であり、両者は別の腫瘍と考えられた (図1)。この結果は SEIC 診断の問題点を明らかにした。即ち SEIC 診断時は内膜の詳細な検討を行うことが求められるが付属器については言及されていない。しかし SEIC が腹腔内再発した時には SEIC の播種か付属器、特に卵管上皮内癌の播種が鑑別となる。数年を経て腹膜癌が発症した症例について付属器情報が不備の場合は後者の可能性を除外できなくなる。また SEIC は閉経後高齢女性に発症することが多いためリンパ節郭清を行わない。したがって初期の SEIC はあくまで暫定診断であり、付属器や骨盤リンパ節および腹腔内病変について慎重にフォローする必要があると考えられる。

(4) FLCN 胚細胞変異による遺伝性腎癌 (mFLCN-RCC) について、胚細胞変異部位が判っている 11 名の患者から得られた腫瘍検体を用いて解析した。コピー数解析においては、mFLCN-RCC におけるコピー数は殆ど変化がなく、2 例の嫌色素性タイプにおいて 3 番染色体長腕 (3q) のトリソミーがみられたものの、散発癌の嫌色素性タイプに見られるような 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 染色体ロスを模倣する例は皆無であった。また 2 例の淡明細胞型においても散発癌の同組織型に見られる 3p, 9q ロスも 5q 増幅も認められなかった (図 2)。更に詳細に調べると、染色体全体に多数分布するヘテロ接合性消失 (loss of heterozygosity, LOH) は片親性ダイソミー (uniparental disomy, UPD) であることが判明した。その特徴を FISH に利用すると、嫌色素性タイプにおいて散発性腎癌と FLCN 変異型腎癌との間で有意な差が出るこ



(図 2)

明らかになった。すなわち、散発性嫌色素性タイプで 2, 6, 17 染色体はモノソミーとして捉えられるが、mFLCN-RCC の嫌色素性タイプでは殆どがダイソミーであった。この結果から、遺伝的背景が判らない腎癌患者において病理診断を通して背景疾患の可能性に言及できると考えられた。組織型が多様で遺伝子発現や染色体コピー数が独特である本腫瘍の位置付けは、2016年に改訂された最新の WHO 分類では取り入れられていない。このことから、更に検討を重ねて、形態的には鑑別できない散発性嫌色素性腎細胞癌と mFLCN-RCC の相違を明らかにしていく予定である。

(5)さらに mFLCN-RCC について体細胞変異を検討した。約 40%の腫瘍に FLCN のセカンドヒットが認められた。しかしセカンドヒットが確認されない腫瘍においても蛋白質レベルでの FLCN 発現は著しく減弱していた。メチル化は確認されず、1 ヒットだけでも FLCN 発現が著しく減弱しており、ドミナントネガティブ効果が示唆された。続いて数例から初代培養細胞を樹立し、うち 1 例においては SV40T 抗原により不死化した。これまで mFLCN-RCC の細胞株は米国国立がん研究所に 1 種類あるのみで、in vitro 実験が出来なかったが、今後この細胞を用いて FLCN 機能やがん抑制遺伝子としての特徴を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Furuya M, Yao M, Tanaka R, Nagashima Y, Kuroda N, Hasumi H, Baba M, Matsushima J, Nomura F, Nakatani Y. Genetic, Epidemiologic and Clinicopathologic

Studies of Japanese Asian Patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Clin Genet*. 査読有 90: 2016: 403 - 412. doi: 10.1111/cge.12807

2. Furuya M, Tanaka R, Okudela K, Nakamura S, Yoshioka H, Tsuzuki T, Shibuya R, Yatera K, Shirasaki H, Sudo Y, Kimura N, Yamada K, Uematsu S, Kunimura T, Kato I, Nakatani Y. Pulmonary Neoplasms in Patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome: Histopathological Features and Genetic and Somatic Events. *PLoS One*, 査読有 2016 e0151476.

doi:10.1371/journal.pone.0151476.

3. Kato I, Iribe Y, Nagashima Y, Kuroda N, Tanaka R, Nakatani Y, Hasumi H, Yao M, Furuya M. Fluorescent and Chromogenic in situ Hybridization of CEN17q as a Potent Useful Diagnostic Marker for Birt-Hogg-Dubé Syndrome-associated Chromophobe Renal Cell Carcinomas. *Hum Pathol*. 査読有 52:2016: 74-82. doi: 10.1016/j.humpath.2016.01.004.

4. Iribe Y, Yao M, Tanaka R, Kuroda N, Nagashima Y, Nakatani Y, Furuya M. Genome-wide Uniparental Disomy and Copy Number Variations in Renal Cell Carcinomas Associated with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Am J Pathol*. 査読有 186: 2016; 337-46. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.10.013

5. Furuya M, Sato T, Tanaka R, Yamamoto M, Yokota RN, Miyagi E. Metachronous Serous Endometrial Intraepithelial Carcinoma and Serous Peritoneal Carcinoma: Analysis of Probable Independent Lesions. *Diagn Pathol* 査読有 11: 2016, 130. doi: 10.1186/s13000-016-0585-0

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Furuya M., Kato I, Iribe Y, Kuroda N, Nagashima Y, Hasumi H, Yao M, Nakatani Y. Histopathological analyses of renal tumors in Birt-Hogg-Dube syndrome. XXXI International Congress of the IAP 2016.Cologne, Germany. 2016.9.25-29.
2. 古屋充子, 田中玲子, 入部康弘, 黒田直人, 長嶋洋治, 加藤生真, 矢尾正祐, 中谷行雄: Birt-Hogg-Dubé 症候群の疫学調査と全身病変の病理組織学的特徴. 第 106 回日本病理学会総会. 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2016.5.12-14
3. 古屋充子, 矢尾正祐, 野村文夫, 長嶋洋治, 中谷行雄: アジアにおける Birt-Hogg-Dubé 症候群の後方視的コホート研究. 第 40 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会. 国立京都国際会館(京都府京都市), 2016.4.3-6
4. 古屋充子, 中谷行雄, 蓮見寿史, 長嶋洋治, 黒田直人, 野村文夫, 馬場理也, 田中玲子, 矢尾正祐: 本邦における Birt-Hogg-Dubé 症候群 130 家系の疫学解析: 家族性腎がんケアに向けた BHD ネット情報. 第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会. ひめぎんホール(愛媛県松山市), 2016.6.3-4
5. 古屋充子, 入部康弘, 蓮見壽史, 馬場理也, 長嶋洋治, 加藤生真, 中谷行雄, 矢尾正祐: Birt-Hogg-Dubé 症候群における腎癌の分子病理学的検討. 第 75 回日本癌学会総会. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016.10.8-10

〔図書〕（計 2 件）

1. 古屋充子: 公益財団法人金原一郎医学医療振興財団『生体の科学』, 卵巣・卵管がんマーカーCA125. 67 (5), 2016, pp. 2-4,
2. 古屋充子: 文光堂『卵巣・卵管腫瘍病理

アトラス』未分化胚細胞腫/デイスジャーミノーマ. 各論 F1, 2016, pp. 287-292.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~testwp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋充子 (FURUYA, Mitsuko)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：10361455

(2) 研究分担者

田中玲子 (TANAKA, Reiko)
千葉大学・真菌医学研究センター・助教
研究者番号：60143319

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()