

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462534

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌に対する新たな転写因子・セリンプロテアーゼ系マーカーの有用性

研究課題名(英文) The serine protease (TFPI2) is a useful biomarker for ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

古川 直人 (Furukawa, Naoto)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50347556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌におけるHNF-1 の組織別の発現では、明細胞癌でのみ強く発現していた。また、子宮内膜性嚢胞もHNF-1 は強陽性であり、HNF-1 のみでの内膜症性嚢胞と内膜症関連卵巣癌の鑑別は困難と考えられた。

卵巣癌症例による血清TFPI2の値は有意差をもって明細胞癌では高値を示した。TFPI2は明細胞癌をCA125より鋭敏に見分けることができ、その有用性が明らかとなった。TFPI2は、妊婦の胎盤に特異的に発現するタンパク質分解酵素阻害因子として発見された。偽陽性、偽陰性例も散見されたため、さらに症例を集積し、妊娠によるホルモン変化や良性疾患による影響を明らかにする必要がある。

研究成果の概要(英文)：HNF-1 was expressed exclusively in ovarian clear cell carcinoma, but not in other ovarian cancers by immunohistochemistry. It was also expressed in endometriotic cyst, the differential diagnosis is difficult between endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer.

The serum TFPI2 levels were specifically elevated only in ovarian clear cell carcinoma patients, compared with non-clear cell carcinoma and benign ovarian tumor. The TFPI2 level in patients with clear cell carcinoma was elevated to that in patients with endometriosis, in contrast to CA125. Therefore TFPI2 is a useful biomarker for preoperative clinical diagnosis of clear cell carcinoma.

TFPI2, also known as placental protein 5, is abundantly produced in placenta and is significantly elevated in the serum of pregnant women. There are some false-positive or false-negative cases. Further studies using more many samples are required to confirm to influence due to the menstruation or pregnancy.

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

上皮性卵巣癌は日本人女性での罹患率・死亡率ともに増加傾向にある疾患であるが、検診の有効性は否定的であり、発見時にはその70%が期・期の進行癌となっている。組織型は漿液性、類内膜、粘液性、明細胞の4種類が主であるが、卵巣癌のマーカーとして認知されているCA125は明細胞と粘液性では上昇しないことが多い。また、明細胞癌の卵巣癌全体に占める割合は、欧米での5%に対して、本邦においては23%を占めていて漿液性に続く2番目に多い発生頻度である。さらに、明細胞癌は、抗癌剤抵抗性で転移浸潤能が高く、卵巣癌全体の中でも最も予後が悪い。以上のことより、明細胞癌の早期発見のためのツールの開発が急務である。

これまで我々は、卵巣明細胞癌に特異的に発現する遺伝子群をマイクロアレイにより網羅的に検索、その結果、卵巣明細胞癌で過剰発現している遺伝子としてHNF-1 (hepatocyte nuclear factor-1 beta)を同定し、この遺伝子が細胞周期異常と抗がん剤耐性に関わることを見出した(Kobayashi H. et al. 2009, 文献 29)。また我々の共同研究により、卵巣癌細胞株のプロテオーム解析により、明細胞癌のみに検出されかつ、血中に検出されるタンパク質が同定され、Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2)が、卵巣癌の中で明細胞癌のみに高頻度に発現していることが世界で初めて報告された(Arakawa N. et al. J Proteome Res. 2013)。

近年の分子生物学的研究の進歩により、ヒトがんはゲノムの不安定性に基づく増殖機序・制御機構の異常により発生・進展すると理解されている。そのため、蓄積する遺伝情報の異常が遺伝子ネットワークの破綻を引き起こし、癌細胞の形質を段階的に変化させて生物学的悪性度を獲得していくメカニズムの研究が必須である。ポストゲノム時代を迎えた現在、集積されたゲノム情報や飛躍的な進展をみせている生命科学の解析手法を駆使することにより、新たな「婦人科癌診断および治療戦略」を構築することが可能になる。今回、我々が多くの報告を行ってきたHNF-1に加え、世界で初めて報告された、TFPI2が卵巣癌の中で明細胞癌に特異的に上昇していることを用いて、明細胞癌の早期診断、進行度との相関、治療過程におけるモニタリングの有用性、再発時の有用性を検討する。その結果により、現在の実地臨床において、困難である明細胞癌に対する包括的な管理が、劇的に改善される可能性を秘めている。その結果、21世紀における癌の克服に向けて、婦人科癌の予防・診断・治療・予後判定に貢献することができる。

2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌患者、婦人科良性疾患患者の血清中のHNFとTFPI2濃度を測定

して、明細胞癌で特異的に上昇していることおよび明細胞癌診断のためのカットオフ値を設定する。ついで、早期明細胞癌患者血清中のCA125とHNF・TFPI2、癌組織中のHNF-1発現を測定して、明細胞癌の早期発見には、CA125よりもTFPI2とHNF-1の組み合わせが有用であることを証明する。さらに、明細胞癌の進行度や治療効果とTFPI2・HNF-1の相関、再発時診断におけるこれら新規マーカーの有用性について検討することで、実地臨床における明細胞癌に対する早期診断・治療効果の判定・再発時の早期診断の方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

卵巣癌の中で明細胞癌のみが特異的にTFPI2とHNF-1を発現していることを用いて、実地臨床において明細胞癌の早期診断、治療効果、再発の診断に有用であることについて検証することを目的とする。血中HNF、TFPI2、CA125はELISA法にて測定し、組織中TFPI2、CA125、HNF-1の発現も検討する。続いて、卵巣癌血清および婦人科良性疾患血清中のHNF・TFPI2を測定して、明細胞癌の同定に有用なカットオフ値を算出する。さらに、進行度とTFPI2・HNF-1の相関について検討していくことで、抗癌剤治療効果を同定できるより鋭敏な指標であるか、また再発の早期診断に有用なマーカーとなり得るかについて検討する。

(1) 卵巣明細胞癌診断におけるHNF-1・TFPI2測定の有用性の検討

血液・組織サンプルの集積

我々は県内中核病院として、年間約100例の婦人科悪性疾患および年間約300例の婦人科良性疾患を治療しているため、十分な婦人科癌組織や血液サンプルを集積することが可能である。すでに、483例の卵巣癌サンプルが液体窒素に保管されており、年間30例以上の卵巣癌の組織や血清サンプルを蓄積している。また、婦人科良性疾患の組織や血清サンプルも、現在800例以上蓄積されていて、年間300例以上の蓄積している。これらのサンプルを継続的に集積すること、またサンプルの臨床背景データをリンクさせて、今後行っていく解析の迅速化を目的とする。

血清HNF-1・TFPI2測定

上記で集積されたサンプルを用いて、以下を測定する。

HNF-1はAmsbio Inc.のELISAキットを用いて測定。

TFPI2はUsn Life Science Inc.のELISAキットを用いて測定。

CA125はPhoenix Pharmaceuticals社のELISAキットを用いて測定。

卵巣明細胞腺癌診断のカットオフ値の設定

測定した卵巣癌組織別および婦人科良性疾患の HNF-1・TFPI2 値より、卵巣明細胞腺癌の診断におけるこれらマーカーの血中濃度の感度、特異度などを計算して、カットオフ値を設定する。

(2) 卵巣明細胞腺癌組織中の TFPI2・HNF-1 発現についての検討

卵巣明細胞腺癌組織について、TFPI2、CA125、HNF-1 の発現の免疫染色を行いそれぞれの局在の違いなどについて比較し、明細胞腺癌の診断において必須となった HNF-1 の発現同様に、TFPI2 も診断に有用かについて検討する。また、HNF-1、TFPI2 と CA125 について、上記で行った血清中のレベルと免疫染色との比較を行う。

(3) 卵巣明細胞腺癌の進行度と TFPI2・HNF-1 発現との相関について

早期卵巣明細胞腺癌診断における HNF-1・TFPI2 の有用性

上記の検討で設定した卵巣明細胞腺癌診断のための HNF と TFPI2 カットオフ値を参考に、早期卵巣明細胞腺癌血清中の HNF・TFPI2 と卵巣癌の汎用マーカーである CA125 を測定して、新規マーカーが CA125 より早期診断に有用なマーカーであるかについて検討する。

卵巣明細胞腺癌の進行度と HNF-1・TFPI2 との相関についての検討

HNF や TFPI2 が卵巣明細胞腺癌のボリュームと正の相関があれば、新たなマーカーとしてより有用であると考えられる。そのため、進行期別の卵巣明細胞腺癌血清中の HNF と TFPI2 を測定することで、進行度とこれらの相関について検討する。

卵巣明細胞腺癌の原発巣と転移巣の TFPI2・HNF-1 発現についての検討

卵巣明細胞腺癌の原発巣と転移巣を、TFPI2、CA125、HNF-1 の免疫染色を行い、それぞれの局在およびその違いについて検討する。原発巣と転移巣が同様の形質か、もしくは異なる形質を持つのかについて検討して、明細胞腺癌の高い浸潤転移能の解明の key hole となるかもしれない。

(4) 卵巣明細胞腺癌の治療効果・再発診断における TFPI2・HNF-1 発現の有用性

卵巣明細胞腺癌の治療効果と HNF-1・TFPI2 との相関についての検討

進行卵巣明細胞腺癌の抗癌剤治療中におい

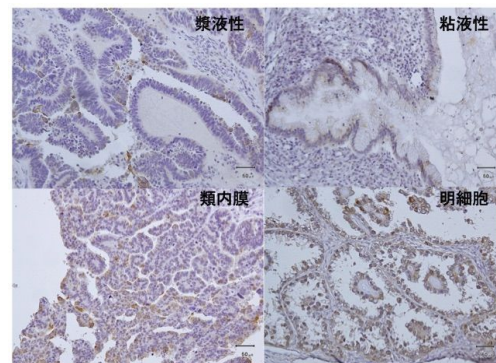
て、効果判定は画像検査を用いて行うことが一般的である。しかし、画像検査を毎月行うことは実地診療においては現実的ではないため、3か月から6か月毎に行うことが多い。そのため、毎月行う抗癌剤治療の効果を確認するには、さらなる有用な予測ツールが必要である。上記で得られた検討結果をもとに、抗癌剤治療観察中において、血清中 HNF・TFPI2 を経時的に測定して、抗癌剤治療の効果を画像検査よりもより早期にかつ簡便に予測することが可能かどうか検討を行う。

卵巣明細胞腺癌再発と HNF-1・TFPI2 についての検討

卵巣明細胞腺癌治療後の経過観察について、定期的な画像検査により再発の有無を診断することが一般的である。そのため、症状がなくても定期的に画像検査を測定する必要があり、検査の非効率性が問題としてあげられ、また症状が出てから画像検査を行うため、診断までのタイムラグが生まれることが問題としてあげられる。この経過観察期間に血清 HNF・TFPI2 測定を組み入れることで、再発の診断をより効率的にかつ早期に診断可能かどうかについて検討する。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌における HNF-1 の組織別の発現では、漿液性癌、粘液性癌、類内膜癌ではほとんど発現を認めなかったが、明細胞癌では強く発現していた(図1)。また、子宮内膜性嚢胞も HNF-1 は強陽性であった。HNF-1 のみでの内膜症性嚢胞と内膜症性嚢胞から発生した明細胞癌の鑑別は困難と考えられた。



(図1) 卵巣癌組織別の HNF-1 発現

(2) 卵巣癌症例による血清 TFPI2 の値は有意差をもって明細胞癌では高値を示した。しかし、その値にばらつきがあり、進行度、年齢、閉経など他に因子に影響されていないか解析を進めている。偽陰性、偽陽性であった症例をまとめた(図2)。本研究期間で、偽陰性であった明細胞癌は5症例。偽陽性であつ

たのは漿液性癌で7症例、類内膜癌で2症例であった。偽陽性の症例を確認すると、3症例が採血時にヘパリンを使用していた。何らかの影響があった可能性がある。明細胞癌以外の卵巣癌でTFPI2が偽陽性となった症例についてその他に特異的な要因がないか検索している。今後の検討課題である。

組織型	臨床病期	CA125 U/mL	TFPI2 pg/mL	TFPI2判定
明細胞癌	I a	45	214.0	-
明細胞癌	I c(a)	199	345.9	-
明細胞癌	I c(b)	20	282.5	-
明細胞癌	I a	46	107.9	-
明細胞癌	I c(b)	95	184.0	-
漿液性癌	IIIc	3946	476.4	+
漿液性癌	IV	379	549.2	++
漿液性癌	IIIc	16622	368.0	+
漿液性癌	IV	425	473.6	+
漿液性癌	IIIc	3621	2152.9	+++
漿液性癌	IIIc	15477	535.1	++
漿液性癌	IV	703	387.4	+
類内膜癌	IIIc	5424	608.3	++
類内膜癌	IIIc	723	459.6	+

(図2) TFPI2の偽陽性・偽陰性例

(3) TFPI2は明細胞癌をCA125より鋭敏に見分けることができ、その有用性が明らかとなった。TFPI2は、妊婦の胎盤に特異的に発現するタンパク質分解酵素阻害因子として発見された。偽陽性、偽陰性例も散見されたため、その他の婦人科良性疾患や妊娠における血清TFPI2を測定し、妊娠によるホルモン変化や良性疾患による影響を明らかにする必要がある。

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 1 件)

Arakawa N, Kobayashi H, Yonemoto N, Masuishi Y, Ino Y, Shigetomi H, Furukawa N, Ohtake N, Miyagi Y, Hirahara F, Hirano H, Miyagi E. Clinical Significance of Tissue Factor Pathway Inhibitor 2, a Serum Biomarker Candidate for Ovarian Clear Cell Carcinoma. PLoS One. 2016 Oct 31;11(10):e0165609. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0165609

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

1) 研究代表者

古川 直人 (HURUKAWA NAOTO)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 50347556

(2) 研究分担者

小林 浩 (KOBAYASHI HIROSHI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40178330

川口 龍二 (KAWAGUCHI RYUJI)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50382289