

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870129

研究課題名(和文) 卵巣粘液性腺癌の発生と進展に関する病理遺伝子学的研究

研究課題名(英文) Pathological and genomic study of ovarian mucinous adenocarcinoma

研究代表者

前田 大地 (MAEDA, DAICHI)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30585500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は卵巣粘液性腫瘍に関して、特に胃腸型と内頸部型の違いに着目して研究を遂行した。内頸部型粘液性腫瘍に関しては、内膜症関連腺癌(明細胞腺癌、類内膜腺癌)で高頻度に変異が存在することが知られているARID1A遺伝子の異常の有無を検討した。その結果、内頸部型境界悪性粘液性腫瘍の一部にARID1A異常が検出された。ARID1A異常は併存する内膜症性上皮において確認された。ARID1A異常は胃腸型粘液性腫瘍においては確認されなかった。以上の結果から、内頸部型粘液性腫瘍の発生にARID1A異常が関与していること、ARID1A異常は腫瘍発生の早期の段階で起きることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated ovarian mucinous tumor focusing on the difference between gastrointestinal-type and endocervical-type mucinous tumors. With regard to endocervical-type mucinous tumors, we investigated ARID1A alterations which is known to play an oncogenic role in endometriosis-associated ovarian cancer. As a result, loss of ARID1A expression, which suggests presence of mutation, was observed in a subset of endocervical-type mucinous borderline tumor. The loss of ARID1A expression was also observed in adjacent endometriotic epithelium. This finding suggest that ARID1A is involved in tumorigenesis of endocervical-type mucinous tumors. Further, ARID1A alteration occur in an early phase of its tumorigenesis.

研究分野：人体病理学

キーワード：卵巣粘液性腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

### 卵巣粘液性腺癌研究の重要性：

卵巣粘液性腺癌は漿液性腺癌、明細胞腺癌、類内膜腺癌と並ぶ卵巣癌四大組織亜型の一つである。粘液性腺癌は胃腸型の形態、形質を示すものがほとんどを占め、ミューラー管系への分化傾向が乏しいという点において、他の卵巣癌とは性質が異なる特異な腫瘍である。近年、漿液性腺癌、明細胞腺癌、類内膜腺癌に関してはその発生母地や腫瘍原性遺伝子変異に関する新たな知見が多く得られてきたのに対し、粘液性腺癌に関してはその発生母地、癌化の過程で生じる遺伝子異常を含め、多くが未解明のままである。また、粘液性腺癌は卵巣癌の標準的化学療法に抵抗性を示すことが多く、腹膜播種例や再発例の予後はきわめて悪いとされる。従って、その病態解明及び治療法の確立は婦人科腫瘍研究の重要な課題である。

### 卵巣粘液性腺癌の前駆病変及び発生母地：

卵巣粘液性腫瘍には胃腸型と内頸部型の二種類が存在する。いずれも粘液性嚢胞腺腫、粘液性境界悪性腫瘍といった前駆病変を経て、段階的に悪性度を増して生じてくる。胃腸型粘液性腫瘍は本来卵巣に存在しない胃腸型の上皮によって構成されており、約 1-2 割の症例において奇形腫との併存、移行が認められる。従って、少なくとも一部の粘液性腫瘍は奇形腫に含まれる胃腸型上皮を発生母地としていと考えられている (Vang et al. 2007)。なお、稀ながらブレンナー腫瘍との併存、移行が認められる症例もあり、ブレンナー腫瘍の粘液化生部を発生母地とする可能性も指摘されている (Seidman et al. 2008)。一方、内頸部型粘液性腫瘍の多くは子宮内膜症由来とされており、組織学的にも子宮内膜症性嚢胞からの移行が認められるものが多い。

## 2. 研究の目的

### 卵巣胃腸型粘液性腫瘍と内頸部型粘液性腫瘍の鑑別に役立つ免疫組織化学的マーカー

### の樹立：

卵巣胃腸型粘液性腫瘍と内頸部型粘液性腫瘍の形態の違いについてはエビデンスの蓄積があるが、両者の鑑別に有用な免疫組織化学的マーカーについての知見は乏しい。我々は本研究において両者の蛋白発現の違いに着目し、鑑別に有用なマーカーを探究する。

### 卵巣粘液性腫瘍の悪性化の過程で発現亢進をきたす蛋白を探索し、細胞株を用いてその機能を解析する：

卵巣粘液性嚢胞腺腫、境界悪性腫瘍、腺癌と stepwise に発現が亢進する遺伝子を絞り込み、粘液性腺癌細胞株を用いた in vitro 実験系でその機能を解析する。(注：粘液性腺癌細胞株に関しては胃腸型、内頸部型の区別が厳密になされているものがないのが、研究遂行上の問題点として挙げられる。)

### 卵巣内頸部型粘液性境界悪性腫瘍の発生に関わる遺伝子異常の解明：

明細胞腺癌、類内膜腺癌といった卵巣の内頸部型腫瘍では高頻度に ARID1A 変異が生じていることが知られている。本研究では内頸部型粘液性腫瘍における ARID1A 異常の頻度を解明する。

## 3. 研究の方法

### 卵巣胃腸型粘液性腫瘍と内頸部型粘液性腫瘍の鑑別に役立つ免疫組織化学的マーカーの樹立：

卵巣粘液性境界悪性腫瘍(胃腸型 52 例、内頸部型 24 例)を対象として、CK7, CK20, ER, PgR, Vimentin, CLDN18, CA125, MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, CDX2 の免疫組織化学を施行し、胃腸型粘液性境界悪性腫瘍と内頸部型粘液性境界悪性腫瘍の違いを検討する。その際に、漿液性境界悪性腫瘍も対照群として検討対象とする。

### 卵巣粘液性腫瘍の悪性化の過程で発現亢進をきたす蛋白を探索し、細胞株を用いてその機能を解析する：

卵巣粘液性嚢胞腺腫、境界悪性腫瘍、腺癌と stepwise に発現が亢進する遺伝子の候補として RRM2 に着目して検討を進める。粘液性嚢胞腺腫症例、粘液性境界悪性腫瘍(大多数が胃腸型)、胃腸型粘液性腺癌の組織切片を用いて、RRM2 の発現を免疫組織化学的に検討する。その上で、粘液性腺癌細胞株を用いた検討を行う。具体的には siRNA を用いた RRM2 の knock down を行い、細胞増殖能の変化を見た。

### 卵巣内頸部型粘液性境界悪性腫瘍の発生に関わる遺伝子異常の解明：

内頸部型粘液性境界悪性腫瘍症例 21 例を対象に ARID1A の免疫組織化学を施行する。ARID1A 変異が存在する場合には蛋白発現の消失が生じるので、その頻度を明らかにする。

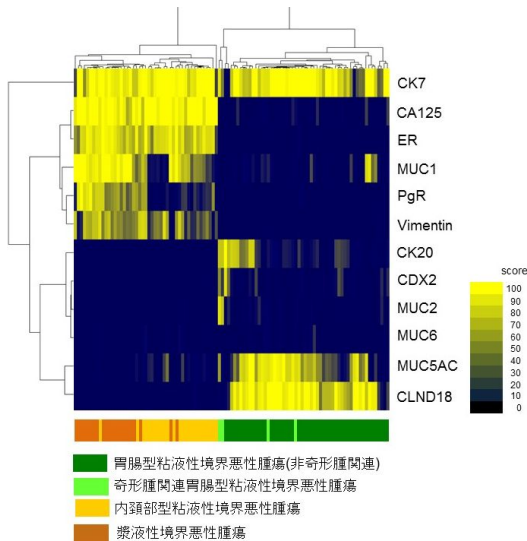
また、内膜症性上皮が併存している場合には、同部位における ARID1A 発現についても検討する。

#### 4. 研究成果

#### 卵巣胃腸型粘液性腫瘍と内頸部型粘液性腫瘍の鑑別に役立つ免疫組織化学的マーカーの樹立:

図1に免疫組織化学の結果をヒートマップとして提示する。胃腸型粘液性境界悪性腫瘍と内頸部型粘液性境界悪性腫瘍が全く異なる entity であることが明瞭である。前者のマーカーとしては CLDN18、後者のマーカーとしては ER、vimentin が有用であることが示唆される。そして、内頸部型粘液性境界悪性腫瘍はどちらかというと漿液性境界悪性腫瘍に近い性質を示すことが明らかとなった。

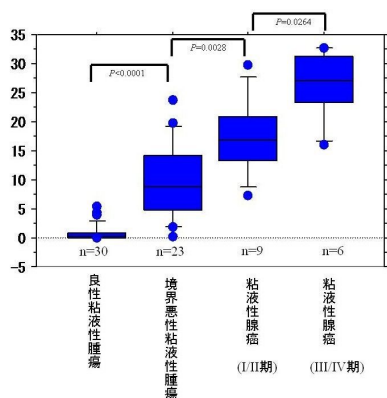
図1 卵巣粘液性境界悪性腫瘍の immunophenotype



#### 卵巣粘液性腫瘍の悪性化の過程で発現亢進をきたす蛋白 (RRM2):

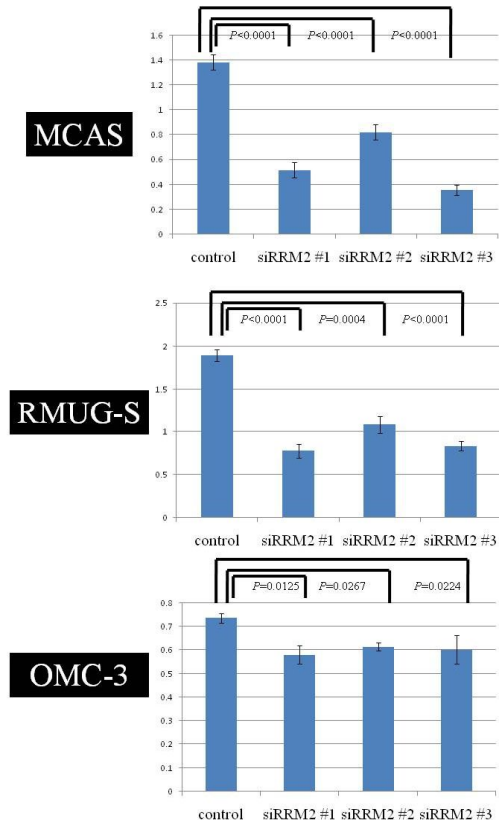
我々は卵巣粘液性腫瘍 (大多数が胃腸型) の検討から、悪性化の過程で RRM2 の発現亢進が起きることを免疫組織化学的に明らかにした。(図2)

図2 卵巣粘液性腫瘍における RRM2 発現



続いて、卵巣粘液性腺癌細胞株 (MCAS, RMUG-S, OMC-3) に対して siRNA による RRM2 の knock down を行い、増殖能の変化を見た。(図3)

図3 卵巣粘液性腺癌細胞株を用いた細胞増殖能の検討 (RRM2 knock down)



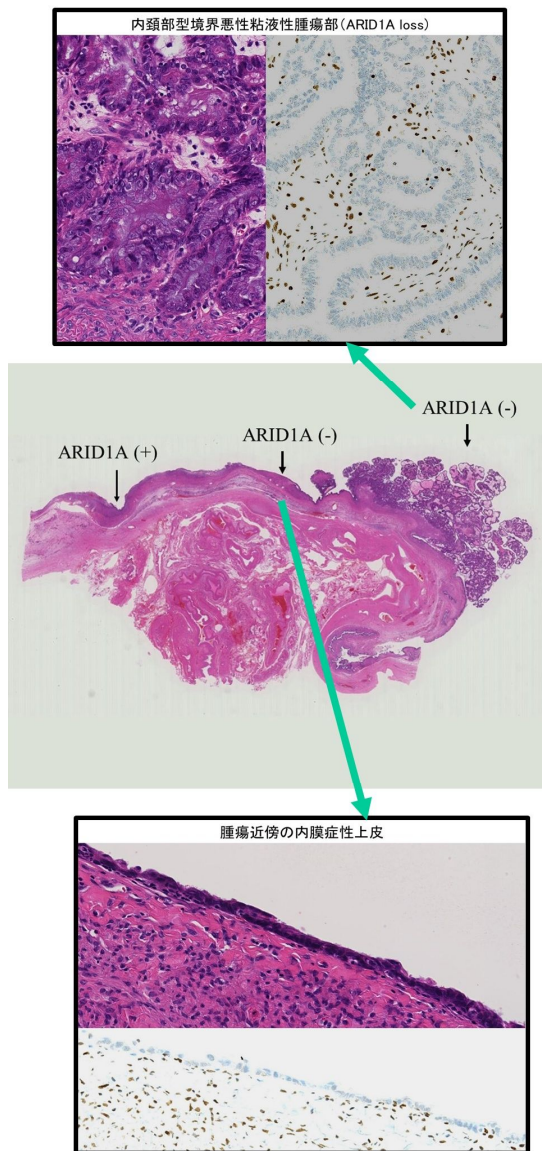
RRM2 の knock down によって卵巣粘液性腺癌細胞株の増殖能は有意に抑制された。この結果から、RRM2 が卵巣粘液性腫瘍の増殖促進に寄与している可能性が示唆された。

#### 卵巣内頸部型粘液性境界悪性腫瘍の発生に関わる遺伝子異常の解明:

卵巣内頸部型粘液性境界悪性腫瘍 21 例のうち 1 例において ARID1A 変異を示唆する ARID1A 蛋白の発現消失が確認された。この症例では背景に存在する内膜症性上皮において既に ARID1A 蛋白の発現消失が生じていた。(図4)

以上の結果から、内頸部型粘液性腫瘍の発生に ARID1A 変異が関与していると考えられる。また、ARID1A 変異が腫瘍化の早期の段階に起きている可能性が考慮された。

図 4 ARID1A 発現消失が認められた卵巣内頸部型境界悪性腫瘍



##### 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 7 件)

Kito M, Maeda D, Kudo-Asabe Y, Sato N, Shih IM, Wang TL, Tanaka M, Terada Y, Goto A.

Expression of Cell Competition Markers at the Interface between p53 Signature and Normal Epithelium in the Human Fallopian Tube.

PLoS One. 2016 Jun 3;11(6):e0156069.

査読有

Maeda D, Akiyama Y, Morikawa T, Kunita A, Ota Y, Katoh H, Niimi A, Nomiya A, Ishikawa S, Goto A, Igawa Y, Fukayama M, Homma Y. Hunner-Type (Classic) Interstitial Cystitis: A Distinct Inflammatory Disorder Characterized by Pancystitis, with Frequent Expansion of Clonal B-Cells and Epithelial Denudation.

PLoS One. 2015 Nov 20;10(11):e0143316.

査読有

Tanaka M, Shimamura S, Kuriyama S, Maeda D, Goto A, Aiba N.

SKAP2 Promotes Podosome Formation to Facilitate Tumor-Associated Macrophage Infiltration and Metastatic Progression. Cancer Res. 2016 Jan 15;76(2):358-69.

査読有

Ikeda Y, Oda K, Ishihara H, Wada-Hiraike O, Miyasaka A, Kashiya T, Inaba K, Fukuda T, Sone K, Matsumoto Y, Arimoto T, Maeda D, Ikemura M, Fukayama M, Kawana K, Yano T, Aoki D, Osuga Y, Fujii T.

Prognostic importance of CDK4/6-specific activity as a predictive marker for recurrence in patients with endometrial cancer, with or without adjuvant chemotherapy.

Br J Cancer. 2015 Nov 17;113(10):1477-83.

査読有

Yoshida A, Yoshida H, Yoshida M, Mori T, Kobayashi E, Tanzawa Y, Yasugi T, Kawana K, Ishikawa M, Sugiura H, Maeda D, Fukayama M, Kawai A, Hiraoka N, Motoi T.

Myoepithelioma-like Tumors of the Vulvar Region: A Distinctive Group of SMARCB1-deficient Neoplasms.

Am J Surg Pathol. 2015 Aug;39(8):1102-13.

査読有

Uehara Y, Oda K, Ikeda Y, Koso T, Tsuji S, Yamamoto S, Asada K, Sone K, Kurikawa R, Makii C, Hagiwara O, Tanikawa M, Maeda D, Hasegawa K, Nakagawa S, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Fujiwara K, Yano T, Osuga Y, Fujii T, Aburatani H.

Integrated copy number and expression analysis identifies profiles of whole-arm chromosomal alterations and subgroups with favorable outcome in ovarian clear cell carcinomas.

PLoS One. 2015 Jun 4;10(6):e0128066.

査読有

Tsuji T, Satoyoshi R, Aiba N, Kubo T, Yanagihara K, Maeda D, Goto A, Ishikawa K, Yashiro M, Tanaka M.

Agr2 mediates paracrine effects on stromal fibroblasts that promote invasion by gastric signet-ring carcinoma cells.

Cancer Res. 2015 Jan 15;75(2):356-66.

査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

The 105th USCAP annual meeting

March 16, 2016, Seattle, USA.

[Poster presentation]

Akiyama Y, Maeda D.

Is Mast Cell Infiltration Specific to Interstitial Cystitis?

The 105th USCAP annual meeting

March 14, 2016, Seattle, USA.

[Poster presentation]

Maeda D

Expression of Claudin-18, a Novel Gastric Marker, Is Associated with Poor Prognosis in Cervical Adenocarcinoma

The 104th USCAP annual meeting

March 25, 2015, Boston, USA.

[Poster presentation]

Maeda D, Akiyama Y.

Hunner Type (Classic) Interstitial Cystitis Is a Distinct Inflammatory Disorder Characterized By Epithelial Denudation and Pancystitis With Frequent Expansion of Clonal B-Cells

The 104th USCAP annual meeting

March 24, 2015, Boston, USA.

[Poster presentation]

Maeda D

Utility of Claudin-18 and p16

Immunohistochemistry for distinguishing Gastric-Type Adenocarcinoma From Other Subtypes of Cervical Adenocarcinoma

〔図書〕(計 1 件)

「性索間質性腫瘍」 前田大地, 木藤正彦, 癌診療指針のための病理診断プラクティス 「婦人科腫瘍」, p.265-290, 中山書店, 2015.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 大地 (MAEDA, Daichi)  
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：30585500

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：