

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04985

研究課題名(和文) 卵巣漿液性腺癌の卵管起源説に対する実験的検証と発癌分子機構の解析

研究課題名(英文) Experimental analysis of the molecular carcinogenesis of ovarian high grade serous carcinoma originated from fallopian tubes

研究代表者

京 哲 (KYO, SATORU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50272969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣漿液性癌の癌化過程を明らかにするために、その起源と考えられている卵管採の上皮細胞を手術検体から回収し、不死化することに成功した。臨床検体を用いた網羅的な遺伝子変異解析結果から認められる様々な遺伝子異常をmimicするべく上述の不死化細胞に遺伝子導入を行い、最終的にp53遺伝子変異、RAS-ERK経路またはPIK3-AKT経路、c-Myc過剰発現の3つのステップが細胞の造腫瘍性獲得に必須であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To identify the molecular requirements for the carcinogenesis of ovarian high grade serous carcinoma (HGSC), we first propagated primary fimbria epithelial cells, which were obtained, isolated and purified from surgical specimens of fallopian tubes. Next, we introduced cyclin D1/cdk4 as well as hTERT expression vectors into these cells via lentivirus and finally obtained immortal cells with sustaining morphological features of original fimbria cells. Based on the comprehensive gene mutation analysis using clinical samples, we listed up the candidate driver gene mutations in HGSC. Among them, we challenged to mimic these genetic alterations in immortalized fimbria cells. Our result showed that 3 steps; p53 gene mutation, KRAS gene mutation, activation of either RAS-ERK or PIK3-AKT pathway, are required and sufficient for immortalized cells to obtain tumorigenic phenotypes. Knowledge of these molecular steps will be useful to develop novel molecular target therapies for HGSC.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣漿液性癌 発癌分子機構 卵管採

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の起源としては、これまでに表層上皮起源仮説や封入嚢胞仮説が信じられてきた。ところが Kurman らは近年、卵管采起源説を提唱し、これが全世界的に topics となっている。しかしながら臨床の現場では卵管采に異常を認めない卵巣癌症例も数多く経験し、卵管采起源説の真偽についての実験的検証が必要である

### 2. 研究の目的

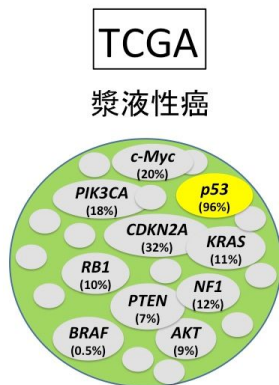
我々はこれまで成功例のない卵管采上皮の不死化細胞を樹立しつつあり、本細胞に

HGSC (high-grade serous carcinoma)

に高頻度に認められる遺伝子異常を mimic する遺伝子操作を駆使することで、in vitro で HGSC に相当する癌細胞を構築出来るか否かを明らかにした上で、卵巣漿液性腺癌の癌化機構を同定することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

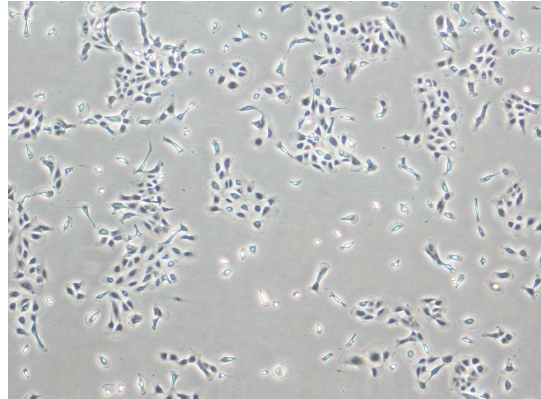
臨床検体から卵管采上皮細胞を分離し、初代培養を行う。Rb 機能を抑制するツールとして Rb シグナルの直上流に位置し、かつ卵巣癌での過剰発現が知られている CyclinD1/CDK4 を用いた。すなわち CyclinD1/CDK4/TERT の過剰発現により premature senescence を乗り越え、不死化細胞を作製できるかどうかを試みた。不死化した細胞に対して、すでに公表されている臨床検体を用いた HGSC の網羅的遺伝子解析結果 (下図に TCGA の data を示す) に基づき、



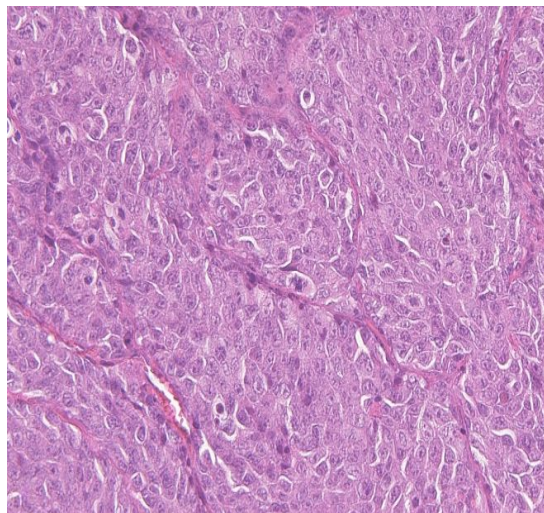
driver gene mutation 候補の遺伝子異常を mimic する遺伝子操作を行い、得られた細胞を免疫不全マウスに接種して造腫瘍能を確認し、さらには病理組織学的検討を加え、漿液性がんの形態を保持しているのかどうかを確認した。また造腫瘍能を持つ遺伝子異常の組み合わせから HGSC の癌化に必須の driver gene mutation を明らかにした。

### 4. 研究成果

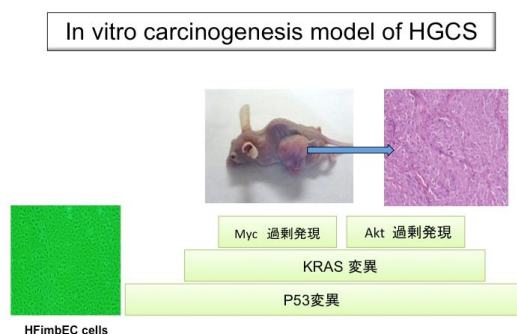
上記の方法で、卵管采上皮細胞の不死化に成功した (下図)。



これらの細胞は cytokeratin 陽性、PAX8 陽性、calretinin 陰性で、上皮性のミューラー管由来であることが証明され、間違いなく卵管采由来であることを確認した。公表されている HGSC の網羅的遺伝子解析結果に基づいた遺伝子導入実験では、p53 遺伝子異常を mimic する dominant negative p53 発現ベクター導入細胞をベースに KRAS 遺伝子変異および AKT 過剰発現または KRAS 遺伝子変異および c-Myc 過剰発現の組み合わせにて造腫瘍能と認め、腫瘍の病理組織学的検討では HGSC に酷似する組織形態を認めた (下図)。



不死化細胞に dominant negative p53 発現ベクターを導入した細胞は、造腫瘍能は持たないものの、p53 不活化細胞の観点からは臨床的には STIC 細胞に匹敵するものと考えられる。**以上のことから、HGSC の癌化には p53 遺伝子変異、RAS-ERK 経路の活性化、PI3-AKT または c-Myc の活性化の 3 step が必要十分な条件であることが明らかとなった。**



## 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 3 件)

1. Reconstitution of high-grade serous ovarian carcinoma from primary fallopian tube secretory epithelial cells.

Nakamura K, Nakayama K, Ishikawa M, Ishikawa M, Sultana R, Kiyono T, Kyo S.  
Oncotarget 9:12609-12619, 2017.

2. The diagnostic utility of PAX8 immunostaining of malignant peritoneal mesothelioma presented as serous ovarian carcinomas: A single center experience of two cases.

Nakamura K, Nakayama K, Nagaoka R, Nishisako K, Ishikawa M, Katagiri H, Sato E, Amano C, Kyo S.  
Oncol Lett 13:263-266, 2017.

3. High-grade serous ovarian cancer 3 years after bilateral salpingectomy: A case report.

Sato E, Nakayama K, Ishikawa M, Nakamura K, Ishibashi T, Kyo S.

Mol Clin Oncol 6:201-203, 2017.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Successful reconstitution of high-grade serous ovarian carcinoma in vivo from primary fallopian tube secretory epithelial cells.

Nakamura K, Nakayama K, Kiyono T, Ishikawa N, Minamoto T, Ishibashi T, Sanuki K, Yamashita H, Sasamori H, Sultana R, Ishikawa M, and Kyo S.

AACR Annual Meeting 2017

April 15th, 2017. Washington DC.

2. Successful reconstitution of high-grade serous ovarian carcinoma in vivo from primary fallopian tube secretory epithelial cells

Nakamura K, Nakayama K, Kiyono T, Sanuki K, Yamashita H, Kyo S.

第 76 回日本癌学会学術総会  
平成 29 年 9 月 28 日 横浜市

〔図書〕(計 0 件)

〔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

京 哲 (KYO, Satoru)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：**50272969**

(2)研究分担者

中山 健太郎 (NAKAYAMA, Kentaro)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：70346401