

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08378

研究課題名(和文)子宮内膜癌、内膜増殖症および類縁疾患の核形状・核クロマチン分布の定量的解析

研究課題名(英文)Quantative analysis of nuclear shape and chromatin distribution in endometrial cancer, hyperplasia and metaplasia

研究代表者

加来 恒壽 (Kaku, Tsunehisa)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：60185717

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)：子宮内膜癌における扁平上皮化生について核異型の有無、程度、出現頻度を検討した。組織標本では扁平上皮化生は58%に出現し、出現群と非出現群での差異は認めなかった。脈管侵襲は組織学的に扁平上皮化生に異型の見られた症例が高度であった。細胞診標本では子宮内膜癌が陽性であった60例の70%の症例で扁平上皮化生が認められたが異型はみられなかった。Hela cellを用いた研究で、0%培地はより多くの二核細胞形成を誘導していることを報告し、栄養改善が行われると、分裂をする能力を回復できるものの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The presence, extent, and frequency of appearance of nuclear atypia of squamous metaplasia in endometrial carcinoma were examined. In tissue specimens, squamous metaplasia appeared at 58%, and no difference was found between appearance group and non-squamous metaplasia group. Histologically, vascular invasion was highly sophisticated in squamous metaplasia. In the cytologic specimen, squamous metaplasia was observed in 70% of 60 cases with endometrial carcinoma positive, but no nuclear atypia was observed. In a study using Hela cell, we reported that it induces more binuclear cell formation in 0% medium. When nutrition improvement was carried out, it was suggested that there was something that could restore the ability to divide.

研究分野：婦人科腫瘍学 臨床病理学

キーワード：子宮内膜癌 子宮内膜過形成 子宮内膜上皮化生 クロマチン分布 扁平上皮化生 二核細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1)子宮内膜癌、内膜増殖症にしばしば並存する各種化生(扁平上皮性、粘液性、好酸性、線毛性、淡明細胞性、ホブネイル細胞性、乳頭状合胞体化生)に注目し、その臨床病理学的意義について研究を継続してきた。

(2) 細胞診断において、悪性細胞の判定は、核の大型化(N/C 比増大を含む)、核クロマチンの増量、核形不整など核に関わる判定項目が多い。しかし、それぞれの項目の背景にある分子生物学的意義については解明されていないため、観察者によって判断が異なる場合があり、診断精度に影響を及ぼしている。一方、二核細胞は、一つの細胞質に2つの核を有する細胞で、判定しやすい細胞である。この二核細胞は本来心臓や肝臓などの正常組織にも出現するが、その出現数は癌で有意に多いことが報告されている。我々は、“正常でも出現するが悪性で増加する二核細胞の性質”を解明し、判定項目に加えることで、細胞診断の精度をあげることが可能であると考え検討を行ってきた。

## 2. 研究の目的

(1) 子宮内膜癌、内膜増殖症、各種化生(扁平上皮性、粘液性、好酸性、線毛性、淡明細胞性、ホブネイル細胞性、乳頭状合胞体化生)について子宮内膜癌、内膜増殖症との並存の頻度、核異型の有無等について検討する。

(2) 2核細胞の出現頻度等を病理学的に定量的および定性的に解析する。また培養細胞で出現する2核細胞は正常でも出現するが、癌でより多く出現する形成のメカニズムと臨床的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)子宮内膜癌、内膜増殖症、各種化生細胞の核形状、核クロマチン分布を定量的に分析した。また異型の有無、程度さらに子宮内膜癌、内膜増殖症の症例における各種化生(扁平上皮性、粘液性、好酸性、線毛性、淡明細胞性、ホブネイル細胞性、乳頭状合胞体化生)の出現頻度、細胞形態、細胞異型の有無について検討した。

(2)HeLa cell(子宮頸部中分化型腺癌)を用い、二核細胞の以下の検討を行った。

### 出現数への血清の影響:

HeLa cell を  $5 \times 10^5$  に調整後、血清を添加した通常培養液(10% medium)と血清を添加しない血清飢餓状態(0% medium)の2つの条件で37、5%CO<sub>2</sub>条件下でカルチャースライドを用いて培養し、二核細胞の出現数を比較した。

### 出現機序:

二核細胞の出現機序には、細胞分裂異常と細胞融合の2通りが考えられるため、生きてまま細胞質に取り込まれると、数世代に渡りその染色性が継続する Cell Tracker という蛍光試薬の赤

と緑を利用した。まず、HeLa cell を二つに分け、それぞれを Cell Tracker の赤と緑で染色する。その後、2色に染色された HeLa cell を同数ずつ1つのデイッシュで培養する。48 時間培養後に固定し、共焦点レーザー顕微鏡で100個の二核細胞の細胞質の染色性を観察した。

### 生存能力(アポトーシス):

生細胞は PE Annexin V・DAPI には染まらない。アポトーシスが始めると、細胞膜内に存在していたホスファチジルセリンが細胞膜外に露出してくる。よって、PE Annexin V・DAPI の染色性によりアポトーシス初期細胞を判定した。HeLa cell の単核細胞を対象に検討した。

### 生存能力(分裂能力):

0% medium に出現する二核細胞の培養環境を改善し、10% medium で更に培養し、タイムラプス顕微鏡で観察し、栄養改善後の二核細胞の転記を観察した。対象は0% medium に出現し栄養改善なしの条件の二核細胞である。

さらに培養細胞を用いて血清を添加した通常培養液(10% medium)と血清を添加しない血清飢餓状態(0% medium)の2つの条件で2核細胞の出現について定量的に解析した。

## 4. 研究成果

(1)子宮内膜癌における形態学的特徴を組織標本および細胞診標本について検討した。特に子宮内膜癌 103 例に見られる扁平上皮への変化について核異型の有無、程度、出現頻度等を検討した。扁平上皮化が 58%で出現し、出現群と非出現群は臨床病理学的に差異を認めなかった。細胞診が陽性の 60 例の 70%の症例が組織診と細胞診双方で扁平上皮化生を認められ異型はみられなかった。残りの 30%の症例は扁平上皮化生かを認められ、異型はみられなかった。扁平上皮化生に異常は見られなかった症例より異型の見られた症例はより高分化な症例であった。また脈管侵襲は扁平上皮化生に異型の見られた症例は異型のみみられなかった症例より高度だった(Toomine Y, Kaku T. Diagnostic Cytopathology 2016; 遠峰、加来. 日本臨床細胞学会 2017)。

(2)基盤的研究として培養細胞では二核細胞に注目して研究を行った。

血清飢餓状態で多くの二核細胞が出現する。HeLa cell において、血清の影響は、濃度より有無が大きく影響することが分かった。つまり、0% medium において、有意に多くの二核細胞が出現することが分かった。また、0% medium, day1 においてより多くの二核細胞が出現した(図1)

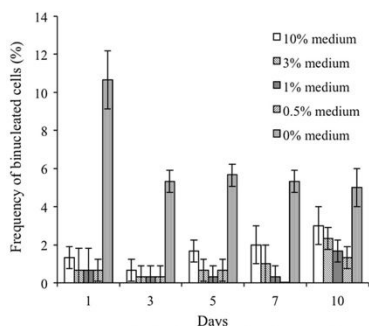


図1 血清濃度と二核細胞出現数  
 ①血清を加えない 0% medium では血清を加えた medium に比較し、有意に多数の二核細胞が出現する ②day1に出現する二核細胞数はday3以降より、有意に多い

Cytotechnology. 2016 Aug; 68(4): 1123–30-

HeLa cell は分裂異常により二核細胞が形成される:

細胞質が赤で染色された二核細胞は 45%、緑で染色された二核細胞は 54%、黄色のものは 1%であった。二核細胞の出現機序が細胞融合であれば、赤と緑の細胞質が融合した黄色の二核細胞の理論的出現率は約 51%となるが、実際には殆ど出現しなかったことから、HeLa cell は分裂異常により二核細胞が形成されることが示唆された。

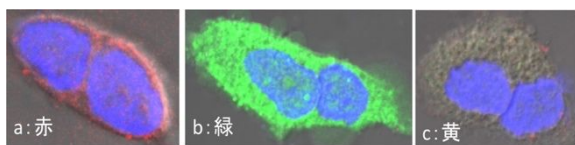


図2 Cell Trackerによる二核細胞の染色性  
 二核細胞100個のCell Tracker試薬の染色性を調べた。その結果、a(赤)45%、b(緑)54%、c(黄)1%であった。

Cytotechnology. 2016 Aug; 68(4): 1123–30

二核細胞はアポトーシス初期細胞の割合が多く出現するが、day3 の 10% medium では顕著にみられる:

単核細胞においては培養日数がたつと生細胞の割合がわずかに減少することは、10% medium でも 0% medium でも同じような傾向であり、あまり差はみられなかった。が、二核細胞においては、単核細胞に比較してアポトーシス初期細胞の割合が多くみられた。また、day3 の 10% medium では 0% medium とは異なり、特に多くのアポトーシス初期細胞が出現することが分かった(図3)。

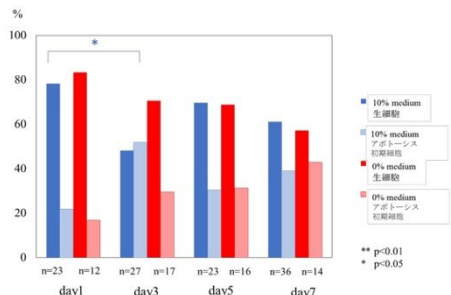


図3 二核細胞の培養日数とアポトーシス初期細胞の関係  
 二核細胞では単核細胞に比較してアポトーシス初期細胞の割合が多くみられたが、day3の10% mediumでは特に多く出現することが分かった。

0% medium, day3 の二核細胞は分裂能力を有する:

0% medium で出現した二核細胞をタイムラプスで観察した。0% medium で 7 日間以上培養すると、殆ど分裂能力は失われていた。栄養改善をしない場合(a~e)に比較し、栄養改善した場合(f~j)では分裂する割合が高く、day3 の二核細胞(g)はday1の二核細胞(f)より分裂能力が高いことが分かった(図4. Cytotechnology. 2016 Aug; 68(4): 1123-30.より転載)。

Culture process (days)				Number of binucleated cells			
Serum-free	Medium improvement	Addition	Total	Mitosis	Apoptosis	No change	Total
<i>Serum-free examination</i>							
a	1	No	2	30 (36.1 %)	51 (61.4 %)	2 (2.4 %)	83
b	3	No	2	5	30 (37.0 %)	43 (53.1 %)	81
c	5	No	2	7	8 (16.3 %)	39 (79.6 %)	49
d	7	No	2	9	1 (9.1 %)	9 (81.8 %)	11
e	10	No	2	12	0 (0 %)	6 (100 %)	6
<i>Medium improvement examination</i>							
f	1	10 % medium	2	3	53 (58.2 %)	37 (40.7 %)	91
g	3	10 % medium	2	5	66 (79.5 %)	15 (18.1 %)	83
h	5	10 % medium	2	7	20 (31.7 %)	30 (47.6 %)	63
i	7	10 % medium	2	9	0 (0 %)	8 (88.9 %)	9
j	10	10 % medium	2	12	0 (0 %)	12 (100 %)	12

図4 二核細胞の転帰

以上より、二核細胞は細胞分裂を制御するタンパクの異常により出現する可能性はあるが、これまでいわれていたように二核細胞形成後アポトーシスをおこして死ぬものばかりではなく、栄養改善が行われると、分裂をする能力を回復できるものの存在が示唆された。さらに day3 において出現する二核細胞は他の培養日数に出現するものとは性質を異にすることが推測され、二核細胞の検討を更にするにより、『癌細胞において二核細胞数が増える』ことの解明に近づくと考えられる。

二核細胞(一つの細胞質に 2 つの核を有する細胞)が正常でも出現するが癌ではより多く出現することが報告されている。二核細胞形成のメカニズムや、その性質について Hela cell を用いて研究し、出現頻度、二核細胞の形成のメカニズムを検討し、0%培地においてより多くの二核細胞形成を誘導していることを報告した (Nishimura K, et al. Cytotechnology 2016, 西村、加来.日本臨床細胞学会 2017)。また我々は、栄養改善が行われると、分裂をする能力を回復できるものが存在することが示唆された (Nishimura K, Watanabe S, Kaku T. et al. Biosci Biotechnol Biochem 2018; 2:1-6)正常でも出現するが悪性で増加する二核細胞の性質を解明し、判定項目に加えることで、細胞診断の精度をあげることが可能であると考え研究を進めている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Nishimura Kazunori, Watanabe Sumiko, Hayashida Ryo, Sugishima Setsuo, Iwasaka Tsuyoshi, Kaku Tsunehisa. Binucleated HeLa cells are formed by cytokinesis failure in starvation and keep the potential of proliferation. Cytotechnology. 査読有、Vol. 68, No.4, 2016, pp. 1123-30.
- 2) Toomine Yukie, Watanabe Sumiko, Sugishima Setsuo, Tamiya Sadaharu, Kobayashi Hiroaki, Sonoda Kenzo, Oda Kato Kiyoko, Kaku Tsunehisa. Binucleated HeLa cells are formed by cytokinesis failure in starvation and keep the potential of proliferation. Diagnostic Cytopathology. 査読有、Vol. 44, No.3, 2016, pp. 187-94.
- 3) Kazunori Nishimura, Sumiko Watanabe, Tsunehisa Kaku, Setsuo Sugishima. Serum starvation induces abnormal spindle location, RhoA delocalization, and extension of intercellular bridge with the midbody. Biosci Biotechnol Biochem. 査読有、Vol. 2, No.1, 2018, pp. 1-6  
DOI: 10.1080/09168451.2018.1443791.

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 加来 恒壽: 卵巣明細胞癌 (病理セミナー)、第 13 回日本婦人科がん会議、2016.
- (2) 加来 恒壽: 子宮ポリープ状異型腺筋腫の臨床病理と細胞診 (要望講演)、第 58 回日本臨床細胞学会春期大会、2017.
- (3) 加来 恒壽: 婦人科腫瘍の組織診と細胞診 (会長講演)、第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会、2017.
- (4) 兼城 英輔、奥川 馨、矢幡 秀昭、園田 顕三、加来 恒壽、加藤 聖子: 絨毛性疾患の病理診断と細胞診 (教育講演)、第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会、2017.
- (5) 田中 亜都子、八尋 裕美子、舟越 乾、加来 恒壽: 若年者における子宮頸がん検診の結果分析について、第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会、2017.
- (6) 園田 顕三、小玉 敬亮、奥川 馨、兼城 英輔、小野山 一郎、安永 昌史、大神 達寛、山口 真一郎、加来 恒壽、加藤 聖子: 子宮平滑筋肉腫の内臓細胞診に関する後方視的検討、第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会、2017.

- (7) 遠峰 由紀恵、渡邊 壽美子、杉島 節夫、園田 顕三、小田 義直、加藤 聖子、加来 恒壽: 子宮内膜癌症例における化生性変化を示す細胞の共存と病理学的特徴との関連性の検討、第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会、2017.
- (8) 平井 絵梨花、渡邊 壽美子、加来 恒壽、岩坂 剛、杉島 節夫: BCG 曝露と pRB の関連性、第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会、2017.
- (9) 鶴留 えりか、渡邊 壽美子、加来 恒壽、岩坂 剛、杉島 節夫: 血清飢餓状態における培養日数と二核細胞の生存能力に関する検討、第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会、2017.
- (10) 近藤 守、渡邊 壽美子、西村 和徳、加来 恒壽、岩坂 剛、杉島 節夫: 培養日数と二核細胞の変化に関する検討、第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会、2017.
- (11) 加来 恒壽: 子宮頸癌の WHO 組織分類 (2014) (特別講演)、第 34 回岩手県臨床細胞学会、2018.

[図書]

(計 0 件)

[産業財産権]

(計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加来 恒壽 (KAKU, Tsunehisa)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 60185717

### (2) 研究分担者

大喜 雅文 (OHOKI, Masafumi)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 10160441

園田 顕三 (KAKU, Kenzo)  
九州大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 30294929

杉島 節夫 (SUGISHIMA, Setsuo)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 50380382

渡邊 壽美子 (WATANABE, Sumiko)  
九州大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号: 90404087