

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 -2008
 課題番号：19591943
 研究課題名（和文）子宮体癌における DNA ミスマッチ修復異常・腫瘍免疫と抗がん剤・ホルモン剤感受性
 研究課題名（英文）Relation between alteration of DNA mismatch repair/tumor immunology and sensitivities of anti-cancer drugs and hormone in endometrial cancer.
 研究代表者
 進 伸幸（SUSUMU NOBUYUKI）
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：90206459

研究成果の概要：初期子宮体癌 113 例に対して妊孕性温存療法の高用量黄体ホルモン（MPA）療法を行った。病変消失率は G1 腺癌で 86.9%、異型増殖症で 95.7%と好成績を示したが、再発率はともに約 50%と高値であった。再発に影響する因子を多変量解析にて検討すると、遺伝性非ポリポーシス大腸癌関連腫瘍の家系内集積性と hMLH1 蛋白発現減弱の 2 項目が高用量 MPA 療法後の再発に対する独立予後因子であることが初めて示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

増加の一途を辿る子宮体癌の発生機序について、エストロゲン持続刺激機序と *p53* など癌抑制遺伝子、*K-ras* 等の癌遺伝子の異常による機序が知られているが、第 3 の機序としてマイクロサテライト不安定性（Microsatellite Instability, MSI）が指摘され始めている。子宮体癌が家族性非腺腫症性大腸癌（HNPCC）関連腫瘍の中で大腸癌に合併する頻度が最も高い癌腫であり、子宮体癌症例では約 30%もの高頻度に MSI 陽性であることより、体癌発症に MSI の関与が考えられるがまだ解明さ

れていない。

そこで我々は、多数例を対象として MSI 解析と臨床病理学的研究を婦人科領域にて多施設共同研究として開始し、子宮体癌における MSI とその原因とされる *hMLH1*、*hMSH2*、*hMSH6* などの DNA ミスマッチ修復（MMR）遺伝子の蛋白発現変化などについての evidence を蓄積し、体癌では大腸癌同様に MSI 解析が家族性内膜癌症例の screening と予後推定において有用であることを確認した。また、DNA 不安定性の発現機序は MMR 遺伝子のメチル化という epigenetic な変化、また遺伝子変異によ

るもので、体癌では大腸癌と異なり、*hMLH1* のメチル化・遺伝子変異、*hMSH6* の遺伝子変異が重要であることを確認した。また子宮体癌細胞株を CDDST 法という抗癌剤感受性検査にて検索し、細胞周期 check point 因子である *CHFR* 遺伝子のメチル化がタキサン高感受性と相関する傾向を認めている。

このようにMSIの原因であるDNAミスマッチ修復遺伝子や細胞周期check point因子である遺伝子の発現調節を行うことで子宮体癌治療における抗癌剤感受性を亢進させ、治療効果の向上に寄与し得る可能性が初めて示された。

また子宮体癌治療のもう一つの柱である内分泌学的治療に関しては、我々は近年多数例の症例を蓄積し、良好な治療成績を上げている。2006年10月の国際婦人科癌会議にて、黄体ホルモン療法後に約50%の症例が子宮内に再発をきたす中で、再発後に黄体ホルモン療法を繰り返し、妊娠出産例を5例経験し若年早期体癌における黄体ホルモン療法の反復投与が安全でかつ有効であることを初めて多数例の症例に基づき報告した。

このように、発症とその病態にMSIが深く関与する子宮体癌という腫瘍に対して、抗癌剤感受性、黄体ホルモン感受性との関連が注目されている。

2. 研究の目的

発症とその病態にMSIが深く関与する子宮体癌という腫瘍に対して、抗癌剤感受性、黄体ホルモン感受性を規定する機序を明らかにし、keyである分子検索を行う。

以下の項目を目的とした研究を行う。

(1)CD8と指標としたcytotoxic lymphocyteの腫瘍内浸潤の程度と、その腫瘍内への遊走に關与するCox (Cyclooxygenase) 2との関連を、MSI症例とMSS症例で比較検索する。また抗がん剤感受性、予後への影響を明らかにする。

(2)当院で治療を行う子宮体癌（異型増殖症または a 期相当 G1 腺癌、黄体ホルモン受容体陽性 G2 腺癌）を対象として妊孕性温存療法として高用量黄体ホルモン（MPA）療法を行い、臨床データを基に、病変消失率、無再発生存率、再発に關与する危険因子の統計学的に解析する。

3. 研究の方法

(1) MSI 検索と抗癌剤、ホルモン感受性
臨床腫瘍材料に対して、正常組織由来の

DNAを必要としないpoly A markerのうち、2p21-22に存在する mononucleotid marker である BAT25、BAT26(Hoang JM *et al.*; Cancer Res 57:300, 1997)、さらに D5S346、D2S123、D17S250 (以上の5種はHNPCCの診断基準に記されている marker である)、*hMSH3*、*hMSH6*、*BAX*、*TGF R*、*MBD4(A)10*、*MBD4(A)6*、*PTENEX7*、*PTENEX8* における marker を用いて、抽出した DNA を ALFred DNA Sequencer にて解析する。対象として、microdissection 法により癌組織部分と正常組織部分を区別して DNA を抽出し、上記 13 種類の marker 部分を PCR 増幅して DNA Sequencer にて解析する。検出し得た marker の 30%以上で MSI を認めたものを MSI +H として評価し判定する。また、術前に経頸管的に採取した内膜細胞診検体（液状検体、ThinPrep 法）より DNA 抽出して組織片同様 MSI を解析し一致した結果が得られるか否か（液状検体の再現性、妥当性）検討する。

MMR 酵素蛋白発現の検索

ミスマッチ修復遺伝子のうち 3 種類の遺伝子 (*hMLH1*、*hMSH2*、*hMSH6*) 産物に対する抗体を用いた免疫組織化学検索にて遺伝子蛋白出現の有無を確認し、不活化の頻度を明らかにする。

抗癌剤感受性検査

手術検体から採取した腫瘍組織の細切片を各種抗剤のいずれかを含むゼラチンフォーム上に静置 3 次元培養を行う (Histoculture Drug Response Assay (HDRA) 法)。殺細胞効果判定には MMT assay を用い、各検体に対する各薬剤の IC50 値を算出し累積有効率曲線を作成し、低感受性群と高感受性群に群別するためのカットオフ値を算出する。

MSI と臨床病理学的因子 (感受性検査を含む) との関連

臨床症例において、上記の諸因子と、組織型、分化度、リンパ節転移、筋層浸潤などの予後因子などとの間にどのような関連があるのか、MSI 情報が癌の個性診断として有用か否かを検討する。

当院にて手術を施行し、倫理委員会で承認され同意を得た進行子宮体癌例を対象とした。ITC1L は抗 CD8 抗体を用いた免疫組織化学にて 5 視野の ITC1L 数/HPF 平均値を算出した。COX-2 は抗 COX-2 抗体を用いた免疫組織化学にて、その発現量を 5 段階の染色 score (0~4) に判別した。MSI は HNPCC で用いられる 5 marker を PCR にて検索し陽性 marker が 30%以上/未満のものに分類した。腫瘍浸潤リンパ球 (TIL): CD4、CD8 による免疫組織化学にて TIL の腫瘍周辺への homing を検索し、MSI 症例において腫瘍部位にて局所的腫瘍免疫反応が働いているか否かを検索する。

Cox-2 高発現例での TIL 数の抑制が認められるか否か検討する。

CD8 陽性 TIL 浸潤腫瘍病巣に Apoptosis が惹起されているか否かについて、TIA-1 抗原 (免疫組織化学) と Tunnel 法にて確認する。

(2) 妊孕性温存 MPA 療法

当院で治療を施行する子宮体癌 (異型増殖症または a 期相当 G1 腺癌、黄体ホルモン受容体陽性 G2 腺癌) を対象として妊孕性温存療法として高用量黄体ホルモン (MPA) 療法 (MPA600mg/d、4-6 ヶ月) を行い、臨床データを基に、病変消失率、無再発生存率、再発に關与する危険因子の統計学的に解析する。

各組織型別の MPA の奏効率を検討する。

2 年時の子宮内病変再発率を検討する。

核異型の有無の判定に 1p、17p の癌抑制遺伝子存在領域とそれぞれのセントロメア領域の DNA probe の組み合わせによる 2 色 FISH 法が純形態学的判定によらない客観的判定 (genetic/chromosomal instability を示す癌細胞の残存の有無の判定) に有用であることが確認されている (Int J Gynecol Cancer 2005) ので、MPA 治療前、治療中、治療後の液状内膜細胞診を 2 色 FISH 法と MSI 検索を比較検討し、黄体ホルモン療法の奏効性の予測が可能か否か検討する。

MPA 反復治療回数別の妊娠率を検討する。

G2 腺癌の治療成績を検討する。

治療中に MPA 不応性または進行した症例で子宮全摘に至った症例に対して、病理学的に病変の分布を確認し、子宮外病変 (転移・重複癌) の頻度を明かにする。

4. 研究成果

(1) MSI と腫瘍免疫

ITCIL 数が 20 以上であるものが 20 未満のものとは有意に OS において予後良好であった ($p=0.0275$)。

COX-2 score が 2 以上であるものが 1 以下のものとは有意に OS・DFS において予後不良であった ($p=0.0009$ ・ $p=0.0044$)。

ITCIL 数と COX-2 score の間には有意な負の相関があった ($p=0.0052$)。

MSI 陽性群と陰性群との間に予後の差は認められなかった。

MSI 陽性群の ITCIL 数は陰性群と比べ有意に高かった ($p=0.016$)。

再発の独立因子として分化度・腹水細胞診陽性・COX-2 score 2 以上が抽出された ($p=0.007$)。

原癌死の独立因子として腹水細胞診陽性・ITCIL 数 20 未満 ($p=0.026$) が抽出された (学会発表)。

(2) MSI と体癌細胞の特性、特に黄体ホルモン感受性を規定する分子の検索を行うため、当科にて子宮体癌 113 例 (異型増殖症 47 例、a 期相当 G1 腺癌 62 例、G2 腺癌 4 例) を対象として妊孕性温存療法として高用量黄体ホルモン (MPA) 療法を行い、臨床データを基に、病変消失率、無再発生存率、再発に關与する危険因子の統計学的に解析した。

病変消失率は異型増殖症で 95.7%、G1 腺癌で 86.9%、と好成績を示した

再発率はそれぞれ 50%、48% と高値であった。

MPA 治療終了時 FISH 異常所見持続例では早期に子宮内に再発しやすい傾向が認められ ($p=0.062$) FISH 異常所見持続の有無が残存病変の有無の判定に役立つ可能性が示唆された。1p、17p の特定ゲノム領域の数的・構造的異常の残存の有無は、MPA 治療終了時期の決定に有用であるとともに再発の指標ともなり得る可能性が示唆された (学会発表)。

MPA 療法後妊娠例は 21 例に認められ、既婚者例では 44% が妊娠に至った。子宮内再発後の反復 MPA 治療後においても 8 例の妊娠例が認められ、反復治療の有用性が強く示唆された。

MPA 治療中に 2 例が子宮内病変が進行し (1 例が異型増殖症から G1 腺癌へ、1 例が G1 から G3 腺癌へ)、子宮外病変が出現した例は 7 例 (3 例は転移、4 例は卵巣癌、腹膜癌の重複癌) に認められ、特に子宮内膜症合併例 (卵巣内膜症性嚢胞内の卵巣癌重複発生 2 例と骨盤腔内膜症病変における腺癌発生 2 例) では、内膜症病変の癌化が原因と考えられた。子宮外病変が MPA 治療例の 6.2% に認められたことが 100 例以上に及ぶ症例検討において初めて報告された (学会発表)。

G2 腺癌に対する MPA 療法の結果、4 例とも病変は一旦消失したが、病変消失に要した日数は 390 日であり、G1 例の 112 日、異型増殖症例の 59 日に比較して有意に延長しており、また、再発までの日数も有意に短縮していることが初めて確認された (投稿準備中)。

MSI と体癌細胞の特性、特に黄体ホルモン感受性を規定する分子の検索を行うため、当科にて子宮体癌 87 例 (0 期相当と a 期相当 G1 腺癌) を対象として妊孕性温存療法として高用量黄体ホルモン療法を行った臨床データを基に、病変消失率、無再発生存率、再発に關与する危険因子の統計学的に解析した。病変消失率は G1 腺癌で 88.4%、異型増殖症で 97.1% と好成績を示したが、再発率はそれぞれ 50.0%、47.8% と高値であった。治療後再発に影響する因子について、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、DNA ミスマッチ修復酵素蛋白発現も含めて検討したところ、単変量解析にて月経不正周期、多嚢

胞性卵巣の他、近親2度以内のhereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) 関連腫瘍の家系内集積性(以下癌家族歴)、hMLH1 蛋白発現減弱の4項目であり、progesteron 受容体発現の有無は再発因子としての関与が認められなかった。多変量解析において癌家族歴(HR=3.428, P=0.003)とhMLH1 蛋白発現減弱(HR=7.576, P=0.002)の2項目が高用量MPA療法後の再発に対する独立予後因子として抽出された。これらは、我々、また諸家によって報告されているマイクロサテライト不安定性に関与する因子であり、腫瘍免疫が黄体ホルモン感受性にも関与している可能性が臨床的データから初めて示唆された(学会発表)。

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 11件)

(英文7、和文4)

Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Kawaguchi M, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D.

Endometrial cancer as a familial tumor: Pathology and molecular carcinogenesis (Review)

Curr Genomics, 2009;10(2): 1-6.

Kawaguchi M, Yanokura M, Banno K, Kobayashi Y, Kuwabara Y, Kobayashi M, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. Analysis of a correlation between the BRAF V600E mutation and abnormal DNA mismatch repair in patients with sporadic endometrial cancer.

Int J Oncol, 2009, in press

山上 亘、進 伸幸、津田浩史、藤井多久磨、青木大輔

婦人科がんの妊孕性温存手術 - 開腹手術 -

産婦人科の実際・2009 ;58(3):291-296

Susumu N, Sagae S, Udagawa Y. Reply to Michael H.R. Eichbaum et al.

“Adjuvant treatment of early-stage endometrial cancer: Which patient can benefit from chemotherapy?”

Gynecol Oncol, 2008 Jun; 109(3):434-436

Susumu N, Sagae S, Udagawa Y, Niwa K, Kuramoto H, Satoh S, Kudo R; Japanese Gynecologic Oncology Group.

Randomized phase III trial of pelvic radiotherapy versus cisplatin-based combined chemotherapy in patients with intermediate- and high-risk endometrial cancer: a Japanese Gynecologic Oncology Group study.

Gynecol Oncol. 2008 Jan;108(1):226-233.

進 伸幸、平沢 晃、阪埜浩司、藤井多久磨、青木大輔

子宮がん患者へのインフォームドコンセント(IC)

臨床腫瘍プラクティス・2008 ;4(4):313-319

青木大輔、進 伸幸、野村弘行

子宮体癌の術後化学療法 - タキサンとプラチナの併用に関する新たなエビデンスの構築を目指して -

産婦人科の実際・2008 ;57(13):2129-2134

Banno K, Yanokura M, Kawaguchi M, Kuwabara Y, Akiyoshi J, Kobayashi Y, Iwata T, Hirasawa A, Fujii T, Susumu N, Tsukazaki K, Aoki D.

Epigenetic inactivation of the CHFR gene in cervical cancer contributes to sensitivity to taxanes.

Int J Oncol. 2007 Oct;31(4):713-720.

Yamagami W, Banno K, Kawaguchi M, Yanokura M, Kuwabara Y, Hirao N, Susumu N, Tsukazaki K, Aoki D.

Use of the collagen gel droplet embedded drug sensitivity test to determine drug sensitivity against ovarian mature cystic teratoma with malignant transformation to adenocarcinoma: a case report.

Chemotherapy. 2007;53(2):137-141.

Yanokura M, Banno K, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, Susumu N, Tsukazaki K, Aoki D.

Relationship of aberrant DNA hypermethylation of CHFR with sensitivity to taxanes in endometrial cancer.

Oncol Rep. 2007 Jan;17(1):41-48.

阪埜浩司、進 伸幸、矢野倉恵、平沢 晃、塚崎克己、青木大輔、三木義男、野澤志朗
家系内癌集積性を有する子宮体癌症例におけるMMR遺伝子の生殖細胞変異解析
家族性腫瘍 2007;7(1)

〔学会発表〕(計 18件)
(国際学会5、国内学会13)

市川義一、進 伸幸、末盛友浩、野村弘行、片岡史夫、平沢 晃、富永英一郎、津田浩史、阪埜浩司、青木大輔
再発子宮体癌治療における白金製剤反復投与の意義と platinum free interval に関する検討
第 46 回 日本癌治療学会総会
2008/10/30 名古屋

鶴田智彦、井本逸勢、平沢 晃、小崎健一、阪埜浩司、進 伸幸、青木大輔
エピジェネティック異常により発現抑制される子宮体がん関連がん遺伝子の MPA 療法による役割
第 67 回 日本癌学会学術総会
2008/10/29 名古屋

Susumu N, Hirasawa A, Ichikawa Y, Suemori T, Kobayashi Y, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E, Suzuki A, Tsuda H, Banno K, Aoki D.
Outcome of fertility preserving MPA therapy for young patients with atypical endometrial hyperplasia complex or different grades of endometrial cancer. The XIth International Gynecologic Cancer Society
2008/10/27 Bangkok, Thailand

Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Kuwabara Y, Susumu N, Tsukazaki K, Aoki D.
The XIth International Gynecologic Cancer Society
Association between expression of aurora a and anticancer drug sensitivity in endometrial cancer.
2008/10/26 Bangkok, Thailand

進 伸幸、平沢 晃、阪埜浩司、青木大輔
子宮内膜癌の発ガンメカニズム：オーバービュー
第 40 回 日本臨床分子形態学会
2008/10/3 福岡

阪埜浩司、矢野倉恵、小林佑介、秋好順子、桑原佳子、平沢 晃、進 伸幸、塚崎克己、青木大輔
M期チェックポイントCHFR遺伝子siRNAによる子宮癌細胞の抗癌剤感受性の変化
第7回 日本婦人科がん分子標的研究会
2008/7/18 名古屋

秋好順子、進 伸幸、小林佑介、市川義

一、末盛友浩、野村弘行、片岡史夫、平沢晃、鈴木 淳、阪埜浩司、青木大輔、吉村泰典
若年子宮体癌類内膜癌 G2 症例 4 例の妊よう性温存黄体ホルモン療法
第 115 回 日本産科婦人科学会 関東連合地方部会総会・学術集会
2008/6/15 東京

進 伸幸、市川義一、末盛友浩、山上 亘、野村弘行、片岡史夫、平沢 晃、富永英一郎、阪埜浩司、鈴木淳、青木大輔、吉村泰典
若年子宮体癌の高用量黄体ホルモン療法の治療終了時期判定に有用な2色FISH法
第 60 回 日本産科婦人科学会
2008/4/14 横浜

小林佑介、阪埜浩司、矢野倉恵、秋好順子、樋野牧子、桑原佳子、進 伸幸、塚崎克己、青木大輔、吉村泰典
子宮体癌における分裂期キナーゼ Aurora A の発現と抗癌剤感受性との関連
第 60 回 日本産科婦人科学会
2008/4/14 横浜

Suemori T, Susumu N, Tsuruta T, Ichikawa Y, Nomura H, Kataoka F, Hirasawa A, Tominaga E, Banno K, Suzuki A, Daisuke A.
Cyclooxygenase-2 expression and intra-tumor cell infiltrating CD8-positive lymphocytes (ITCIL) are associated with recurrence and prognosis in advanced endometrial cancer.
International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology
2007/10/30 Berlin, Germany

Ichikawa Y, Susumu N, Tsuruta T, Nomura H, Kataoka F, Hirasawa A, Tominaga E, Banno K, Suzuki A, Daisuke A.
Analysis of Prognostic risk factors among patients with early endometrial cancer after fertility-preserving high-dose MPA (Medroxy-Progesterone acetate) therapy.
International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology
2007/10/30 Berlin, Germany

市川義一、進 伸幸、鶴田智彦、末盛友浩、野村弘行、片岡史夫、平沢 晃、富永英一郎、阪埜浩司、鈴木 淳、青木大輔
子宮体癌における高用量 MPA 療法の効果

と再発危険因子の解析
第 45 回日本癌治療学会総会
2007/10/25 京都

Yanokura M, Banno K, Susumu N,
Kuwabara Y, Hirasawa A, Tsukazaki K,
Aoki D.

Expression of a mitotic kinase,
aurora-a, affects taxane sensitivity
in endometrial cancer.
AOCOG(Asian and Oceanic Congress of
Obstetrics and Gynaecology)
2007/9/22 Tokyo, Japan

鶴田智彦、進 伸幸、市川義一、野
村弘行、平沢 晃、玉田 裕、富永英一
郎、阪埜浩司、鈴木 淳、青木大輔
再発子宮癌における腫瘍マーカー測定
の意義に関する検討
第 42 回日本婦人科腫瘍学会学術集会
2007/6/29 東京

阪埜浩司、進 伸幸、平沢 晃、山上
巨、矢野倉恵、菅野康吉、三木善男、青木
大輔
家族性腫瘍としての子宮体癌—その病
態と臨床的特徴について
第 13 回日本家族性腫瘍学会学術集会
2007/6/15 高知

進 伸幸、市川義一、末盛友浩、野村弘行、
平沢 晃、玉田 裕、阪埜浩司、鈴木 淳、塚
崎克己、青木大輔、吉村泰典
子宮体癌における妊孕性温存高用量 MPA 療法の
予後解析
第 59 回日本産科婦人科学会総会・学術講演
会 2007/4/16 京都

末盛友浩、進 伸幸、矢野倉恵、市川義
一、野村弘行、平沢 晃、玉田 裕、阪埜浩
司、鈴木 淳、塚崎克己、青木大輔、吉村泰
典
COX-2 発現量および CD8 陽性リンパ球数が進
行期子宮体癌の予後に与える影響
第 59 回日本産科婦人科学会総会・学術講演
会 京都 2007/4/15

阪埜浩司、矢野倉恵、進 伸幸、桑原佳
子、平沢 晃、塚崎克己、菅野康吉、青木大
輔、吉村泰典
マイクロサテライト不安定性(MSI)陽性子宮
体癌におけるフレームシフト変異標的遺伝
子の解析
第 59 回日本産科婦人科学会総会・学術講演
会 京都 2007/4/16

〔図書〕(計 2 件)

進 伸幸、片岡史夫、平沢 晃、阪埜
浩司、青木大輔

子宮内膜病変診断法としての2色FISH法
の治療への応用 - 若年子宮体癌に対
する妊孕性温存療法治療終了時期判定

-
第 33 回組織細胞化学講習会 組織細胞化学
2008 日本組織細胞化学編 中西印刷
京都 2008:177-186

進 伸幸、市川義一、末盛友浩、平沢 晃、
阪埜浩司、青木大輔

進行・再発子宮体癌の標的病变に対する
プロゲステロン療法
婦人科がん標準化学療法の実際 金原
出版 東京 2008:74-79

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

進 伸幸 (SUSUMU NOBUYUKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 90206459

(2) 研究分担者

阪埜 浩司 (BANNO KOUJI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 70265875

(3) 連携研究者

平沢 晃 (HIRASAWA AKIRA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 90296658

菅野康吉 (SUGANO KOKICHI)
栃木県立がんセンター研究所・室長
研究者番号: 00171124