

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18666

研究課題名（和文）p53とFoxp4発現を指標とした子宮体部類内膜癌の新しい術前悪性度診断法の開発

研究課題名（英文）Preoperative assessment with expression of p53 and Foxp4 of malignancy for endometrial cancer of uterine corpus

研究代表者

折坂 俊介 (Orisaka, Shunsuke)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：20724173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：子宮体部類内膜癌のリンパ節転移・術後再発症例において、手術検体の免疫組織染色ではp53およびFoxp4が陽性となることが確認された。そのため、これらの発現様式が治療方針の決定に有効と考えられたことから、術前の病理学的診断のために採取した子宮内膜組織のp53およびFoxp4発現について検討を行った。

結果、術前の内膜組織と手術検体のp53とFoxp4の免疫組織染色結果が一致しない症例が確認され、手術検体と術前検体の差異について実験を行ったが、手術検体と術前検体は同様の結果にはならなかった。したがって、術前検体のFoxp4の発現から治療方針を検討することは困難であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜癌症例のリンパ節転移・術後再発症例にp53およびFoxp4の発現が認められ、これらのパラメーターが術前診断に応用できれば、悪性度の術前評価精度を向上させる新しい検査法を提案できると考えられた。しかし、今回の結果では術前採取した内膜組織と手術検体のp53とFoxp4の免疫組織染色結果が一致しない症例が確認され、手術検体と術前検体は同様の結果にはならなかった。したがって、今回の結果からは新しい検査法を提案できないが、p53およびFoxp4発現がリンパ節転移・術後再発に関与している可能性はあるため今後更なる検討を行っていく必要がある。

研究成果の概要（英文）：We showed the expression of p53 and Foxp4 by immunohistochemistry of tissue sample in patients with regional lymph node metastasis and/or postoperative disease recurrence who had undergone hysterectomy as a primary surgical therapy for endometrial cancer. Therefore, immunohistochemistry outcome of p53 and Foxp4 may be useful parameter of the therapeutic principle. We performed immunohistochemistry for expression of p53 and Foxp4 by the endometrial biopsy tissues for diagnosis.

There were the cases which the surgical specimen and the biopsy tissues did not match with immunohistochemistry for expression of p53 and Foxp4. We investigated the difference of them.

Although many tissue samples were experimented about the difference between the surgical specimen and the biopsy tissues, it did not match.

Therefore, it was difficult to preoperative assessment of the therapeutic principle from immunohistochemistry for expression of p53 and Foxp4 by biopsy tissue.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：p53 Foxp4 子宮体部類内膜癌 リンパ節転移 再発

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌の治療は、画像診断にて腹腔外遠隔転移を認める症例を除き、手術にて子宮および両側付属器の摘出を基本として、症例に応じて所属リンパ節(骨盤内±傍大動脈リンパ節)の郭清をすることが標準的な初期治療として確立されている。リンパ節郭清術は正確な手術進行期の決定そして追加治療の方針決定に重要な術式であり、術前に画像診断および病理組織学的診断から臨床的に悪性度が高いと判断された症例では骨盤内に加えて傍大動脈リンパ節までの郭清が必要となるが、低リスクの症例では骨盤内のみのリンパ節郭清あるいはリンパ節郭清自体が省略可能とされている。日常の臨床現場では術前に低リスクと判定される症例が最も多いが、原発病変部の進行程度に比して、しばしば予想に反するリンパ節転移や術後再発をきたしてくる症例が存在しており臨床的に問題となっているが、このような症例を的確に同定するパラメーターはない。

また、これまでに子宮体部類内膜癌の悪性度を規定する因子として p53 遺伝子変異が報告されている。そこで後方視的に子宮体部類内膜癌手術検体における p53 の免疫染色性および遺伝子変異と臨床データとの関連をあらためて解析したところ、p53 が癌細胞の 10-50% しか染色されない通常 p53 陰性と判定される群(Low-positive と定義)において、遺伝子変異はわずか 15%程度であったものの、p53 過剰発現群(High-positive と定義)と同様の頻度でリンパ節転移・術後再発が確認された。以上から遺伝子変異以外の因子として「p53 蛋白の代謝カスケードの異常がもたらす意義を再評価する必要がある」との発想に至った。p53 蛋白の代謝カスケードに関係する可能性のある Estrogen receptor b(ERb)の発現を免疫染色学的に観察して同様の検討をおこなったところ、リンパ節転移・術後再発群はすべて ERb を高発現しており、悪性度と高い相関を示した(Obata *et al.*, *PLoS One*, 2017)。しかしながら、患者のほとんどは閉経後に発症しており、子宮体部類内膜癌はエストロゲン依存性悪性腫瘍と考えられているものの、類内膜癌の増悪化をエストロゲン依存機構で説明するのは疑問の余地がある。そこで ERb に並行して発現が変化する因子を探索する目的で、抗 ERb 抗体に交差反応する可能性のある候補分子群について追加検索したところ、転写因子の一つである Foxp4 に着目することとなった。

これまでの検討で手術検体において Foxp4 高発現している子宮体部類内膜癌症例ではリンパ節転移や術後再発が多い傾向にあり、再発病変においても p53 とともに Foxp4 発現が上昇していることを確認している。

## 2. 研究の目的

本研究は、術前診断のために採取した子宮内膜検体における p53 および Foxp4 の免疫組織学的発現に焦点をあて、子宮体部類内膜癌の進行を予測できるかどうかを検証し、子宮体部類内膜癌の悪性度に関する術前評価の精度向上を目指す。

## 3. 研究の方法

後方視的に過去 10 年間の子宮体部類内膜癌症例(約 250 例)について術前に採取した子宮内膜組織のホルマリン標本から p53 および Foxp4 の発現を免疫組織学的に観察し、臨床データと照らし合わせて p53 および Foxp4 発現とリンパ節転移・術後再発群との関係について解析する。これまで手術検体において p53 の免疫組織学的発現とリンパ節転移・術後再発との関連を報告してきた。また現在同じく手術標本に Foxp4 発現を検討し、Foxp4 発現とリンパ節転移・術後再発との正の関係を観察し、p53 および Foxp4 発現の共陽性症例の 70%以上でリンパ節転移・術後再発をきたしていたことを見出している。そこで本研究ではこれらの情報に基づき、子宮内膜の術前生検検体における p53 および Foxp4 発現を、どのような方法と基準で陽性(染色強度または陽性細胞)と評価すれば、術後標本および術後経過の臨床情報と正の相関性を得ることができるのか、についても検討する。次いで前方視的に、術前の子宮内膜生検で十分量の癌組織が採取された症例において通常の病理提出用(ホルマリン固定、パラフィン包埋)とは別に凍結切片用(4%パラホルムアルデヒド固定)および DNA および RNA 抽出用の組織を採取し、これを凍結保存する。一方で手術標本においても病変部組織から同様の採取・保存を行う。術前と手術標本から DNA を抽出し、TP53 遺伝子の exons 5~8 変異の解析を行う。一方で同じく RNA を抽出して Foxp4 mRNA の発現量を qPCR 法で解析する。また凍結切片を作成し、p53 蛋白と Foxp4 蛋白の組織発現様式を検索し、パラフィン切片からそれと比較検討する。これらの解析結果とリンパ節転移・術後再発などの臨床データを分析して、p53 および Foxp4 発現などのパラメーターを術前診断に導入することがリンパ節転移や遠隔転移のリスク評価にすると有効であることを前方視的に確認するとともに、その陽性評価において最適方法について検討し、新しい診断方法として提案する。

## 4. 研究成果

過去の子宮体部類内膜癌症例について、術前に採取した子宮内膜組織のホルマリン標本を用いて Foxp4 の免疫組織染色を施行したところ、手術標本時と同様のプロトコールで行ったにも関わらず Foxp4 の免疫組織染色結果が一致しない症例が確認された（手術検体では高発現が認められたが、術前に採取した標本では発現が認められない）。抗体の濃度等プロトコールを変更しながら、Foxp4 の発現を確認したが手術検体と術前検体で免疫組織染色結果が一致しなかった。そのため、他の症例でも免疫組織染色を用いて術前検体での Foxp4 の発現を評価したが、一致しない症例が認められた。

加えて正常子宮内膜での検討も行ったが、正常子宮内膜でも Foxp4 の発現を認めた。これは、術前の子宮内膜組織は子宮内膜搔爬により得た組織であり、内膜癌組織に加えて正常子宮内膜も含んでいる。そのため癌組織のみを Focus できる手術検体とは異なり、術前検体では Foxp4 陽性の判断が非常に困難であった。

今回の手法では、術前検体と手術検体が Foxp4 発現が異なる症例が存在することから、術前検体を用いた免疫組織染色の結果では子宮体部類内膜癌の悪性度を術前に評価することは困難であると考えられた。また、術前検体では正常子宮内膜が癌組織とプレパラート上に存在することから、これらも Foxp4 の発現を評価する上で大きな課題となった。これらの点を踏まえて、新たな手法を加えて引き続き検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------