

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462595

研究課題名(和文) 遺伝子変異情報をバイオマーカーとした子宮体癌非侵襲的鑑別診断法の開発

研究課題名(英文) Establishment of non-invasive cancer screening for endometrial cancer

研究代表者

中村 圭一郎 (Nakamura, Keiichiro)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90359886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は1)ミスマッチ修復機構の異常を検出する指標であるマイクロサテライト不安定性検査(microsatellite instability; MSI; BAT26, NR27, NR21, CAT25), 2) 腫瘍組織のMLH1, MSH2, MSH6, PMS2に対する免疫組織化学的検討(immunohistochemistry; IHC), 3) PCRを用いてのMLH1 promoter CpG islandの解析を行い, 新規子宮体癌リンチ症候群(LS)スクリーニングの一助となる技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：We developed a new Lynch syndrome screening strategy for endometrial cancer by detection of 1)MSI using a panel of 4 mononucleotide microsatellite markers (BAT26, NR21, NR27, and CAT25) 2) protein expression for MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 using immunohistochemical (IHC) staining, and 3) MLH1 promoter CpG island using PCR.

研究分野：婦人科

キーワード：子宮体癌 LS MSI MMR

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国において子宮体癌罹患数は増加の一途をたどっており、この10年で約2倍に増加し、それに伴い、死亡数も著しい増加を示している。進行癌や組織型 (Type II) が予後に大きく関与していることはわかっているが、しかしながら発癌のリスクとしては排卵障害によるプロゲステロン効果の喪失、プロゲステロン非存在下での脂肪組織のエストロゲン合成によるエストロゲン暴露、インスリン抵抗性による高インスリン血症などエストロゲン高発現が発癌に関与しているなどが知られている。最近、子宮体癌発生の5%が遺伝的素因によると言われており、その大半は Lynch 症候群 (遺伝性非ポリポーシス大腸癌; HNPCC) であり、その原因遺伝子は DNA ミスマッチ修復蛋白複合体を構成する DNA ミスマッチ修復蛋白をコードしている4つの遺伝子 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) の生殖細胞変異であることが分かっている。一般集団に比較して、Lynch 症候群の患者は、子宮体癌の発症リスクが高く、女性では生涯リスクが子宮体癌に 40~60% であると言われている。

2. 研究の目的

The Cancer Genome Atlas (TCGA) による総合的ゲノム解析結果からは4つのサブタイプ (POLE mutation を基盤とする ultramutated type, MLH1 methylation を基盤とする MSI 陽性 hypermutated type, Copy-number low を特徴とする endometrioid type, Copy-number high を特徴とする serous-like type) に分類された。

臨床病理学的特徴と遺伝子変異の照合を行い、遺伝子変異情報を基盤とした子宮体癌に対する Precision Medicine を推進してきた。しかしながら総合的ゲノム解析結果からわか

るように遺伝子変異情報だけによって構成される Precision Medicine には限界があり、Precision Medicine からより細やかな Personalized Medicine へ繋ぐためには、遺伝子変異だけでなく Epigenetic 変異も加味する必要があり、そこで本研究は諸問題を解決するために、Genetic/Epigenetic 変異といった遺伝子変異情報解析を詳細に行うことを目的に研究を行った。

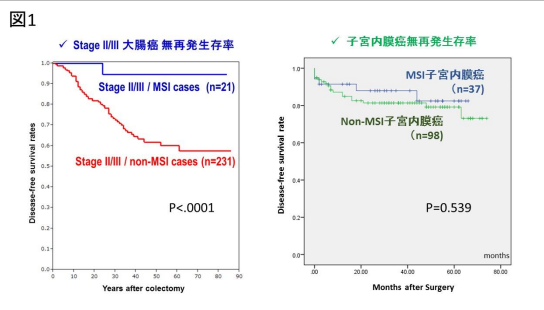
3. 研究の方法

子宮体癌のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を準備し、DNA を抽出 (DEXPAT, Takara→エタノール沈殿による精製) を行い、FFPE 腫瘍組織の MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 に対する IHC, MSI test を適宜検討した。MSI test は NCI 推奨のマーカーパネルが適応ではあるが、MSI の判定のためには腫瘍部分の DNA だけでなく正常部分の DNA も reference に必要である。これは dinucleotide repeat をマーカーに用いているためである。我々はその煩雑な判定を簡便にするために Mononucleotide marker だけを用いて腫瘍 DNA のみで判定する方法論を採用した。研究分担者である永坂らは、この方法論を改良したやり方を導入し、検討した。研究ではその方法論をさらに改良した4 mononucleotide marker (BAT26, NR21, NR27, CAT25) を用いて、MSI の判定を行い、その精確性を IHC と比較検討を行った。PCR も用いて、MLH1 methylation についても検討した。また我々は RAS/RAF/ERK signal cascade の抑制機能を持つ RASFF2 遺伝子や Wnt signal cascade の抑制機能を持つ SFRP2 遺伝子、UNC5C, EFEMP1 遺伝子の Epigenetic な解析も行った。

4. 研究成果

子宮内膜癌と大腸癌を対象にした総合的ゲノム

特性解析結果が The Cancer Genome Atlas (TCGA) から各々発表され、この2つの癌腫のゲノム特性解析結果は似ていることが示された(The Cancer Genome Atlas Research Network. Nature. 2012 & 2013)。子宮内膜癌と大腸癌は Lynch 症候群関連腫瘍でもあり、その発癌経路の相同性は以前から示唆されている。我々は以前より、子宮内膜癌が Lynch 症候群関連腫瘍であることに着目し、子宮内膜癌に対する遺伝子変異解析を鋭意進めてきた。Lynch 症候群の原因としてのミスマッチ修復タンパク (mismatch repair protein, MMR) の欠損により引き起こされるマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) の検出と MMR (MLH1/MSH2/MSH6/PMS2) 発現の免疫組織化学的検討 (immunohistochemistry, IHC) を行った。解析可能であった子宮内膜癌 135 例中 37 例 (27%) で MSI を認めており、37 例中 MLH1/PMS2 陰性は 21 例 (60%)、MSH2/MSH6 陰性は 7 例 (20%)、MSH6 単独陰性は 6 例 (17%)、PMS2 単独陰性は 1 例 (3%)、全て陽性は 2 例 (5%) であった。MLH1/PMS2 陰性例は MLH1 欠損が原因であり、21 例中 18 例 (86%) には何らかの MLH1 methylation を認め、大腸癌で示されているように sporadic MSI 子宮内膜癌の可能性が示唆された。その一方で、(MSH2 欠損を原因とする) MSH2/MSH6 陰性 7 例、MSH6 陰性 6 例、PMS2 陰性 1 例、これに MLH1 methylation を認めなかった 3 例を加えた 17 例 (135 症例中の 13%、MMR 欠損子宮内膜癌 35 例中の 49%) は Lynch 症候群の可能性がある。MSI 癌の頻度自体は TCGA からの報告も子宮内膜癌の 40% に認めるとされ、大腸癌よりも明らかに多い傾向を認めている。もちろん、差異も存在する。例えば大腸癌においては、治癒切除施行された MSI 大腸癌は予後良好であり、BRAF 変異癌は予後不良である。ところが、我々の解析では、MSI 子宮内膜癌は予後良好な傾向は認めず (図 1)、



BRAF 変異を確認することはできなかった。このように子宮体癌と大腸癌の2癌種間には差異を認めた。

今回の結果より子宮体癌において、MSI は全体では 27.4% と大腸癌よりも高率である傾向が認められ、MSI 陽性の 94.6% に MMR deficiency を認め、MMR deficiency の 49% (全体の 13%) は LS が内包されている可能性が考えられ、子宮体癌において LS のスクリーニングを行うことは癌予防や生存率向上の観点から重要であることが認められた。

また現在は Genetic な研究だけでなく、プロモーター領域の CpG アイランドに生じる異常メチル化の Epigenetic 変異についても研究を行っている。

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 6 件)

1. Omichi C, Nakamura K, Haraga J, Masuyama H, Hiramatsu Y; Glasgow prognostic score is an independent marker for poor prognosis with all cases of epithelial ovarian cancer. Cancer Med. 2016 Mar 1. doi: 10.1002/cam4.681. (査読有)
2. Nakamura K, Nishida T, Haruma T, Haraga J, Omichi C, Ogawa C, Kusumoto T, Seki N, Masuyama H, Hiramatsu Y; Pretreatment platelet-lymphocyte ratio is an independent predictor of cervical cancer recurrence following concurrent chemoradiation

- therapy. *Mol Clin Oncol.* 2015 3:1001-1006, 2015. (査読有)
3. Nishida T, Nakamura K, Haraga J, Ogawa C, Kusumoto T, Seki N, Masuyama H, Katayama N, Kanazawa S, Hiramatsu Y; The Glasgow Prognostic Score Determined During Concurrent Chemoradiotherapy Is an Independent Predictor of Survival for Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 25:1306-14, 2015. (査読有)
 4. Haruma T, Nakamura K, Nishida T, Ogawa C, Kusumoto T, Seki N, Hiramatsu Y; Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is a predictor of prognosis in endometrial cancer. *Anticancer Res* 35:337-43, 2015. (査読有)
 5. Nakamura K, Joja I, Nagasaka T, Haruma T, Hiramatsu Y; Maximum standardized lymph node uptake value could be an important predictor of recurrence and survival in patients with cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*173:77-82, 2014. (査読有)
 6. Nakamura K, Kajitani S, Joja I, Haruma T, Fukushima C, Kusumoto T, Seki N, Hiramatsu Y; The posttreatment mean apparent diffusion coefficient of primary tumor is superior to pretreatment ADCmean of primary tumor as a predictor of prognosis with cervical cancer. *Cancer Med.* 2(4):519-25, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

中村圭一郎、西田傑、春間朋子、小川千加子、楠本知行、関典子、増山寿、平松祐司;子宮頸癌再発の platelet lymphocyte ratio(PLR)は予後予測に有効である 第 67 回日本産科婦人科学会 平成 27 年 4 月 10 日 パシフィコ横浜
 春間朋子、永坂岳司、中村圭一郎、原賀

順子、西田傑、小川千加子、楠本知行、関典子、平松祐司;子宮体癌における MSI および MMR deficiency の頻度・相関とその臨床像、第 53 回日本癌治療学会学術集会 平成 27 年 10 月 29 日 国立京都国際会館

西田傑、中村圭一郎、春間朋子、小川千加子、楠本知行、関典子、増山寿、平松祐司;子宮頸癌化学放射線治療後の予後の検討、第 52 回日本癌治療学会学術集会 平成 26 年 8 月 29 日 パシフィコ横浜
 春間朋子、中村圭一郎、小川千加子、楠本知行、関典子、平松祐司;治療前末梢血好中球リンパ球比高値は子宮体癌の予後不良因子である、第 66 回日本産科婦人科学会 平成 26 年 4 月 20 日 東京国際フォーラム

中村圭一郎、春間朋子、小川千加子、楠本知行、関典子、平松祐司;好中球/リンパ球は再発卵巣癌患者の PS も加味できる予後予測マーカーとなりうる、第 66 回日本産科婦人科学会 平成 26 年 4 月 20 日 東京国際フォーラム

中村圭一郎、春間朋子、福島千加子、楠本知行、関典子、平松祐司;Palliative Prognostic Index(PPI)は婦人科癌患者の予後指数になりうる、第 51 回日本癌治療学会学術集会 平成 25 年 10 月 25 日 国立京都国際会館

西條昌之、中村圭一郎、春間朋子、福島千加子、楠本知行、関典子、平松祐司;子宮頸癌リンパ節転移における PET/CT・MRI 拡散強調画像の検討、第 14 回 JSAWI シンポジウム 平成 25 年 9 月 6 日 淡路夢舞台国際会議場

春間朋子、中村圭一郎、西條昌之、福島千加子、楠本知行、関典子、平松祐司;子宮頸癌扁平上皮癌治療後の ADCmean と予後についての検討、第 14 回 JSAWI シンポジウム 平成 25 年 9 月 6 日 淡路夢

舞台国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 圭一郎 (NAKAMURA KEIICHIRO)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90359886

(2)研究分担者

永坂 岳司 (NAGASAKA TAKESHI)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30452569

榎田 祐三 (UNEDA YUZOU)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10573735

須野 学 (SUNO MANABU)

岡山大学・医療教育統合開発センター

・准教授

研究者番号：20621189

平松 祐司 (HIRAMATSU YUJI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80218817