

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860274

研究課題名(和文) 腺管分離による上皮性卵巣癌の純粹分離癌腺管の分子病理学的解析

研究課題名(英文) Molecular pathological analysis of pure tumor glands using the crypt isolation method in epithelial ovarian carcinomas

研究代表者

永沢 崇幸 (Nagasawa, Takayuki)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：10453309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：腺管分離法を用いて卵巣癌における遺伝子解析を行った。間質組織を除いた卵巣癌腺管の分子異常をloss of heterozygosity (LOH)、microsatellite instability (MSI)、DNA methylationに基づいて解析しその関連を検討した。卵巣癌53例(境界悪性腫瘍を含む)を対象とした。複数領域に高頻度にLOHを認めたが、一方でMSIの頻度は低かった。メチル化は比較的早期の異常でありLOHが後期の異常であることが示唆された。卵巣腫瘍の組織型や進行期によって、それぞれ遺伝子異常に特徴があり、組織型ごとに治療法を個別化する必要性が改めて示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed molecular abnormalities of pure tumor glands using the crypt isolation method in 53 ovarian cancer (including the borderline malignancy). We investigated the relation of molecular abnormalities among the LOH, MSI, and DNA methylation. Although LOH were admitted in high frequency at any regions, the frequency of MSI was rare. It was suggested that Methylation is related to early stage carcinoma and LOH is related to advanced stage. Ovarian cancer has its own genetic abnormality characterized by the histological type and the progression stage, we might should consider of Individualization of treatment.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 遺伝子解析 腺管分離

1. 研究開始当初の背景

本邦の卵巢癌患者は徐々に増加しており、他の婦人科癌(子宮頸癌、子宮体癌)と比較しても死亡数はかなり多い。卵巢癌に対する化学療法の奏効率は70%と高いが、進行癌の平均無病生存期間は16~22か月と短く、また平均生存期間は2~4年とされ、いまだ予後不良の疾患である。近年、悪性腫瘍、とりわけ卵巢癌においても、新たな遺伝子異常の報告や分子標的治療薬の導入の試みなどが進行しており、正確な遺伝子異常の評価はより重要になっている。

卵巢癌は形態的多様性(組織型、分化度)を示す癌であり、その進展過程では多くの分子異常を蓄積していると推測される。これまで卵巢癌において多くの遺伝子異常が報告されているが、その頻度は一定していない。この理由の一つとして、これまでの報告では間質を含んだ検体を用いているため、本来癌組織とは関係のない間質成分により腫瘍細胞数が希釈され、正確な評価がなされていない可能性が考えられる。遺伝子解析の精度を上げるためには、腫瘍組織のみでの解析の必要性が挙げられる。腺管分離法は腺管のみを間質から除外する方法で、癌における解析では純粋な癌腺管のみの解析が可能になり、より精度の高い遺伝子解析が可能になる。腺管分離法の分子解析への有用性については、これまで消化管や子宮内膜癌で報告してきたが、卵巢癌における報告は皆無である。

2. 研究の目的

卵巢癌の発生、進展には種々の遺伝子異常が関与しているが、癌の発生には chromosomal instability (CIN)、microsatellite instability (MIN、MSI)、CIMP (CpG island methylation phenotype) の3つの異常が密接に関連していることが指摘されている。CINは染色体レベルの異常で、aneuploidy や種々の loss of heterozygosity (LOH)、p53 変異な

どの遺伝子の障害がみられることが特徴的とされている。一方 MIN はマイクロサテライト領域の異常で、DNA ploidy は diploidy を示し、CIN にみられるような遺伝子異常は一般的にみられない。CIMP はゲノムワイドにメチル化が起こり、種々の遺伝子の発現を抑制することにより発癌に関与している。これらの異常は大腸癌を中心に明らかにされてきており、卵巢癌でも関連していることが指摘されている。しかしながら、これら3タイプの異常における相互の関連性はほとんど明らかにされていない。また、上皮性卵巢癌でも、その組織型により有する遺伝子異常は異なるとされており、より詳細な解析が望まれている。腺管分離法を用いて上皮性卵巢癌(境界悪性病変も含む)の純粋な癌腺管における CIN、MIN、CIMP について解析を行い、これら3タイプの異常の相互の関連性について明らかにすること、またその分子学的異常の形態と予後との関連を検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

< 1 > 腺管分離法

腺管分離は Nakamura らの方法に従って行う^{6,7)}。卵巢癌新鮮手術標本より新鮮腫瘍組織片を採取する。組織片を剃刀で2 mm 程度に細切れにし、それらを30 mmol/L の ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) を含む CMF Hanks 溶液 (calcium- and magnesium-free Hank's balanced salt solution) 20ml に入れ、37 °C で30分間加温振盪する。1,600 回転で5分間遠心分離し、分離腺管と残った間質を含んだ組織片を沈降させ、上澄みを捨てる。次に CMF Hanks 溶液を20ml 加え、室温で40分間振盪後、同様に遠心分離を行い上澄みを捨てる。70%エタノールをよく攪拌しながら加えて固定する。実体顕微鏡 (SZ60; Olympus, Tokyo, Japan) 下に固定された腺管を観察選別し、癌腺管群を回収して4 °C で冷蔵保存する。

< 2 > サンプル作製

当科において手術を施行した上皮性卵巣癌症例で、十分な説明の上で同意を得られたものを対象とする。卵巣境界悪性腫瘍、卵巣癌 53 例を対象とした。新鮮手術材料より腫瘍組織を採取し、上述の腺管分離法を用いて癌腺管を単離する。次に DNA を抽出するためのサンプル(腺管分離による DNA 抽出用サンプル)と、組織標本作製用のサンプルの二群に分けて回収する。前者は癌腺管を 10 個以上まとめて回収し、腫瘍腺管サンプルとする。後者は分離腺管の形態解析のため、パラフィン包埋して Hematoxylin & Eosin(H&E)染色標本を作成し、純粋な癌腺管であることを確認する。正常サンプルは対側卵巣または末梢静脈血より採取し、DNA を抽出する。対側卵巣に関しては組織標本を作製し、正常卵巣組織である事を確認する。

< 3 > 遺伝子解析

1) loss of heterozygosity(LOH)解析

卵巣癌より得られた癌腺管および正常コントロールから抽出した DNA サンプルにおいて、癌抑制遺伝子が位置する各領域 1p(ARID1A), 3p(FHIT, MLH1), 5q(APC), 10q(PTEN), 13q(Rb), 17p(p53), 17q(BRCA1), 18q(DCC)の LOH 解析を、各種のマイクロサテライトマーカーを用いて、PCR-LOH 法により解析する。プライマーの塩基配列は Sugai らの報告に従い、以前にデータベースより得たものを利用する。

polymerase chain reaction(PCR)の反応液は、50-100ng の DNA を鋳型とし、プライマー 25pmol、及び Ampli Tag Gold PCR Master Mix(Applied Biosystems, CA, USA)を用いて全量 25 μ l に調製する。PCR は thermal cycler system 9700(Applied Biosystems)を用い、94 30 秒、55-58 30 秒、72 30 秒を 25-30 サイクル行い、最後に 72 で 10 分間反応させ増幅する。PCR 増幅サンプルに 3 μ l ホ

ルムアミドと 0.5 μ l TAMRA 500 size standard(Applied Biosystems)を加え、310 Gnetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いてフラグメント解析を行う。

癌腺管サンプルにおける各領域の評価は、2 つの対立遺伝子の面積比(q-value)をもとに、以下の式により算出する。

$$qLOH = \frac{T1:T2}{N1:N2} \text{ or } \frac{N1:N2}{T1:T2} (0.00 < q\text{-value} < 1.00)$$

N = normal sample

T = tumor sample

$N1$ 、 $T1$ は 2 つのアレルのピーク面積の一方を、 $N2$ 、 $T2$ はもう一方の面積を表す。各領域の allelic imbalance(AI)の評価を行い、正常サンプルとの比較において 50% 以上の変化を示したもの(q-value 0.5)を allelic imbalance(AI)と判定する。同一染色体領域内で少なくとも 1 つのマーカーに allelic imbalance(AI)を認めた場合、その染色体領域における LOH 陽性と見なす。

2) メチル化解析

分離腺管サンプルを用いて、10 種類の遺伝子(HOXA10, HOXA11, p16, MLH-1, OPCML, SFRP1, RASSF1A, RASSF2A, DKK-1, HPP1)のプロモーター領域を対象に、combined bisulfite restriction analysis(COBRA)法を用いて DNA メチル化の解析を行う。

3) microsatellite

instability(MSI)解析

MSI 解析は各種マイクロサテライトマーカーにおいて、一つでも MSI パターンを示す症例に対して高感度マーカーである BAT25、BAT26 を用いて同様のフラグメント解析を行う。癌腺管サンプルにおいて、正常サンプルにはないピークを認めるものを MSI と評価する。

上記の解析を行い、症例ごとに臨床病理学的

項目（年齢、組織型、分化度等）と分離癌腺管の分子異常との関連、臨床経過との関連を解析する。

4．研究成果

卵巣癌に対しても腺管分離を応用することが可能であった。組織型、分化度により程度の差はあるが、概ね良好な純粋癌腺管を分離することができ、それらからの DNA 抽出も可能であった。LOH 解析では、17p (*p53*)、13q (*Rb*)、18q (*DCC*) に高頻度に LOH を認め、これらの遺伝子の不可逆性の異常が卵巣癌において重要な役割をはたしている可能性が考えられた。一方、*MLH1* の 3p 領域の LOH は少なく、卵巣癌との関連性は低いと推測される。またメチル化解析では複数の領域、特に *HOXA11* のメチル化を高率に認めた。これまでも *HOX* 遺伝子の異常が婦人科癌の発生に関与していることが報告されているが、本研究からも卵巣癌における *HOX* 遺伝子の異常、特に *HOXA11*、*HOXA10* のメチル化が卵巣癌の発生・分化に大きな影響を与えているものと推測される。今後も *HOX* 遺伝子のさらなる解析が必要と思われる。

遺伝子タイプと組織型、進行期との比較においては、高メチル化型が境界悪性腫瘍にも多く出現しているのに対し、高 LOH 型は境界悪性腫瘍には少なく、浸潤癌で比較的多く認められた。また初期（ / 期）の卵巣癌では高メチル化-低 LOH 型が多く、進行癌（ / 期）で高 LOH 型が多い傾向があった。このことから遺伝子のメチル化が比較的早期の異常であり LOH が後期の異常である事が推測され、LOH が癌の浸潤に強く関与している可能性が考えられた。この事は初期の段階での epigenetic な異常の蓄積が恒久的な遺伝子異常をもたらす可能性を示唆している。

卵巣腫瘍の組織型や進行期によって、それぞれ遺伝子異常に特徴があることが考えられ、組織型ごとに治療法を個別化する必要性が改めて示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
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

永沢 崇幸 (Nagasawa, Takayuki)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：10453309

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：