

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10707

研究課題名(和文) ミュラー管由来類内膜腺癌の分子生物学的特徴解明と発生起源鑑別法の確立

研究課題名(英文) Clarification of molecular biological feature of Mullerian endometrioid adenocarcinoma and establishment of differentiation of its origin

研究代表者

山口 雅幸 (YAMAGUCHI, Masayuki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：20529771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体部類内膜癌73例、子宮体部漿液性癌12例、卵巣類内膜癌20例、卵巣漿液性癌243例のマイクロアレイデータ解析を行い、卵巣類内膜癌関連遺伝子135個、子宮体部における類内膜癌関連遺伝子102個を抽出した。卵巣および子宮体部の類内膜癌特異的遺伝子発現プロファイルを比較検討し、TCGAデータベースを用いて再現性評価を行った後、Single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA)により、卵巣類内膜癌と子宮体部類内膜癌との間でPI3K-AKT pathwayの活性化の程度に違いがあることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Microarray analyses were performed between uterine corpus endometrioid adenocarcinoma group (n=73), uterine corpus serous adenocarcinoma group (n=12), ovarian endometrioid adenocarcinoma group (n=20), and ovarian serous adenocarcinoma group (n=243). Consequently, 135 genes associated with ovarian endometrioid adenocarcinoma and 102 genes associated with uterine corpus endometrioid adenocarcinoma were extracted. We compared gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinoma with that of uterine corpus endometrioid adenocarcinoma and validated reproducibility using TCGA database. Finally, difference in degree of PI3K-AKT pathway activation between ovarian endometrioid adenocarcinoma and uterine corpus endometrioid adenocarcinoma was revealed with single sample gene set enrichment analysis.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：ミュラー管由来類内膜腺癌 類内膜癌関連遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

ミューラー管由来の臓器である子宮(体部・頸部) 卵管、卵巣には臓器によって漿液性癌、類内膜癌、粘液性癌、明細胞癌の4つの組織型のがんが発生する。特に、類内膜癌は子宮体部と卵巣に同時に見つかることが多く、卵巣癌の10%、子宮体癌の5%にあたるとの報告がある。類内膜癌が子宮体部と卵巣に同時に存在する場合、いずれかの癌の他方への転移の可能性だけでなく、同時多発発生の場合がある可能性があり、転移性癌と同時多発発生にあたる重複癌では臨床的取り扱いやその予後が異なるが、子宮体部原発類内膜癌と卵巣原発類内膜癌は病理学的には同様の形態を示すため、これらの鑑別は臨床の場において極めて重要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、卵巣由来類内膜癌と子宮体部類内膜癌の類似性・相違点、卵巣子宮内膜症と卵巣類内膜癌の類似性(相違点)を網羅的に明らかにし、以上の結果の臨床応用として類内膜癌が子宮体部と卵巣に同時に存在する場合の origin の決定法の確立を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子発現プロファイルを用いた卵巣原発類内膜癌と子宮体部原発類内膜癌の類似性・相違点の検討

Gene Expression Omnibus (GEO) より、卵巣類内膜癌と卵巣漿液性癌症例(GSE9891)と子宮体部類内膜癌と子宮体部漿液性癌(GSE17025)のCELファイルをダウンロード後、The Cancer Genome Atlas (TCGA) で用いられている normalization method を行った。まず、卵巣類内膜癌と漿液性癌を比較し、卵巣における類内膜癌関連遺伝子発現プロファイルを抽出した。同様に、子宮体部類内膜癌と子宮体部漿液性癌を比較し、子宮体部における類内膜癌関連遺伝子発現プロファイルを抽出した。卵巣および子宮体部の類内膜癌特異的遺伝子発現プロファイルを比較検討し、類内膜癌共通発現遺伝子、卵巣類内膜癌特異的発現遺伝子、子宮体部類内膜癌特異的発現遺伝子の候補を同定した。

得られた類内膜癌共通発現遺伝子、卵巣類内膜癌特異的発現遺伝子、子宮体部類内膜癌特異的発現遺伝子について TCGA に登録されている子宮体部類内膜癌・漿液性癌症例の RNA sequencing data を用いて、類内膜癌との関連性の検証を行った。さらに、Reverse Phase Protein Array (RPPA) data を用いて、類内膜癌関連遺伝子のタンパク質発現パターンとの関連性を評価した。

#### (2) 遺伝子変異プロファイルを用いた卵巣原発類内膜癌と子宮体部原発類内膜癌の類似性・相違点の検討

卵巣原発類内膜癌 39 症例について、腫瘍

組織及び正常組織から DNA を採取し、ターゲットシーケンスを行い、卵巣原発類内膜癌の遺伝子変異プロファイルを同定した。類内膜癌の診断については、婦人科病理専門医に診断を依頼し、卵巣原発類内膜癌であることを確定した。TCGA に登録されている子宮体部類内膜癌・漿液性癌症例の Whole Exome Sequencing Data を用いて、子宮体部類内膜癌・漿液性癌症例における遺伝子変異プロファイルを同定し、卵巣類内膜癌の遺伝子変異プロファイルとの比較を行った。

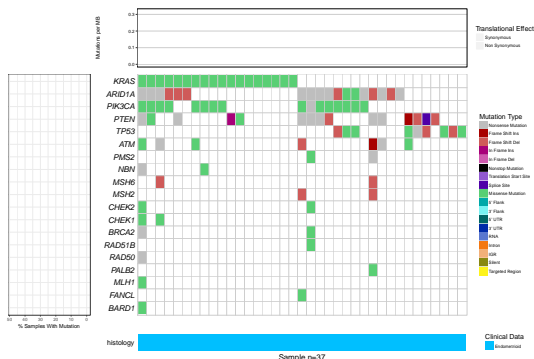
### 4. 研究成果

(1) 子宮体部類内膜癌 73 例、子宮体部漿液性癌 12 例、卵巣類内膜癌 20 例、卵巣漿液性癌 243 例のマイクロアレイデータ解析を行った。卵巣類内膜癌と卵巣漿液性癌症例の遺伝子発現プロファイルを比較し、Volcano plot (Fold change >1.5; adjusted p-value < 0.05) により、卵巣類内膜癌関連遺伝子 135 個を抽出した。同様に、子宮体部類内膜癌と子宮体部漿液性癌を比較し、子宮体部における類内膜癌関連遺伝子 102 個を抽出した。卵巣および子宮体部の類内膜癌特異的遺伝子発現プロファイルを比較検討し、類内膜癌共通発現遺伝子、卵巣類内膜癌特異的発現遺伝子、子宮体部類内膜癌特異的発現遺伝子を同定した。

類内膜癌共通発現遺伝子、卵巣類内膜癌特異的発現遺伝子、子宮体部類内膜癌特異的発現遺伝子の再現性を評価するために TCGA に登録されている子宮体癌 545 症例の RNA sequencing expression data を用いて、その組織型との関連性を評価し、90%以上の遺伝子が Discovery dataset と同様の発現パターンを示した。さらに、TCGA に登録されている RPPA expression data 440 症例において、類内膜癌関連遺伝子群とタンパク質発現パターンとの関連性を評価し、タンパク質発現レベルでも mRNA レベルと同様の発現傾向を示した。Single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) により、卵巣類内膜癌と子宮体部類内膜癌との間で PI3K-AKT pathway の活性化の程度に違いがあることが明らかになった。

(2) 卵巣原発類内膜癌 39 症例において KRAS 遺伝子変異 18 例 (46.2%)、ARID1A 遺伝子変異が 18 例 (46.2%)、PIK3CA 遺伝子変異が 16 例 (41.0%)、PTEN 遺伝子変異 13 例 (33.3%)、TP53 遺伝子変異 9 例 (23.1%) であり、上記5つの遺伝子の体細胞変異を持たない症例はわずか2症例 (5.1%) のみであった。TCGA に登録されている子宮体癌の遺伝子変異プロファイルを再解析した結果、子宮体部原発類内膜癌では KRAS 遺伝子変異 91 例 (22.8%)、ARID1A 遺伝子変異が 210 例 (52.6%)、PIK3CA 遺伝子変異が 202 例 (50.6%)、PTEN 遺伝子変異 310 例 (77.7%)、TP53 遺伝子変異 83 例 (23.8%)

であり、上記5つの癌関連遺伝子の変異プロファイルは、卵巣原発と子宮原発で違うこと



が明らかになった。

図 1. 卵巣原発類内膜癌の遺伝子変異プロファイル

卵巣原発類内膜癌は子宮内膜症との関連が知られていることから、子宮内膜症上皮をレーザーマイクロダイセクション法で選択的に抽出し、ターゲットシーケンスを行った結果、30%の症例で少なくとも PIK3CA 遺伝子・KRAS 遺伝子変異を高頻度に認めることが明らかになった。卵巣原発と子宮体部原発の類内膜癌における KRAS 遺伝子変異の頻度の違いは、卵巣原発類内膜癌の発生活動として子宮内膜症が強く関与していることを示唆する所見であった。

## 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 12 件)

1) Yoshihara K, Ishiguro T, Chihara M, Shima E, Adachi S, Isobe M, Haino K, Yamaguchi M, Sekine M, Kashima K, Takakuwa K, Nishikawa N, Enomoto T. The Safety and Effectiveness of Abdominal Radical Trachelectomy for Early-Stage Cervical Cancer During Pregnancy. *Int J Gynecol Cancer*. 2018; 28: 782-787

2) Tamura R, Yoshihara K, Saito T, Ishimura R, Martínez-Ledesma JE, Xin H, Ishiguro T, Mori Y, Yamawaki K, Suda K, Sato S, Itamochi H, Motoyama T, Aoki Y, Okuda S, Casingal CR, Nakaoka H, Inoue I, Verhaak RGW, Komatsu M, Enomoto T. Novel therapeutic strategy for cervical cancer harboring *FGFR3-TACC3* fusions. *Oncogenesis*. 2018; 7: 4

3) Omoto T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Orimo A, Ohnishi K, Yoshihara K, Miyauchi A, Li S, Gao L, Umemoto T, Tanaka J, Nakahara K, Takeya M, Ishida F, Kudo SE, Haraguchi S, Miyazaki T,

Miyazaki A. The impact of stromal Hic-5 on the tumorigenesis of colorectal cancer through lysyl oxidase induction and stromal remodeling. *Oncogene*. Epub 2017 Dec 15.

4) Hu X, Wang Q, Tang M, Barthel F, Amin S, Yoshihara K, Lang FM, Martínez-Ledesma E, Lee SH, Zheng S, Verhaak RGW. TumorFusions: an integrative resource for cancer-associated transcript fusions. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46: D1144-D1149

5) Yamawaki T, Ishiguro T, Mori Y, Yoshihara K, Suda K, Tamura R, Yamaguchi M, Sekine M, Kashima K, Higuchi M, Fujii M, Okamoto K, Enomoto T. Sox2-dependent inhibition of p21 is associated with poor prognosis of endometrial cancer. *Cancer Sci*. 2017; 108: 632-640

6) Yamaguchi M, Sekine M, Kudo R, Adachi S, Ueda Y, Miyagi E, Hara M, Hanley SJB, Enomoto T. *Papillomavirus Res*. 2018; 6: 6-10.

7) Ueda Y, Yagi A, Nakayama T, Hirai K, Ikeda S, Sekine M, Miyagi E, Enomoto T. Dynamic changes in Japan's prevalence of abnormal findings in cervical cervical cytology depending on birth year. *Sci Rep*. 2018; 8: 5612.

8) Sekine M, Kobayashi Y, Tabata T, Sudo T, Nishimura R, Matsuo K, Grubbs BH, Enomoto T, Ikeda T. Malignancy during pregnancy in Japan: an exceptional opportunity for early diagnosis. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2018; 18: 50

9) Arai M, Yokoyama S, Watanabe C, Yoshida R, Kita M, Okawa M, Sakurai A, Sekine M, Yotsumoto J, Nomura H, Akama Y, Inuzuka M, Nomizu T, Enomoto T, Nakamura S. *J Hum Genet*. 2018; 63: 447-457.

10) Egawa-Takata T, Ueda Y, Morimoto A, Tanaka Y, Yagi A, Terai Y, Ohmichi M, Ichimura T, Sumi T, Murata H, Okada H, Nakai H, Mandai M, Matsuzaki S, Kobayashi E, Yoshino K, Kimura T, Saito J, Hori Y, Morii E, Nakayama T, Asai-Sato M, Miyagi E, Sekine M, Enomoto T, Horikoshi Y, Takagi T, Shimura K. Motivating Mothers to Recommend Their 20-Year-Old Daughters Receive Cervical Cancer Screening: A Randomized Study. *J*

*Epidemiol.* 2018; 28: 156-160.

11) Yagi A, Ueda Y, Egawa-Takata T, Tanaka Y, Nakae R, Morimoto A, Terai Y, Ohmichi M, Ichimura T, Sumi T, Murata H, Okada H, Nakai H, Mandai M, Matsuzaki S, Kobayashi E, Yoshino K, Kimura T, Saito J, Hori Y, Morii E, Nakayama T, Suzuki Y, Motoki Y, Sukegawa A, Asai-Sato M, Miyagi E, Yamaguchi M, Kudo R, Adachi S, Sekine M, Enomoto T, Horikoshi Y, Takagi T, Shimura K. Realistic fear of cervical cancer risk in Japan depending on birth year. *Hum Vaccin Immunother.* 2017; 13: 1700-1704.

12) Itamochi H, Oishi T, Oumi N, Takeuchi S, Yoshihara K, Mikami M, Yaegashi N, Terao Y, Takehara K, Ushijima K, Watari H, Aoki D, Kimura T, Nakamura T, Yokoyama Y, Kigawa J, Sugiyama T. Whole-genome sequencing revealed novel prognostic biomarkers and promising targets for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2017; 117: 717-724.

Kodama M, Kodama T, Newberg JY, Katayama H, Kobayashi M, Hanash SM, Yoshihara K, Wei Z, Tien JC, Rangel R, Hashimoto K, Mabuchi S, Sawada K, Kimura T, Copeland NG, Jenkins NA. In vivo loss-of-function screens identify KPNB1 as a new druggable oncogene in epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114: E7301-E7310

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

山口 雅幸 (YAMAGUCHI, Masayuki)  
新潟大学, 医歯学総合病院, 講師  
研究者番号: 20529771

### (2)研究分担者

吉原 弘祐 (YOSHIHARA, Kosuke)  
新潟大学, 医歯学系, 助教  
研究者番号: 40547535

関根 正幸 (SEKINE, Masayuki)  
新潟大学, 医歯学系, 准教授  
研究者番号: 70345502

榎本 隆之 (ENOMOTO, Takayuki)  
新潟大学, 医歯学系, 教授  
研究者番号: 90283754

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし