

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11155

研究課題名(和文) 卵管上皮細胞を起源とする卵巢癌発癌機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of ovarian cancer carcinogenesis from fallopian tube epithelial cells

研究代表者

赤羽 智子 (Akahane, Tomoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40398699

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)：卵巢癌は早期発見が困難で予後が悪い。しかしながら、骨盤外進展のない症例の5年生存率は9割を超えていることから早期発見は非常に重要である。近年、卵巢癌は卵巢以外の細胞からも癌化する説が提唱されている。そこで卵巢癌早期発見には発癌由来細胞への早期の対処を行うことが必要であると考え本研究にて次の成果を得た。卵巢癌例の液状細胞検体より卵巢癌本体と同様のTP53変異を検出した。卵巢癌疑いの悪性腹膜中皮腫症例より採取された腹水から細胞株の樹立に成功した。樹立された細胞株は蛋白発現解析や薬剤感受性試験および次世代シーケンサー解析などのデータの詳細な解析を行い悪性腹膜中皮腫由来であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巢は腹腔内に存在し検診対象臓器ではないことから癌の早期発見や対処が難しい。卵巢癌由来の細胞に起こった遺伝子レベルの変化を卵巢以外の部位から採取された液状細胞検体等の比較的簡便に採取可能な検体から検出できたことによる本研究内で得られた成果は、癌早期発見や再発予測を可能とする手技として有用であると考えられる。また、悪性腹膜中皮腫は腫瘍発症メカニズムや化学療法薬剤等の解明がまだ課題である。しかしながら過去のアスベスト暴露歴との関連から、今後本邦では悪性中皮腫罹患例が増加傾向にあるとされ病態解明は急務である。樹立細胞は病態解明のための基礎的研究を実施するうえで貴重な生物資源となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer has a poor prognosis. However, in cases where cancer does not progress outside the pelvis, the 5-year survival rate exceeds 90%. Thus, early detection is important for improving prognosis. Recent studies have suggested that ovarian cancer can also be caused by canceration from cells other than those of the ovaries. Therefore, it was thought that the early detection of ovarian cancer was in the early treatment of cells considered to be carcinogenic, leading to this study and achieving the following results.

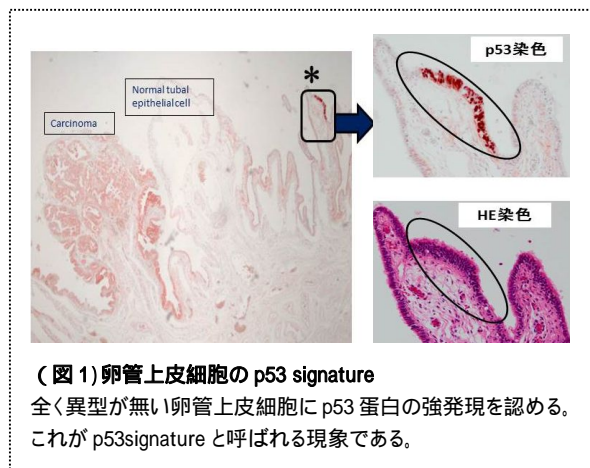
1. TP53 mutation, the same as in ovarian cancer, was detected from a liquid cell sample collected.
2. In the process of establishing ovarian cancer cell lines, we succeeded in establishing cell lines from ascites collected from malignant peritoneal mesothelioma cases. The cell lines were found to be derived from a malignant peritoneal mesothelioma through the detailed analysis of protein expression, drug sensitivity testing, and next generation sequencing.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巢癌

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は卵巣が腹腔内に存在することや、発癌時の自覚症状が近隣他臓器の癌と類似するため早期発見が困難とされている。そのため70%が進行期で見つかり、5年生存率は約30%と婦人科腫瘍のうちで最も難治性である。しかしながら、癌が骨盤内にとどまった状態であるFIGO分類 Ⅰ期の状態で発見された症例の5年生存率は9割を超えていることより、卵巣癌既発症者の生存率を上昇させるためには早期発見が最も大事な対処法であることはいうまでもない。近年の研究において、卵巣癌は卵巣上皮が直接癌化するのではなく、他部位由来の細胞が癌化する説が提唱されている。その例として卵巣明細胞癌および卵巣類内膜癌は卵巣異所性子宮内膜症からの発癌が1925年より現在まで指摘されている(Sampson *Arch Surg* 1925)。また、卵巣漿液性癌のうち、特に高度漿液性癌High-grade serous carcinoma (以下HGSC)は卵管上皮に発生した細胞形態学的に異型の無い細胞に現れるp53過剰蛋白発現細胞(p53signature 図1)がserous tubal intraepithelial carcinoma(STIC)と呼ばれる上皮内癌へと変化し、STICが卵巣へ移行し増殖することで卵巣から発癌したかのように見るとされている(Kurman et al. *Human Pathology*. 2011)。この発癌機構は遺伝性乳癌卵巣癌の原因遺伝子であるBRCA1または2(以下BRCA1/2)の生殖細胞変異保持者にて、卵巣癌未発症者に卵巣癌一次予防的処置として推奨されており、卵巣およびその付属器を切除する施行術であるRisk Reducing bilateral Salpingo-Oophorectomy(以下RRSO)を施行された症例の卵管・卵巣の病理組織標本を詳細に検索し解明された発癌機構である(Medeiros F et al. *Am J Surg Pathol*. 2006)。



2006)。このような背景から卵巣癌早期発見にはp53signatureの細胞特性を解明すること、および卵巣癌発症リスクの高い症例に対し、前癌細胞の変化を継時的に観察することで、たとえ卵巣癌を発症しても早期の対処をすることにあると考え本研究に至った。

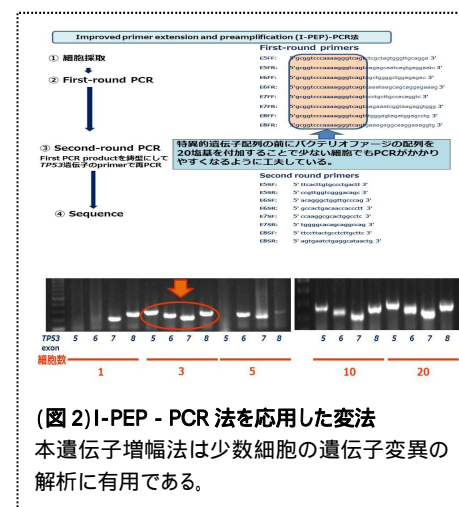
### 2. 研究の目的

卵巣癌早期発見を目指し、卵巣癌のおもな上皮性腫瘍のうち、最も発生頻度が高いとされる卵巣漿液性癌のうち、特にHGSCの症例に対し、BRCA1/2遺伝子変異保持者と非保持者の良性卵管上皮細胞の特性を比較することで、発癌機構の違いやHGSCの特性を解明し、解析結果を応用した患者負担が少なく卵巣癌の早期発見に有用であり個々の症例に適合した新規検査法の確立を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) BRCA1/2 遺伝子変異陽性および陰性 HGSC 例における良性卵管上皮からの発癌機序の違い

卵管上皮より発生する確率が高いとされている卵巣癌において、卵管上皮細胞の特性を微量細胞の遺伝子変異を検出することで解明した。まず、BRCA1/2 遺伝子生殖細胞変異陽性例の変異の差異は散発性卵巣癌と異なる発癌機構を形成していることを解明するため、BRCA1/2



陽性および陰性の卵巣癌症例や、卵巣癌の主な上皮性腫瘍を発症した症例の手術検体を対象に卵管上皮細胞と腫瘍部の各部位を Laser Capture Microdissection にて目的細胞を正確に採取し P53 蛋白発現と TP53 遺伝子解析をおこなった。正常卵管上皮細胞の P53 蛋白発現細胞は極めて少数であることから、微量細胞からの遺伝子変異の検出を可能とした Improved primer extension and preamplification 法の primer 配列をカスタマイズした I-PEP-PCR 変法によって解析をおこなった(図 2)。

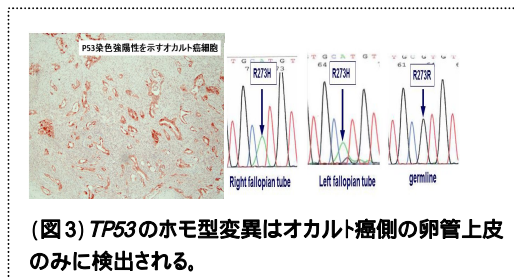
## (2)RRSO 例の癌発症リスクと早期発見を可能とした新規検査法の確立と腹膜癌発症機序の解明

BRCA1/2 遺伝子変異保持者に対する RRSO 施行以外の卵巣癌早期予防に対する有用な検査法を確立するため、血中循環細胞 (CTC) または卵巣より離れた部位にて採取した液状細胞検体を対象とした微量細胞の遺伝子変異をデジタル PCR で検出するとともに RRSO 例の腹膜癌発症のメカニズムについて解明した。

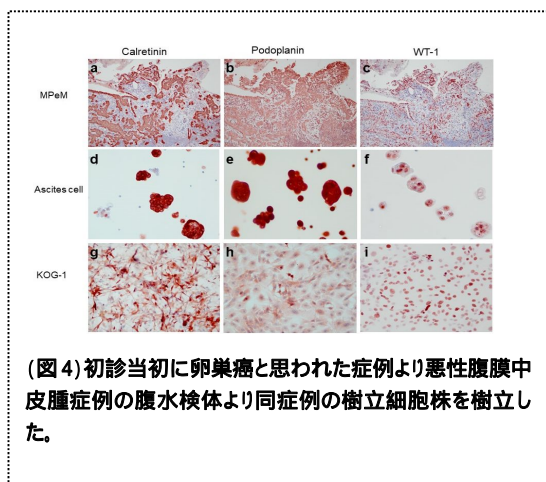
### 4. 研究成果

#### (1) BRCA1/2 遺伝子変異陽性および陰性 HGSC 例における良性卵管上皮からの発癌機序の違い

卵巣癌既発症例における BRCA1/2 遺伝子の生殖細胞変異陽性例および陰性例に対し、卵管上皮細胞の TP53 遺伝子変異の変異頻度やアミノ酸部位に差異の検討を行った。その結果、両者に特徴的なアミノ酸部位の変異は検出されなかった。しかしながら、RRSO 例の卵管上皮の異型の無い上皮細胞からは各臓器部位を問わず、すべての癌腫で最も高頻度に検出される TP53 の codon273 変化が検出された(図 3)。この結果は卵巣癌発癌前の卵管上皮細胞には、形態学的に良性の細胞であっても遺伝子レベルの変化はすでに起こっていることを示唆することが示唆された。



また、本実験実施中に卵巣癌以外の腫瘍についても成果を挙げることができた。本課題では卵巣または卵管癌が腹膜中に播種されたと考えられる症例に対し、患者腹水を採取して細胞株を樹立させ、腹水中に出現した腫瘍細胞のゲノム解析や薬剤効果判定なども行う予定としていた。その対象症例中に本来は卵巣癌と思われていたが、悪性腹膜中皮腫症例であった症例が存在し、同症例からの採取腹水から細胞樹立に成功した。樹立された細胞株は元腫瘍および腹水中に出現した腫瘍細胞と同様の悪性中皮腫特異的蛋白発現が一致し、もともと発生した腫瘍組織と同一の特徴を示していた(図 4)。悪性腹膜中皮腫は症例が少ないことから確立された標準治療が現時点では無く、腫瘍特性や奏功する化学療法薬剤等の開発が課題である。また、悪性腹膜中皮腫由来の樹立細胞株は現在までに 3 株の報告があるのみで、基礎的実験データを解析するうえで貴重な生物資源となる可能性があることから、本解明結果を論文作成することとし現在作成中である。



(図 4) 初診当初に卵巣癌と思われた症例より悪性腹膜中皮腫症例の腹水検体より同症例の樹立細胞株を樹立した。

## (2)RRSO 例の癌発症リスクを早期発見可能とした新規検査法の確立と腹膜癌発症機序の解明

本研究期間内に、1 症例ではあるが卵巣癌を発症した症例の遠隔部から採取された液状細胞検体より卵巣癌本体に検出されている *TP53* 変異を検出した。本解析結果は今後新規の癌早期発見手技として有用であると考えられる。

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Yoshihama T, Fukunaga K, Hirasawa A, Nomura H, Akahane T, Kataoka F, Yamagami W, Aoki D, Mushiroda T. *GSTP1* rs1695 is associated with both hematological toxicity and prognosis of ovarian cancer treated with paclitaxel plus carboplatin combination chemotherapy: a comprehensive analysis using targeted resequencing of 100 pharmacogenes. *Oncotarget*. (査読あり) 9(51):2018. 29789-29800. doi: 10.18632/oncotarget.25712. eCollection 2018 Jul
2. Hirasawa A, Imoto I, Naruto T, Akahane T, Yamagami W, Nomura H, Masuda K, Susumu N, Tsuda H, Aoki D. Prevalence of pathogenic germline variants detected by multigene sequencing in unselected Japanese patients with ovarian cancer. *Oncotarget*. (査読あり) 8(68): 2017.112258-112267. doi: 10.18632/oncotarget.22733. eCollection 2017 Dec 22.
3. Masuda K, Hirasawa A, Irie-Kunitomi H, Akahane T, Ueki A, Kobayashi Y, Yamagami W, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E, Banno K, Susumu N, Aoki D. Clinical utility of a self-administered questionnaire for assessment of hereditary gynecologic cancer. *Jpn J Clin Oncol*. (査読あり) 47(5):473.2017. doi: 10.1093/jjco/hyx037. No abstract available.
4. Masuda K, Hirasawa A, Irie-Kunitomi H, Akahane T, Ueki A, Kobayashi Y, Yamagami W, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E, Banno K, Susumu N, Aoki D. Clinical utility of a self-administered questionnaire for assessment of hereditary gynecologic cancer. *Jpn J Clin Oncol*. (査読あり) 47(5):401-406. 2017. doi: 10.1093/jjco/hyx019. Erratum in: *Jpn J Clin Oncol*. 2017 May 1;47(5):473.
5. Yoshihama T, Hirasawa A, Nomura H, Akahane T, Nanki Y, Yamagami W, Kataoka F, Tominaga E, Susumu N, Mushiroda T, Aoki D. *UGT1A1* polymorphism as a prognostic indicator of stage I ovarian clear cell carcinoma patients treated with irinotecan. *Jpn J Clin Oncol*. (査読あり) 47(2):170-174.2017. doi: 10.1093/jjco/hyw163.

[学会発表] (計 12 件)

1. 赤羽智子、平沢 晃、片岡史夫、野村弘行、山下年成、羽田恵梨、亀山香織、小崎健次郎、青木大輔. 乳癌既往歴があり耳下腺癌を発症した *BRCA1* germline pathogenic variant 保持者の 1 例. 第 68 回日本人類遺伝学会 (2018)

2. 赤羽智子、平沢 晃、西原広史、植木有紗、谷嶋成樹、千代田達幸、岸郁子、青木大輔. *がん遺伝子パネル検査にて PMS2 遺伝子に生殖細胞系列バリエーションが検出された 1 例*. 第 4 回日本婦人科遺伝子診療学会 (2018)
3. 南木佳子、平沢晃、野村弘行、赤羽智子、早乙女啓子、同前愛、千代田達幸、片岡史夫、富永英一郎、青木大輔. *個別化医療を目指した腹水および組織由来 卵巣癌細胞の初代 3 次元 (3D)細胞培養法の確立*. 第 59 回日本臨床細胞学会総会(春期大会) (2018).
4. Yoshihama T, Hirasawa A, Nomura H, Akahane T, Kataoka F, Yamagami W, Mushiroda T, Tanaka T, Aoki D. GSTP1 rs1695 is a predictive indicator of both hematological toxicity and prognosis of ovarian cancer treated with paclitaxel plus carboplatin. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2018)
5. 赤羽智子、平沢 晃、増田健太、野村弘行、片岡史夫、富永英一郎、阪埜浩司、進 伸幸、羽田恵理、清水 哲、青木大輔 *BRCA1 遺伝子病的変異陽性例における耳下腺癌発症例に関する検討*. 第 58 回日本臨床細胞学会春季大会 (2017)
6. 吉浜智子、平沢 晃、菅野康吉、植木有紗、三須久美子、赤羽智子、真壁健、山上亘、阪埜浩司、進 伸幸、牛尼美年子、坂本裕美、吉田輝彦、小崎健次郎、青木大輔. *大腸がんの家系内集積を認める若年性子宮体癌罹患患者に対してパネル検査を実施し BRCA2 変異が検出された一例*. 第 23 回日本家族性腫瘍学会学術集会 (2017)
7. 岩佐尚美、平沢 晃、野村弘行、赤羽智子、千代田達幸、山上 亘、片岡史夫、井本逸勢、青木大輔. *BRCA1/2 変異卵巣癌の血縁者における乳癌および卵巣癌の罹患に関する検討*. 第 27 回日本乳癌検診学会学術総会 (2017)
8. 蔦 幸児、富永英一郎、戸澤晃子、赤羽智子、大原 樹、小林佑介、平沢 晃、阪埜浩司、鈴木 直、青木大輔. *腹水卵巣癌細胞の CD44 各アイソフォーム発現量と化学療法の効果との関連性の検討*. 第 58 回日本臨床細胞学会総会(春期大会) (2017)
9. Tsuta K, Tominaga E, Tozawa A, Akahane T, Uekawa A, Ohara T, Nomura H, Kataoka F, Hirasawa A, Bonno K, Suzuki N, Aoki D. TAS-117, a novel allosteric AKT inhibitor, shows potent antitumor activity on ovarian clear cell adenocarcinoma cells from fresh surgical samples in 3-dimensional culture. 第 68 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2016)
10. 國富晴子、増田健太、平沢 晃、赤羽智子、小林佑介、山上 亘、野村弘行、片岡史夫、富永英一郎、阪埜浩司、進 伸幸、青木大輔. *自己記入式がん家族歴聴取票を使用した遺伝子高リスク家系の抽出*. 第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会 (2016)

11. 平野卓朗, 平沢 晃, 眞壁 健, 坂井健良, 赤羽智子, 増田健太, 小林佑介, 山上 亘, 野村弘行, 片岡史夫, 富永英一郎, 阪埜浩司, 進 伸幸, 青木大輔. 血縁腫瘍歴聴取票を用いた婦人科関連遺伝性腫瘍のスクリーニングに関する検討. 第2回日本産科婦人科遺伝診療学会学術講演会 (2016)
  
12. 赤羽智子, 富永英一郎, 平沢 晃, 青木大輔. 腹水細胞中からの樹立したヒト悪性腹膜中皮腫由来細胞株の特性に関する検討. 第55回 日本臨床細胞学会秋季大会 (2016)