

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11296

研究課題名(和文) 子宮体癌の個別化医療選択に資する臨床的特性に相関する遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of biomarker genes that correlate with clinical features that contribute to personalized medicine for endometrial cancer

研究代表者

太田 剛志(Ota, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：80407254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により子宮体癌の病理組織型およびリスク分類に相関し、これらの判別に寄与する複数の遺伝子マーカーの同定に至った。これら遺伝子マーカー評価法として、免疫染色法を用いた結果、その発現量を染色強度で評価することが可能であった。この手法はすでに臨床応用されている手法であり、本同定マーカーを免疫染色法で評価することは、子宮体癌の術前評価精度を向上させ、術式および治療の個別化に寄与できることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術式の個別化において最も重要な因子は、予後因子の一つであるリンパ節転移の診断である。子宮体癌の特性として、子宮体癌の約80%を占める低中リスク群ではリンパ節転移率10%以下と低く、リスク評価に基づいた術式の個別化が患者侵襲の低下に繋がる。しかし様々なリスク評価で主軸となる病理診断精度は平均70%と不確定要素が残る。本診断マーカーは、臨床応用可能な術前病理診断のコンパニオンマーカーとして診断精度向上に寄与することが可能と言える。

研究成果の概要(英文)：We identified genetic biomarkers that correlate with the histopathological type and preoperative risk classification of endometrial cancer. By using immunohistochemical staining (IHC) method to assess these biomarkers, we could evaluate the expression level by the staining intensity and proportion. It is expected that the evaluation of our novel biomarkers by IHC can improve the accuracy of preoperative diagnosis for endometrial cancer and contribute to individualization of surgical procedures and treatments. The individualization of surgical procedures based on risk of lymph node metastasis leads to decrease patient burden of surgery. However, the uncertainty of the preoperative pathological diagnosis, which is the main factor in various risk assessments, remains 70% on average. It can be expected that our novel marker can contribute to the improvement of diagnostic accuracy as a companion marker for preoperative pathological diagnosis.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮体癌 バイオマーカー 個別化医療 サブタイプ分類

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、乳癌、肺癌や大腸癌などの癌種では補助的診断法としての遺伝子検査が多数開発され、治療法選択の新たな判断基準として個別化医療への貢献が実施されている。これに対して、子宮体癌における診断・分類で中心的な役割を担うのは病理組織学的検査であり、ゲノム、トランスクリプトームおよびプロテオームの特性解析が様々に行なわれているが、一部の家族性子宮体癌の診断を除き、現時点で臨床実施されている遺伝子検査はない。子宮体癌は1980年以降増加の一途をたどり、本邦では年間約1万5千人が発症し約2千人が死亡する婦人科分野の悪性腫瘍の中で最多の癌となったにも関わらず、発現遺伝子に基づく治療法選択基準は未確立であり、個別化医療の実践は他癌種に及ばないのが現状である。

現在の子宮体癌標準初回治療は手術治療である。摘出された手術検体の病理組織学的検査に基づいて病期診断・組織学的分類を確定し、その再発リスク評価から術後補助治療が行なわれている。子宮体癌症例の70%以上は組織学的低悪性度かつリンパ節転移を伴わない再発低リスク群である。これに対し再発高リスク群は、組織学的低悪性度にも関わらずリンパ節転移を伴う症例、あるいは組織学的悪性度が高い症例を含む。これらは補助療法を必要とし、治療抵抗性を示す症例も散見される予後不良症例である。

しかしながら、これらの特性を判別する遺伝子は同定されておらず、全症例で画一的にリンパ節郭清を含む術式が実施され、また再発高リスク群に対して推奨される化学療法レジメンの選択肢も腫瘍の特性を詳細に反映したものではない。

子宮体癌の罹患数は近年増加傾向にあり、また治療後の女性の社会復帰の必要性から、術後合併症による女性の身体的負担、治療に伴うによる経済的負担、精神的負担を軽減し、また適切な術後療法の選択による治療効果の向上に資する個別化医療が実現されるべきであり、本研究が従来の標準治療を“女性にやさしい個別化治療”に変える新しい基準になることが強く期待される。

### 2. 研究の目的

本研究開発の最終目標は、子宮体癌の臨床的特性と発現が関連する遺伝子を同定し、診断・治療に資するサブタイプを確立することである。

子宮体癌症例の70%以上を占める予後良好な再発低リスク群に対し、再発高リスク群は補助療法を必要とし、治療抵抗性を示す症例も散見される予後不良症例である。しかしながら、これらの特性を判別する遺伝子マーカーは同定されておらず、全症例で画一的な術式が実施され、また再発高リスク群に対して推奨される化学療法レジメンの選択肢も腫瘍の特性を詳細に反映したものではない。

そこで、活性化されたすべての転写開始点を補足し配列の同定とともに発現定量が可能であるCAGE (Cap analysis of gene expression) 法を用いた網羅的解析データを用いて、様々な臨床的特性に基づき群間比較することによって有意に発現量差を有する候補遺伝子を全ゲノム領域にわたって抽出することを試みた。

さらに、臨床検体を用いて臨床応用を想定した様々な評価法で候補遺伝子の判別精度検証し、子宮体癌の臨床的特性と関連する遺伝子発現を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 子宮体癌組織検体の収集

倫理委員会 (IRB) にて審査・承認された研究計画書・説明・同意書に基づき臨床情報と子宮体癌組織検体115症例を収集し、術後2年間は予後追跡を継続した。臨床情報は匿名化(検体との間の連結可能な)を行い、この連結表を管理した。

#### (2) CAGE データおよびTCGA データ分析による候補遺伝子の抽出

先行研究で実施した子宮体癌のCAGE データを再解析し、再発低中リスク群と高リスク群の2群間で転写開始点(TSS)におけるプロモーター活性をゲノムワイドに比較し、2群間で発現に有意差のある遺伝子群を抽出した。CAGE リードのマッピングはBurrows-Wheeler Aligner61を使用してリファレンスゲノム (hg19) にアライメントし、FANTOM5 プロジェクトで特定されたピークセットをTSS領域のリファレンスセットとして使用し300万を超えるデータのみを使用した。TCGA データは、GDC データポータル (<https://gdc.nci.nih.gov/>) から臨床記録とRNA-seq 分析結果を取得し、CAGE データと同様に再発低中リスク群と高リスク群の2群間で各遺伝子の発現量を比較した。

結果として、2群間で有意差のある候補遺伝子として3遺伝子 (A,B,C) を同定した。

#### (3) 免疫染色法による候補遺伝子の判別精度の検証

ホルマリン固定、パラフィン包埋組織サンプルから、厚さ4μmの5つの切片を連続して切り取り、プレコートスライドにマウントした。各症例のヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色にて子宮内膜癌組織の存在をすべての症例で確認した。

A および B の免疫組織化学アッセイ (IHC) は、標準プロトコルに従って実施した。賦活化は100°Cのスライドヒーター上に60分間静置して実施し、内因性ペルオキシダーゼ活性は、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に4分間浸漬することでクエンチした。1次抗体との反応は、42 で32分間インキュベ

ートした。C の IHC は、標準プロトコルに従って抗体を 1:5 で希釈し実行した。IHC 染色結果は、2 人の病理学者が Allred スコアを用いて評価した。

#### 4. 研究成果

(1) リスク判別のためのマーカー候補遺伝子の同定

再発低中リスク 29 症例と高リスク 11 症例の 2 群間で CAGE データを比較解析した結果、2 群間で発現に有意差を認める遺伝子として A を同定した (Fig1 A)。さらに TCGA データにおいて A の発現の有意差は再現性が得られ、これに加えて遺伝子 B の有意差も認め、候補遺伝子とした (Fig 1 B)。さらに A, B と機能的関連が考えられる遺伝子 C は解析データ上は発現に有意差は認められなかったが、機能的関連性から候補遺伝子とした (Fig 1 B)。

Fig 1

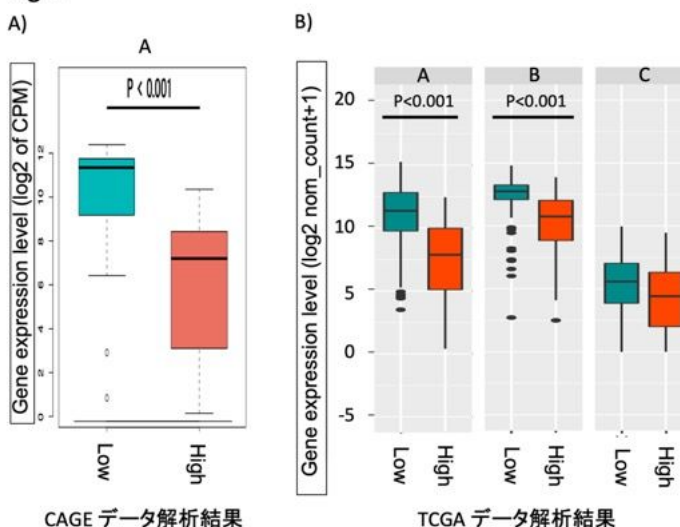
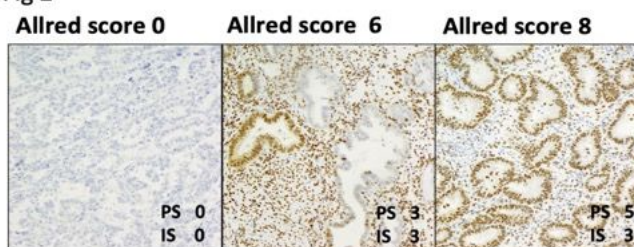


Fig 2



(2) 免疫染色法による判別精度の確立

臨床使用を考慮して IHC による判別精度検証を実施した。2 人の病理学者による Allred score に基づいて、タンパク発現レベルで候補バイオマーカー (A, B, C) の発現を検証した。Allred score は、比率スコア (PS) と強度スコア (IS) の合計に

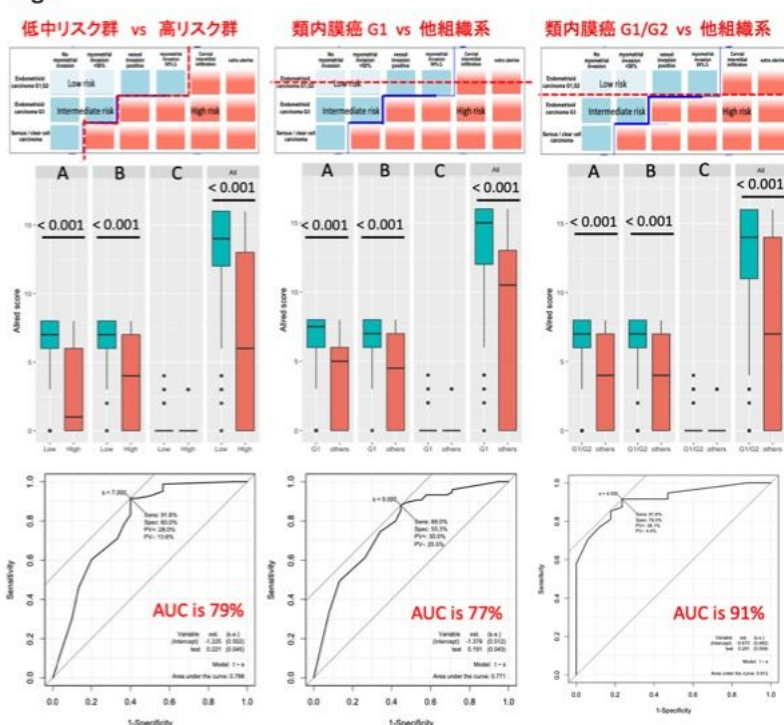
よって計算され、このスコアは 8 つのレベルに分類される (Fig 2)。定義した 2 群間で染色強度を比較し、当該の 2 群の判別精度を AUC で評価した。この結果、A, B において染色強度の明確な差を明らかにした (Fig 3)。

対照的に、子宮体癌組織における C の染色陽性率は非常に低かったが、非類内膜型では発現が高くなる傾向が認められた。A, B のそれぞれ単独でも 2 群間の判別精度に有意差を認めたが、A, B の組み合わせによって精度の上昇が認められた (Fig 4)。また、候補遺伝子の抽出は再発低中リスク群と高リスク群の判別に寄与するものとして同定されたが、類内膜癌 Grade3 以外の類内膜癌と類内膜癌 Grade3 および非類内膜癌の 2 群間の判別において最大の AUC を示し、最も高い判別精度が得られることが示された (Fig 3)。

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

子宮体癌におけるサブタイプ分類の一つとして、リンパ節転移の有無に基づく分類がある。リンパ節転移は予後因子として重要であるが、子宮体癌の特性として、子宮体癌の約 80% を占める低中リスク群ではリンパ節転移率 10% 以下と低く、転移リスク評価に基づいた術式の個別化が患

Fig 3

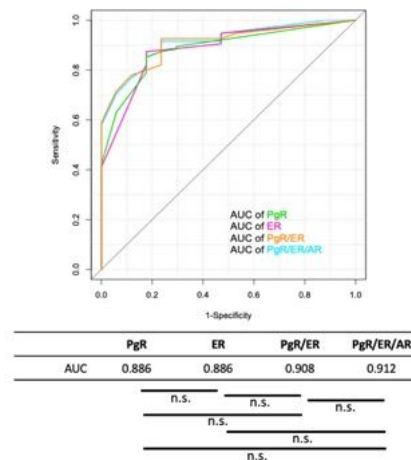


(Fig 3)

者侵襲の低下に繋がる。このため、臨床因子に基づいたリスク分類が様々に試みられてきた (Todo Y et al, Gynecol Oncol 2007, Nakayama H et al, Nippon Rinsho vol.70, suppl4 2012, Sokbom K et al, Journal of Clinical Oncology 2014 など)。いずれのスコア評価においても術前生検検体による病理組織系が評価因子の一つとなっている。ここで問題なのは、術前生検検体による病理組織型の診断精度は文献ごとに差はあるものの 35-96% (平均 70%) とされ、診断に不確定要素が残る。いずれも悪性度の低い類内膜癌 grade1 および grade2 とそれ以外の悪性度の高い組織型を判別することを主軸としており、他の臨床因子を組み合わせることでそれぞれの判別精度を向上させているが、主軸の病理組織型の診断精度には課題が残存する。したがって、本診断マーカーは、すでに臨床応用されている IHC の手法を用いて、生検検体における病理組織型の診断におけるコンパニオンマーカーとして診断に寄与することが可能と言える。このため、臨床的にも非常に有用な知見と考えられる。

さらに今後の展望として、本研究の先行研究 (「CAGE 法を用いた子宮体癌におけるリンパ節転移予測マーカーの同定」(MEXT 科研費基盤 C 15K10732)) において、これらのスコアリングとは全く異なる診断アプローチとして、子宮体癌リンパ節転移診断マーカー遺伝子を同定しており (Yoshida E et al, Scientific Reports 2017)、これらと組み合わせることでさらに高精度のリンパ節転移診断法の確立を目指す。

Fig 4



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Kaidiliayi Sulidan, Yasuhisa Terao, Yosuke Ito, Emiko Yoshida, Shiori Sakayori, Atsuo Itakura
2 . 発表標題 Identification of novel companion biomarkers to discriminate the risk of recurrence for endometrial cancer
3 . 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 E. Yoshida, Y. Terao, Y. Ito, T. Ota, M. Nojima, D. Ogishima, H. Kaneda, S. Kusunoki, K. Fujino, T. Hirayama, K. Usui, M. Itoh, H. Kawaji, A. Itakura, S. Takeda
2 . 発表標題 Validation of clinical efficacy of lymph node metastasis predictive biomarker and development of rapid diagnosis method for uterine cancer
3 . 学会等名 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2018) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yasuhisa Terao, Emiko Yoshida, Yosuke Ito , Kazunari Fujino, Soshi Kusunoki, Tsuyoshi Ota, Masayoshi Itoh , Hideya Kawaji, Satoru Takeda
2 . 発表標題 Identification of biomarkers to diagnose lymph node metastasis based on gene expression patterns in primary lesion of endometrial carcinoma
3 . 学会等名 The 20th ESGO International Meeting, 2017/11/04-07 Vienna Austria (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Emiko Yoshida, Yasuhisa Terao, Yosuke Ito, Kazunari Fujino, Takafumi Ujihira, Tsuyoshi Ota, Atsuo Itakura, Satoru Takeda
2 . 発表標題 Identification of biomarkers to diagnose lymphatic metastasis based on gene expression patterns in the primary lesion in endometrial carcinoma.
3 . 学会等名 第69回 日本産科婦人科学会学術講演会, 広島
4 . 発表年 2017年

〔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
研究分担者	寺尾 泰久  (Terao Yasuhisa)  (00348997)	順天堂大学・医学部・先任准教授   (32620)	
研究分担者	野島 美知夫  (Nojima Michio)  (50198595)	順天堂大学・医学部・教授   (32620)	
研究分担者	金田 容秀  (Kaneda Hiroshi)  (60445517)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	
研究分担者	荻島 大貴  (Ogishima Daiki)  (90327784)	順天堂大学・医学部・先任准教授   (32620)	