

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16851

研究課題名(和文) 高悪性度漿液性卵巣癌の発癌初期における分子機構の解明

研究課題名(英文) Initial steps of high-grade serous ovarian carcinoma carcinogenesis

研究代表者

中村 康平 (NAKAMURA, Kohei)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：10775802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は癌化に必要な3つの遺伝子異常(p53/KRAS/c-Myc or Akt)を同定し、卵管採上皮不死化細胞株を用いたin vitro発癌モデルを構築し、発癌初期病変であるSerous tubal intraepithelial carcinoma (STIC)におけるシグナル異常の同定を行い、卵管採への排卵時の卵胞液による刺激がHGSOC発癌の初期段階に関与していることが示唆された。また、低悪性度漿液性癌の発癌機序についても、卵巣表層上皮への嚢胞内容液の曝露によるNFkB活性化等が発癌初期イベントに寄与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣高悪性度漿液性癌の卵管上皮起源説が注目されている。我々はSTICにおけるシグナル異常の同定を行い、卵管採への排卵時の卵胞液による刺激がHGSOC発癌の初期段階に関与している可能性を示した。また、卵巣高悪性度漿液性癌についてはOSEへの漿液性卵巣嚢腫内容液曝露が発癌メカニズムに寄与している可能性を示した。本研究で得られる成果は世界における卵巣癌発生の起源を分子レベルで解決し得るツールとなる点で意義深いものになると推測される。さらには、卵巣癌の初期発癌機構を解明することで、新規分子標的治療薬の開発にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified two patterns of three genetic alterations (i.e., p53/KRASV12/c-Myc and p53/KRASV12/PI3K-AKT) that were essential for HGSOC development, and successfully established an in vitro step-wise model of carcinogenesis using immortalized FTSECs. Furthermore, we identified the signal transduction in STICs and demonstrated that the hormone exposure to fimbriae in ovulation contributes to the initial steps of HGSOC carcinogenesis. Regarding LGSOC carcinogenesis, we demonstrated that the exposure of content fluid of serous cystadenoma to OSE causes the NFkB activation and contributes to the initial steps of LGSOC carcinogenesis.

研究分野：卵巣癌、ゲノム

キーワード：卵巣癌 ゲノム STIC 発癌 遺伝子変異 TP53

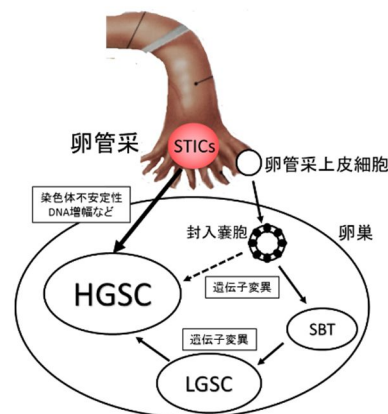
1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の起源は現在までに長らく議論されてきた。従来から根強く支持されてきたのが卵巣表層上皮(Ovarian surface epithelium: OSE)を起源とするものである。実際に卵巣表層上皮を分離、純化し、様々な遺伝子操作を加えることにより *in vitro* で癌化細胞を作製できることが示され、OSE 起源説の傍証が得られている(Sasaki R et al. *Carcinogenesis* 30: 423-431, 2009)。

しかしながら OSE 起源仮説には多くの矛盾も存在する。上皮性卵巣癌は構造的、形態学的にいずれも子宮や卵管などの Muller 管由来の組織に類似するものであるが、卵巣にはこの様な細胞は存在しない。

最近、Kurman らにより HGSC の多くはその起源が卵管にあり、卵巣にはそれが 2 次性に波及するという新たな説が提唱され注目されている(Kurman RJ et al. *Am J Surg Pathol.* 34: 433-443, 2010)。その代表的なものが卵管采起源説である。これまで卵巣癌の前癌病変は卵巣内にあると考えられていたため卵管は注意深く調べられていなかった。しかし最近になり、HGSC 患者の卵管采において 50-60% に漿液性卵管上皮内癌(STICs: serous tubal intraepithelial carcinomas)が認められ、その origin としては卵管采の分泌細胞が疑わしいことが報告された。その根拠となるのが遺伝子異常の類似性である。すなわち HGSC と共存する STICs には同一の p53 遺伝子変異が高率に見出される。これらのことから STICs 細胞が卵管采の末端から卵巣表面に剥離、侵入し、もしくは、排卵時に卵巣表面が破れたときに、卵管采から卵管上皮細胞がこぼれ落ちて封入嚢胞を形成し、p53 変異を経て HGSC が生じるという仮説である(図1)。一方で、HGSC の 2% は LGSC や漿液性境界悪性腫瘍(SBT)から発生するとされる。卵管采起源説を支持するグループは、この場合においても排卵時に卵巣表面が破れた際に卵管采から卵管上皮細胞がこぼれ落ちて封入嚢胞を形成し、KRAS, BRAF などの遺伝子変異の蓄積により SBT(serous borderline tumor)が生じ、LGSC(low-grade serous carcinoma)、さらには HGSC へと進展する可能性を指摘している(図1)。

図1 漿液性腺癌の卵管采起源説の概念図1



The Cancer Genome Atlas によって、卵巣高異型度漿液性腺癌のゲノム多様性、RAS-ERK, PI3K-AKT 経路等の signal transduction 異常の頻度が明らかとなった(Cancer Genome Atlas Research Network. *Nature.* 29: 609-615, 2011)。しかしながら、網羅的な遺伝子解析はされているものの、癌化に最低限必要な遺伝子異常は明らかではない。我々は日本人における HGSC の遺伝子、signal transduction 異常の頻度を明らかにし、HGSC の癌化に必要な最低限の遺伝子異常について p53/KRAS/c-Myc、p53/KRAS/AKT の 2 パターンを同定した。以前我々は RB 蛋白の活性化を防ぐ遺伝子操作(CyclinD1/CDK4)とテロメア伸張酵素テロメラーゼ(hTERT)の導入により、正常卵管采上皮分泌細胞を不死化することに成功した。この不死化細胞に上記の遺伝子異常を mimic する遺伝子操作を加え、世界で初めて臨床に則した HGSC の *in vitro* 発癌モデルを構築した(Kohei N et al. *Oncotarget.* 9, 2018)。これらの細胞をヌードマウスに腹腔内/皮下注投与することでヒト HGSC に非常に類似した組織学的所見を呈する腫瘍を認めた。

STICs 病変が HGSC の前駆病変であり、p53 変異を有することは広く認知されている。しかしながら、STICs において上記の signal transduction 異常が認められるかは、報告がない。さらには、卵管采上皮に p53 変異が生じる経緯、さらには STIC、HGSC へと progress する機構は明らかではない。卵管采が癌化するメカニズムとして、排卵時の卵胞液によるホルモン依存性発癌仮説があげられているが、いずれも推測の域を出ないことから、卵管采起源説の真偽についての実験的検証が必要である。

卵胞液中には様々なホルモン(エストロゲン、プロゲステロン、甲状腺ホルモン等)が含まれている。その中でも、エストロゲンは細胞増殖に関与しており、他癌種において癌化との関係が指摘されている。また、エストロゲンは ERK のリン酸化を誘導すると言われている。甲状腺ホルモンは細胞表面受容体(integrin $\alpha_v\beta_3$)によって ERK の活性化、さらには ERK の活性化につながるとの報告がある(Hsieh MT et al. *Oncotarget.* 21, 2016)。これらの情報をもとに、卵管上皮不死化細胞、STIC モデル細胞に上記ホルモン刺激を与え、これらが卵巣癌に高率に認められる RAS/ERK pathway の活性化に関与しているかどうかを検証する。

2. 研究の目的

卵巣癌の起源について、Kurmanらによる卵管採起源説が全世界的に topics となっている。しかしながら、卵管採が癌化するメカニズムは明らかでない。我々は卵管採上皮の不死化細胞を樹立し、本細胞に HGSC (high-grade serous carcinoma) に高頻度に認められる遺伝子異常を mimick する遺伝子操作を加えることで、これまで成功例のない *in vitro* 発癌モデル、漿液性卵管上皮内癌 (STICs: serous tubal intraepithelial carcinomas) モデルを構築した。我々はこれらの *in vitro* 発癌モデルを用い、卵管採への卵胞液による漿液性癌発生初期における分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) STIC モデル細胞株の樹立

STICs とは卵管採上皮細胞に p53 変異が生じたものであり、おそらく卵管採上皮分泌細胞において p53 mutation を示すことが多段階発癌の第一のステップである。そこでまず卵管採上皮不死化細胞に p53 の機能を不活化する遺伝子操作を加える。具体的には Dominant-negative p53 遺伝子を過剰発現させ、その機能を喪失させる。本細胞が樹立されれば、その時点で STICs の性質を有している可能性があり、次の実験に移る。

(2) 漿液性卵管上皮内癌 (STICs: serous tubal intraepithelial carcinomas) における signal transduction 異常の検討

HGSC 患者の卵管採において 50-60% に HGSC の初期病変とされる STICs が認められ、その origin としては卵管採の分泌細胞が疑わしいことが報告されている。しかし、HGSC における STICs の頻度は欧米患者での報告はあるが日本人における頻度は明らかでない。また、p53 遺伝子以外の signal transduction 異常がすでに STICs で認められているかどうかは検討すらされていない。日本人における STICs の頻度を明らかにし、さらに HGSC で認める signal transduction (RAS/ERK, PI3K/AKT pathway) の異常の有無について明らかにする。上記 pathway 異常の検索については、リン酸化 (p-) ERK, p-AKT の免疫染色にて評価する。

(3) 卵管採上皮不死化細胞、STIC モデル細胞を用いた卵管採から HGSC に至る癌化初期機構の解明

卵管採が癌化するメカニズムについては、卵管採への排卵時の卵胞液によるホルモン刺激などが癌化に寄与している可能性は報告されているが、いずれもエビデンスはない。卵胞液中には上記ホルモンの他に、多種のアミノ酸が含まれており、それらが癌化に寄与している可能性もある。我々は卵胞液のホルモン以外の組成を再現した培養液を用い、その中に卵胞液中のホルモン濃度に類似した上記ホルモンを加えることで人工的に卵胞液を作成した。我々は、卵管採上皮不死化細胞、STIC モデル細胞に各ホルモン、または上記卵胞液による刺激を与えることで細胞増殖能の変化や STIC で認められる signal transduction 異常の発生の有無を検証する。具体的には上記刺激による p-ERK, p-AKT 発現の経時的な変化をウエスタンブロットにより検証する。

4. 研究成果

HGSOC 症例における STIC 部位での RAS/ERK, PI3K/AKT pathway の活性化について免疫染色にて検討した。また、STIC モデル細胞株 (卵管採上皮不死化細胞株 + Dominant negative p53) におけるエストロゲン、または卵胞液による直接刺激によるシグナルトランスダクションを検討した。HGSOC 24 症例中、11 例 (46%) に STIC を認めた。STIC 部位では 10/11 例 (91%) において phosphorylated (p-) ERK 発現の上昇を認めたが、p-Akt 発現は 3/11 例 (27%) のみであった。STIC モデル細胞にて Estrogen receptor の発現陽性をウエスタンブロットにて確認した。STIC モデル細胞にエストロゲン、卵胞液による直接刺激を与えたところ、いずれにおいても p-ERK 発現の上昇を認めた。さらに上記刺激により STIC モデル細胞の細胞増殖能が著しく亢進した。STIC では p53 変異のみならず、すでに RAS/ERK pathway の活性化が生じていることが明らかとなった。エストロゲン刺激により p-ERK 発現上昇をきたすことから、卵管採への排卵時の卵胞液による刺激が HGSOC 発癌の初期段階に関与していることが示唆された。

漿液性嚢胞腺腫の上皮細胞の由来の同定、さらには腺腫へ至る機序を解明することを目的とした。漿液性嚢胞腺腫、卵管上皮、卵巣表層上皮 (OSE) における上皮細胞の形態を HE 染色や免疫染色にて検討した。また、OSE 不死化細胞株に手術検体で得られた漿液性嚢胞腺腫内容液を添加し、Calretinin, PAX8 の発現を real-time PCR にて評価し、さらに Microarray 解析を行った。漿液性嚢胞腺腫全例で同一嚢胞内に非円柱状の細胞 (Calretinin 陽性) と繊毛細胞 (PAX8 陽性) の混在を認めた。その一方、OSE は全例で非円柱状の細胞から構成され、Calretinin 陽性、PAX8 陰性であった。OSE 不死化細胞株に漿液性嚢胞腺腫内容液を添加したところ継時的に Calretinin 発現が低下し、PAX8 発現が上昇した。Microarray 解析では添加後サンプルで NFkB 発現上昇を認

めた。OSE 由来の細胞が嚢胞内容液の曝露等の刺激を受けて NFkB 活性化を来し、それが卵管上皮化生に寄与して PAX8 発現を来し、最終的には繊毛細胞を含む卵管上皮様細胞の形態に移行していく可能性を考える。低悪性度漿液性癌は漿液性嚢胞腺腫から発生すると考えられており、本結果が発癌機序の解明の一助になると考えられる。

卵巢高悪性度漿液性癌の卵管上皮起源説が注目されている。我々は STIC におけるシグナル異常の同定を行い、卵管采への排卵時の卵胞液による刺激が HGSOC 発癌の初期段階に参与している可能性を示した。また、卵巢高悪性度漿液性癌については OSE への漿液性卵巢嚢腫内容液曝露が発癌メカニズムに参与している可能性を示した。

本研究で得られる成果は世界における卵巢癌発生の起源を分子レベルで解決し得るツールとなる点で意義深いものになると推測される。さらには、卵巢癌の初期発癌機構を解明することで、新規分子標的治療薬の開発にもつながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 12件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Ishikawa M, Nakayama K, Nakamura K, Ono R, Yamashita H, Ishibashi T, Minamoto T, Iida K, Razia S, Ishikawa N, Kyo S.	4. 巻 85
2. 論文標題 High frequency of POLE mutations in synchronous endometrial and ovarian carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Pathol.	6. 最初と最後の頁 92-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humpath.2018.11.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura K, Nakayama K, Minamoto T, Ishibashi T, Ohnishi K, Yamashita H, Ono R, Sasamori H, Razia S, Kamrunnahar S, Ishikawa M, Kyo S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Ultrasound-guided intranodal lymphangiography with lipiodol for treatment of chylous ascites following surgery for ovarian cancer: A case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 178-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2018.1647.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura K, Nakayama K, Tatsumi N, Minamoto T, Ishibashi T, Ohnishi K, Yamashita H, Ono R, Sasamori H, Razia S, Kamrunnahar S, Ishikawa M, Kyo S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Prognostic significance of pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in non-surgically treated uterine cervical carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 138-144.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2018.1646.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamura K, Nakayama K, Ishikawa M, Minamoto T, Ishibashi T, Sato E, Sanuki K, Yamashita H, Ono R, Iida K, Sultana R, Hossain MM, Ishikawa N, Kyo S.	4. 巻 16
2. 論文標題 Genetic analysis and phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway status in ovarian endometrioid borderline tumor samples.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 189-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.8626.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato E, Nakayama K, Razia S, Nakamura K, Ishikawa M, Minamoto T, Ishibashi T, Yamashita H, Iida K, Kyo S.	4. 巻 19
2. 論文標題 ARID1B as a Potential Therapeutic Target for ARID1A-Mutant Ovarian Clear Cell Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19061710.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura K, Nakayama K, Ishikawa N, Minamoto T, Ishibashi T, Ohnishi K, Yamashita H, Ono R, Sasamori H, Razia S, Hossain MM, Kamrunnahar S, Ishikawa M, Kyo S.	4. 巻 1
2. 論文標題 Preoperative tumor size is associated with deep myometrial invasion and lymph node metastases and is a negative prognostic indicator for patients with endometrial carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 23164-23172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25248.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Kohei, Nakayama Kentaro, Ishikawa Noriyoshi, Minamoto Toshiko, Ishibashi Tomoka, Ohnishi Kaori, Yamashita Hitomi, Ono Ruriko, Sasamori Hiroki, Razia Sultana, Hossain Mohammad Mahmud, Kamrunnahar Shanta, Ishikawa Masako, Kyo Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Preoperative tumor size is associated with deep myometrial invasion and lymph node metastases and is a negative prognostic indicator for patients with endometrial carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 23164-23172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Kohei, Nakayama Kentaro, Minamoto Toshiko, Ishibashi Tomoka, Ohnishi Kaori, Yamashita Hitomi, Ono Ruriko, Sasamori Hiroki, Razia Sultana, Hossain Mohammad Mahmud, Kamrunnahar Shanta, Ishikawa Masako, Ishikawa Noriyoshi, Kyo Satoru	4. 巻 19
2. 論文標題 Lynch Syndrome-Related Clear Cell Carcinoma of the Cervix: A Case Report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 979 ~ 979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19040979	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Kohei, Nakayama Kentaro, Ishikawa Masako, Katagiri Atsuko, Katagiri Hiroshi, Ishibashi Tomoka, Sato Emi, Kyo Satoru	4. 巻 21
2. 論文標題 GnRH agonist pre-treatment for microwave endometrial ablation in women with less than 1 centimetre myometrial thickness	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology	6. 最初と最後の頁 1~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01443615.2018.1436163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Kohei, Nakayama Kentaro, Ishikawa Noriyoshi, Ishikawa Masako, Sultana Razia, Kiyono Tohru, Kyo Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Reconstitution of high-grade serous ovarian carcinoma from primary fallopian tube secretory epithelial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 12609-12619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.23035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Kohei, Nakayama Kentaro, Minamoto Toshiko, Ishibashi Tomoka, Sanuki Kaori, Yamashita Hitomi, Ono Ruriko, Sasamori Hiroki, Komatsu?Fujii Takayoshi, Ishikawa Masako, Kyo Satoru	4. 巻 8
2. 論文標題 High preoperative Glasgow prognostic score is a negative prognostic factor for patients with endometrial carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 429-433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2018.1551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Kohei, Nakayama Kentaro, Sanuki Kaori, Minamoto Toshiko, Ishibashi Tomoka, Sato Emi, Yamashita Hitomi, Ishikawa Masako, Kyo Satoru	4. 巻 14
2. 論文標題 Long-term outcomes of microwave endometrial ablation for treatment of patients with menorrhagia: A retrospective cohort study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 7783-7790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.7208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村康平
2. 発表標題 低悪性度漿液性癌の発癌過程におけるOSEの卵管上皮化生について
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村康平
2. 発表標題 低悪性度漿液性癌の発癌過程におけるOSEの卵管上皮化生について
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村康平
2. 発表標題 卵巣がんのoriginについて
3. 学会等名 新潟産婦人科シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----