

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09229

研究課題名(和文) 邦人における卵巢低異型度漿液性癌の発癌機構解明とin vitro発癌モデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of in vitro carcinogenesis model of ovarian low-grade serous carcinoma

研究代表者

中山 健太郎 (Kentaro, Nakayama)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：70346401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：卵巢漿液性嚢胞腺腫細胞から上皮成分だけを分離し、cyclinD1、CDK4、hTERTの遺伝子導入をレンチウイルスベクターにて行い不死化細胞HOVcyst1を樹立した。HOVcyst1への変異型PIK3CA、変異型KRASのそれぞれの単独導入ではヌードマウスで腫瘍形成は見られなかった。しかし、両者を導入したHOVcyst1は腫瘍形成がみられ、ヒト卵巢低位型度漿液性癌に非常に類似した組織学的所見を認めた。卵巢低異型度漿液性癌の発癌経路としてPIK3CA/AKT/mTORおよびKRAS/BRAF/ERK経路の双方の活性化が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巢低異型度漿液性癌は卵巢漿液性嚢胞腺腫を発生起源とする仮説があるがその詳細は不明である。卵巢漿液性嚢胞腺腫の不死化細胞を樹立し、in vitro発癌モデルを構築し、卵巢低異型度漿液性癌の発癌分子機構を明らかにすることを目的とした。HOVcyst1(不死化卵巢漿液性嚢胞腺腫細胞)への変異型PIK3CAおよび変異型KRASの遺伝子導入により卵巢低異型度漿液性癌のin vitro発癌モデル構築に成功した。卵巢低異型度漿液性癌の発癌経路としてPIK3CA/AKT/mTORおよびKRAS/BRAF/ERK経路の双方の活性化が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Serous cystadenoma epithelial cells have been proposed to be the derivation of low grade serous ovarian carcinoma. Whereas several genetic diversifications are known to be involved in development of LGSC, but the fundamental requirements are unclear. We aimed to bracelet oncogenic mutations that responsible for LGSC development in a stepwise model, by using immortalized serous cystadenoma (SCA) epithelial cells. SCA were isolated from clinical sample and immortalized by overexpression of cyclin D1, CDK4R24C and hTERT. Transformed SCA epithelial cells with KRAS MT and PIK3CA MT, formed tumors into nude mouse that were grossly, histologically, and immunohistochemically analogous to human tumor. Thus, KRAS MT and PIK3CA MT were classified as the basal obligation for LGSC development. Current in vitro carcinogenesis model suggested that KRAS MT and PIK3CA MT is responsible for micropapillary stages of LGSC development.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：卵巢癌 発癌 低異型度 漿液性癌 がん遺伝子

1. 研究開始当初の背景

卵巣低異型度漿液性癌 (Low-grade serous carcinoma ; LGSC) は、境界悪性腫瘍 (Serous borderline tumor ; SBT) を前癌病変とし、adenoma-carcinoma sequence で発癌すると考えられている。LGSC は進行が緩徐だが、抗癌剤耐性を示し、進行癌では治療に難渋する。そのため、新規治療薬の開発が望まれる。

欧米からの報告では、LGSC は KRAS/BRAF の体細胞変異が相互排他的に 60% の頻度で存在し、KRAS/BRAF/MEK/ERK 経路が恒常的に活性化していることが報告されている (Singer et al. J Natl Cancer Inst. 2003)。しかし、LGSC の遺伝子解析に関しては欧米からの報告のみであり、邦人 LGSC の遺伝子異常については未だ不明である。欧米では卵巣高異型度漿液性癌 (High-grade serous carcinoma ; HGSC) が卵巣癌全体の 7 割を占めるのに対し、本邦では 4 割程度であることを考慮すると、欧米での遺伝子解析結果を邦人に適応するのは危険であり、人種間の差は避けて通れない問題である。近年、発癌過程における癌細胞の代謝がダイナミックに変化することが解明されてきたが、LGSC での検討は世界中でもされておらず、代謝制御を標的とした治療法もない。

2. 研究の目的

1. 邦人 LGSC の PIK3CA 変異の頻度を同定し、欧米人との発癌機構の相違を明確にする。
2. LGSC の発癌母地と考えられる漿液性嚢胞腺腫上皮細胞を不死化し、変異型 PIK3CA 等を遺伝子導入し、マウス移植実験にて LGSC が病理学的に再現できるか検討する (in vitro 発癌モデルの構築)。このモデル細胞を用いて発癌初期の癌代謝制御機構を明らかにする。
3. 邦人 LGSC から高純度の DNA を抽出し、Whole Genome Sequence を行い、発癌に寄与するプロモーター領域の変異を同定する。

3. 研究の方法

邦人 LGSC の PIK3CA/KRAS/BRAF 遺伝子変異の頻度の同定

当科関連病院から LGSC, SBT を各 40 例追加し、マイクロダイセクションにて DNA 抽出後、サンガー法にて PIK3CA/KRAS/BRAF 遺伝子変異を解析する。

LGSC in vitro 発癌モデルの構築

Adenoma-carcinoma sequence 発癌説を根拠として、起源となる細胞は、卵巣漿液性嚢胞腺腫上皮細胞を用いる。申請者は、良性の漿液性嚢胞腺腫上皮細胞の安定培養系を確立し、レンチウイルス発現系にて CyclinD1/CDK4/TERT を過剰発現させ細胞不死化 (HOVsCyst1 細胞) に成功している。この不死化漿液性嚢胞腺腫上皮細胞に下記遺伝子を導入予定である。

Driver gene 導入による形質確認：近年の発癌研究によりヒト癌化に必要な Driver gene は 3 個程度と想定されている (Vogelstein et al. N Eng J Med)。予備実験では本邦 LGSC には高頻度に PIK3CA 変異が認められ、既に SBT の段階で PIK3CA 遺伝子変異が 20% に認められた。したがって adenoma から SBT に進展する早期の段階で起こる異常と考えられる。以上の理由より、本邦 LGSC の Driver gene として、

PIK3CA を想定し、不死化細胞には、まず変異型 PIK3CA を導入する。

また、我々の予備実験では本邦の LGSC の約 10%には ERBB2 (HER2/neu)の遺伝子変異が認められた。そのため、セカンドヒットの Driver gene としては ERBB2 を導入予定である。サードヒットとしては Whole Genome Sequence で得られた、プロモーター領域の変異を想定している。これらもレンチウイルス系での導入を予定している。一方で欧米型の *in vitro* 発癌モデルとして KRAS あるいは BRAF 遺伝子変異をファーストヒットとしての Driver gene とするモデルも別系統で構築する。

その後の形質転換の確認には、足場非依存性増殖能及びヌードマウスでの腫瘍形成能の検討を行う。この発癌モデルの最大の利点は癌化に必異様な Driver gene の数と種類を逆方向から明らかにできる点にある。

4. 研究成果

卵巣漿液性嚢胞腺腫細胞への *cyclinD1*、*CDK4*、*hTERT* の遺伝子導入の結果、senescence が誘導されることなく、恒常的な細胞培養が可能であることを確認した。また、日本人の卵巣低異型度漿液性癌/境界悪性腫瘍は *PIK3CA* の変異頻度が 60%と高く、*BRAF* 変異が 20%、*ERBB2* の変異が 30%に認められた。一方、欧米人では *KRAS* 変異が高いことが報告されている。そのため、HOVcyst1 には変異型 *PIK3CA* および変異型 *KRAS* を遺伝子導入することにした。ヌードマウスへの皮下注投与では HOVcyst1 は腫瘍形成しなかった。HOVcyst1 への変異型 *PIK3CA*、変異型 *KRAS* のそれぞれの単独導入ではヌードマウスで腫瘍形成は見られなかった。しかし、両者を導入した HOVcyst1 は腫瘍形成がみられ、病理組織学的検討では、ヒト卵巣低位型度漿液性癌に非常に類似した組織学的所見を認めた。HOVcyst1 への変異型 *PIK3CA* および変異型 *KRAS* の遺伝子導入により卵巣低異型度漿液性癌の *in vitro* 発癌モデル構築に成功した。卵巣低異型度漿液性癌の発癌経路として *PIK3CA*/*AKT*/*mTOR* および *KRAS*/*BRAF*/*ERK* 経路の双方の活性化が必要であることが示唆された。癌に寄与するプロモーター領域の変異については現在解析中である。

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 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kohei Nakamura, Eriko Aimonu, Shigeki Tanishima, Mitsuo Imai, Akiko Kawano Nagatsuma, Hideyuki Hayashi, Yuki Yoshimura, Kentaro Nakayama, Satoru Kyo, Hiroshi Nishihara	4. 巻 10
2. 論文標題 Intratamoral Genomic Heterogeneity May Hinder Precision Medicine Strategies in Patients with Serous Ovarian Carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics100402	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 -
1. 著者名 Satoru Kyo, Noriyoshi Ishikawa, Kohei Nakamura, Kentaro Nakayama	4. 巻 9
2. 論文標題 The fallopian tube as origin of ovarian cancer: Change of diagnostic and preventive strategies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer medicine	6. 最初と最後の頁 421-431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.2725	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 -
1. 著者名 Tomoka Ishibashi, Kentaro Nakayama, Sultana Razia, Masako Ishikawa, Kohei Nakamura, Hitomi Yamashita, Puja Dey, Koji Iida, Hiroko Kurioka, Satoru Nakayama, Yoshiro Otsuki, Noriyoshi Ishikawa, Satoru Kyo	4. 巻 10
2. 論文標題 High Frequency of PIK3CA Mutations in Low-Grade Serous Ovarian Carcinomas of Japanese Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics100100	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 -
1. 著者名 Naomi Nakayama, Kentaro Nakayama, Kohei Nakamura, Sultana Razia, Satoru Kyo	4. 巻 9
2. 論文標題 Sarcopenic Factors May Have No Impact on Outcomes in Ovarian Cancer Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics904020	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 -

1. 著者名 Hitomi Yamashita, Kentaro Nakayama, Masako Ishikawa, Tomoka Ishibashi, Kohei Nakamura, Kiyoka Sawada, Yuki Yoshimura, Nagisa Tatsumi, Sonomi Kurose, Toshiko Minamoto, Kouji Iida, Sultana Razia, Noriyoshi Ishikawa, Satoru Ky	4. 巻 20
2. 論文標題 Relationship between Microsatellite Instability, Immune Cells Infiltration, and Expression of Immune Checkpoint Molecules in Ovarian Carcinoma: Immunotherapeutic Strategies for the Future.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20205129	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 -

1. 著者名 Sultana Razia, Kentaro Nakayama, Kohei Nakamura, Tomoka Ishibashi, Masako Ishikawa, Toshiko Minamoto, Kouji Iida, Yoshiro Otsuki, Satoru Nakayama, Noriyoshi Ishikawa, Satoru Kyo	4. 巻 18
2. 論文標題 Clinicopathological and biological analysis of PIK3CA mutation and amplification in cervical carcinomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental and therapeutic medicine	6. 最初と最後の頁 2278-2284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2019.7771	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 -

1. 著者名 Ruriko Ono, Kentaro Nakayama, Kohei Nakamura, Hitomi Yamashita, Tomoka Ishibashi, Masako Ishikawa, Toshiko Minamoto, Sultana Razia, Noriyoshi Ishikawa, Yoshiro Otsuki, Satoru Nakayama, Hideyuki Onuma, Hiroko Kurioka, Satoru Kyo	4. 巻 20
2. 論文標題 Dedifferentiated Endometrial Carcinoma Could be A Target for Immune Checkpoint Inhibitors (Anti PD-1/PD-L1 Antibodies).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20153744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katagiri H, Nakayama K*, Nakamura K, Sultana R, Sato E, Ishibashi T, Ishikawa M, Minamoto T, Iida K, Otsuki Y, Nakayama S, Ishikawa N, Kyo S	4. 巻 40
2. 論文標題 TERT promoter mutation is rare event in ovarian clear cell carcinomas in Japanese population.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Gynaecol Oncol	6. 最初と最後の頁 220-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takakura M, Matsumoto T, Nakamura M, Mizumoto Y, Myojyo S, Yamazaki R, Iwadare J, Bono Y, Orisaka S, Obata T, Iizuka T, Kagami K, Nakayama K, Hayakawa H, Sakurai F, Mizuguchi H, Urata Y, Fujiwara T, Kyo S, Sasagawa T, Fujiwara H.	4. 巻 109
2. 論文標題 Detection of circulating tumor cells in cervical cancer using a conditionally replicative adenovirus targeting telomerase-positive cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 231-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13449.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa M, Nakayama K*, Nakamura K, Ono R, Yamashita H, Ishibashi T, Minamoto T, K, Razia S, Ishikawa N, Kyo S. Iida	4. 巻 18
2. 論文標題 High frequency of POLE mutations in synchronous endometrial and ovarian carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Pathol	6. 最初と最後の頁 30424-30426
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pisanic T, Lin SF, Yen TT, Athamanolap P, Nakayama K, Cope L, Wang TH, Shih IM, Wang TL	4. 巻 24
2. 論文標題 Methylomic analysis of ovarian cancers identifies tumor-specific alterations readily detectable in early precursor lesions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 6536-6547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-1199.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa M, Nakayama K, Nakamura K, Ono R, Sanuki K, Yamashita H, Ishibashi T, Minamoto T, Razia S, Iida K, Ishikawa N, Kyo S	4. 巻 9
2. 論文標題 Affinity purified DNA-based mutation profiles of endometriosis-related ovarian neoplasms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 14754-14763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24546.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山 健太郎, 中村 康平, 石川 雅子, 石橋 朋佳, 山下 瞳, 吉村 由紀, 澤田 希代加, 小野 瑠璃子, 辰巳 渚, 黒瀬 苑水, 京 哲
2. 発表標題 Precision medicineクリニカルシーケンスの現状と課題 がんゲノム医療連携病院でのがんゲノム医療センターの現状
3. 学会等名 日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村 由紀, 中山 健太郎, 中村 康平, 黒瀬 苑水, 辰巳 渚, 澤田 希代加, 山下 瞳, 石橋 朋佳, 石川 雅子, 京 哲
2. 発表標題 Genetic heterogeneityがprecision medicineに与える影響 サンプルング部位の選択に対する警鐘
3. 学会等名 日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 瑠璃子, 中山 健太郎, 中村 康平, 石橋 朋佳, 石川 雅子, 皆本 敏子, 京 哲
2. 発表標題 性索間質性腫瘍に類似したエストロゲン産生卵巢類内膜腺癌の分子生物学的検討
3. 学会等名 日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 康平, 中山 健太郎, 澤田 希代加, 吉村 由紀, 山下 瞳, 石橋 朋佳, 皆本 敏子, 石川 雅子, 京 哲
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 日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村康平、中山健太郎、石川雅子、石橋朋佳、山下瞳、小野瑠璃子、笹森博貴、中村秋穂、吉村由紀、飯田幸司、スルタナ ラジア、フセイ ン モハメド モハマド、シャンタ カムルンナハル、皆本敏子、京哲
2. 発表標題 漿液性嚢胞腺腫の起源について 低異型度漿液性癌の発癌機構の解明に向けてー
3. 学会等名 第3回 三大学コンソーシアム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川雅子、中山健太郎、笹森博貴、小野瑠璃子、大西薫、山下瞳、中村康平、
2. 発表標題 ARID1A変異を基盤としたEndometriosis-related ovarian neoplasms (ERONs) のin vitro発癌モデルの構築
3. 学会等名 第3回 三大学コンソーシアム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川雅子、中山健太郎、笹森博貴、小野瑠璃子、大西薫、山下瞳、中村康平、石橋朋佳、皆本敏子、Razia Sulutana、飯田幸司、京哲
2. 発表標題 子宮頸部腺癌における免疫チェックポイント分子発現の検討
3. 学会等名 第70回目日本産科婦人科学会学術講演会
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
研究 分担 者	京 哲 (Kyo Satoru) (50272969)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------