

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16812

研究課題名(和文) 遺伝性婦人科悪性腫瘍に対する新たな発症機構の分子疫学的解析

研究課題名(英文) molecular and epidemiological analysis for new carcinogenesis mechanism in hereditary gynecological cancer

研究代表者

辻 浩介 (Tsuji, Kosuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70528166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性婦人科腫瘍であるリンチ症候群は、その特徴であるマイクロ不安定性(MSI)が免疫チェックポイント阻害薬の治療選択として注目されている。我々は、卵巣癌におけるリンチ症候群の診断ツールとしてSGO基準の有用性を示した。また、卵巣癌と子宮体癌の重複例でLynch症候群が7/33(21.2%)と多く、さらに腫瘍のゲノム解析では、子宮体癌、卵巣癌両原発巣において、高腫瘍変異量(>10mutations/Mb)が示された。変異遺伝子の追加解析で、各原発癌の発癌メカニズムが特徴づけられると期待される。また、進行・再発癌のMSI解析から、子宮頸癌ではMSI-highは認められないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究によって、遺伝性腫瘍は比較的一般的な頻度で認められることが分かってきており、本研究によって、遺伝性腫瘍であるリンチ症候群が、卵巣癌、特に卵巣癌子宮体癌の重複例において高率に認められることが分かり、婦人科癌診療における遺伝的関与の可能性に注意すべきであることを示している。また、治療選択におけるMSI検査においても、子宮体癌、卵巣癌において陽性結果が多く、若年者にも多い子宮頸癌における遺伝的関与が少ないことが示され、社会的にインパクトがあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The characteristic feature of Lynch syndrome, one of a hereditary gynecological tumors, is microsatellite instability (MSI), which has been attracting attention as a companion diagnostics for immune checkpoint inhibitors. We proved the usefulness of the SGO criteria as a diagnostic tool for Lynch syndrome in ovarian cancer. In addition, Lynch syndrome is common in 7/33 (21.2%) cases of double cancer of ovarian and endometrial cancer. In addition, genomic analysis of these tumors revealed tumor mutation burden-high (> 10 mutations/ Mb) in both endometrial cancer and ovarian cancer. Further analysis of these mutated genes is expected to reveal the carcinogenic mechanism of each primary cancer. In addition, MSI analysis of advanced or recurrent gynecological cancers showed that MSI-high was not observed in cervical cancer.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：リンチ症候群 卵巣癌 子宮体癌 重複癌 マイクロサテライト不安定性 高腫瘍変異量

1. 研究開始当初の背景

近年、子宮体癌と卵巣癌はともに罹患率、死亡率が増加傾向あり、今後も増加すると考えられる。特に、近年は若年の子宮体癌や卵巣癌患者も増加してきており原因の一つとして、遺伝性婦人科悪性腫瘍が挙げられ、Lynch 症候群に伴う子宮体癌や卵巣癌、遺伝性乳癌卵巣癌症候群 (Hereditary Breast and Ovarian Cancer: HBOC) に伴う乳癌や卵巣癌、Peutz-Jeghers 症候群に伴う子宮頸癌などが知られている。これらの遺伝性婦人科悪性腫瘍は近年、一般社会においても認知されるようになってきている。遺伝性腫瘍の拾い上げの基準に関しては、以前の既往歴や家族歴による拾い上げ基準等もあるが、近年の遺伝子解析研究の推進により、その解釈は大きく変容してきている。

また、婦人科の遺伝性腫瘍は、近年の新規治療薬の適応にも関与する。オラパリブなどの PARP 阻害薬は、BRCA 遺伝子変異や BRCAness によって依存した PARP 経路を阻害することによる合成致死へと誘導する有効な治療と期待されており、さらに Lynch 症候群関連腫瘍に特徴的なマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability: MSI) やミスマッチ修復機構の欠損 (deficient mismatch repair: dMMR)、その特徴から導かれる高腫瘍変異量 (Tumor mutation burden-High: TMB-High) が免疫チェックポイント阻害剤である PD-1 抗体や PD-L1 抗体のコンパニオン診断としても注目されている。大腸癌を主とした MSI、dMMR の固形がんを対象として、PD-1 抗体が米国で承認されており、子宮体癌もその臨床試験の対象疾患として含まれているものの少数であった。MSI を示す子宮体癌での PD-L1 等の発現についての報告は数少なく、卵巣癌では報告はない。さらに、MSI を示す子宮体癌や卵巣癌での免疫チェックポイント阻害剤の効果や有用性についてはまだ明らかになっていない。

これまで申請者は、特に子宮体癌において、MSI、dMMR の解明や、体細胞及び生殖細胞系列のメチル化などについて研究を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝性婦人科悪性腫瘍、特に子宮体癌、卵巣癌における遺伝子変異高リスク群の抽出方法の開発、その臨床病理学的特徴の解明、また遺伝学的背景の有無による発癌機構の解明、また新規治療法、戦略の構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌における Lynch 症候群のリスク診断と臨床病理学的特徴の解析

卵巣癌患者において、の SGO (society of gynecologic oncology) のリスク基準を用いて卵巣癌患者から遺伝子変異高リスク群を抽出する。対象患者の卵巣癌組織から DNA を抽出し MSI 検査を行うとともに、パラフィン切片の免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC) による MMR タンパク発現 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) を確認する。また、エピゲノム異常の検索として、MMR 遺伝子 (MLH1, MSH2, MSH6) のプロモーター領域の異常メチル化を MSP 法にて解析する。SGO 基準に該当しない、または MSI や dMMR を認めない症例は対照群、SGO 基準を満たし MSI や dMMR を認める症例は変異群として、その臨床像や病理学的特徴を解析する。変異群においては遺伝カウンセリングおよび確定診断のため遺伝子検査を勧める。

(2) 重複癌 (子宮体癌および卵巣癌) における遺伝的背景の解析および臨床病理学的特徴の解析

子宮体癌卵巣癌の重複癌症例について、MSI 検査、MMR タンパク発現を確認、遺伝カウンセリングののちに遺伝学的検査を施行し、遺伝的背景につき解析をする。さらにそれぞれの原発巣に関しては、DNA を抽出し次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、TMB の値、腫瘍の持つ遺伝子変異の種類等確認する。さらにそれぞれの腫瘍における腫瘍免疫の状態を確認するため、免疫組織化学にて、CD3, CD8, CD68, PD-1, PD-L1, C1-BB, CTLA-4, LAG3 などの発現の程度を確認する。これらの解析結果を、同一患者の子宮体癌、卵巣癌間で比較するとともに、遺伝的背景 (Lynch 症候群) の有無でわけ、差異を解析する。

(3) MSI status による婦人科癌の臨床病理学的解析

婦人科領域において抗 PD-1 抗体薬ペンプロリズマブのコンパニオン診断としての MSI 検査を施行した症例を対象に、その臨床病理学的背景の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌における Lynch 症候群のリスク診断と臨床病理学的特徴の解析

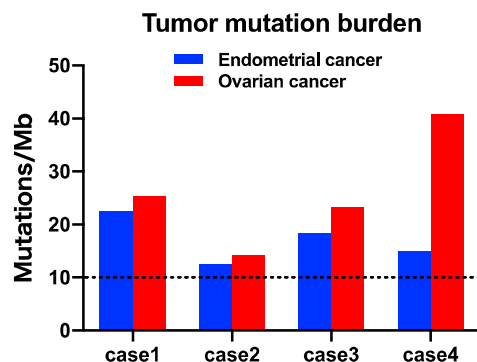
卵巣癌患者 129 名を対象に SGO のリスク基準に該当する患者 25 名を抽出した。該当症例の卵巣癌の組織型は、明細胞癌 5 名、類内膜癌 12 名、漿液性癌 5 名、粘液性癌 2 名、その他 1 名であった。10 名が子宮体癌または子宮内膜異型増殖症を合併、1 名が大腸癌合併、1 名が乳癌合併であった。MSI 検査、dMMR は 3 名に異常を認め、Lynch 症候群を疑った(a. MSH2/MSH6 の発現低下を呈する卵巣類内膜癌、b. MLH1/PMS2 の発現低下を呈する卵巣類内膜癌 G2+子宮体癌、c. MSH2/MSH6 の発現低下を呈する卵巣明細胞癌+子宮体癌。詳細下図)。重複癌症例は子宮、卵巣両原発癌ともに同様に MSI-H, dMMR を示した。このうち、症例 c が遺伝学的検査を受け、MSH2 の病的バリエーションより Lynch 症候群の診断に至った。SGO のリスク基準を用いて 3/129(2.3%) のリンチを疑う症例を同定した。SGO 基準によって高リスク群を抽出することで 3/25(12.0%) と効果的に卵巣癌患者より Lynch 症候群症例を抽出することが可能であった。

No. Diseases	Histology	Grade	Stage	Age	MSI	MSI-markers				IHC			MSP		Meeting criteria AC/rBG	Meeting criteria of SGO	Risk calculated by PREMM4 (%)		
						NR21	BAT26	BAT25	NR24	MONO27	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2				MLH1	MSH2
1 OC, EC	Endometrioid	I	I	38	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	M	U	U	a, b	12.3
2 OC	Clear		III	46	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	M	U	U	e	1.7
3 OC	Clear		I	77	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	M	U	U	e	1.4
4 OC	Clear		I	50	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	e	2.4
5 OC	Endometrioid	I	I	55	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	e	2.1
6 OC	Endometrioid	I	I	60	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	e	2.3
7 OC	Serous	High	IV	70	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	e	1.4
8 OC	Serous	Low	III	63	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	M	U	U	e	2.1
9 OC	Clear		I	41	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	Family member met AC	15.1
10 OC, EC	Endometrioid	I	II	35	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	M	U	U	a, b	13.5
11 OC	Endometrioid	2	III	38	MSI-H	+	+	+	-	-	+	-	-	+	U	U	U	e	7.9
12 OC	Serous	Low	II	43	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	M	U	U	e	4.3
13 OC	Carcinosarcoma		II	58	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	M	U	U	e	2.6
14 OC, EC	Endometrioid	I	III	67	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	b	4.9
15 OC, BC	Serous	High	II	53	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	e	7.5
16 OC, AEH	Endometrioid	I	I	28	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	M	U	U	e	16.3
17 OC, EC	Endometrioid	2	II	43	MSI-H	-	+	+	+	-	-	+	+	-	M	U	U	a, b, c, d, e	7.2
18 OC, EC	Endometrioid	I	I	39	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	a, b, d, e	28.7
19 OC, EC	Endometrioid	2	I	45	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	a, b	9.7
20 OC, EC	Mucinous		III	61	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	b, d	9.4
21 OC	Mucinous		I	62	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	e	5.3
22 OC, CC	Clear		III	63	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	rBG	4.0
23 OC, EC	Endometrioid	2	III	37	MSI-H	-	+	+	+	+	-	+	+	-	U	U	U	b	12.2
24 OC, EC	Endometrioid + clear	I	I	41	MSI-H	+	+	+	+	+	+	-	-	+	U	U	U	b, e	26.3
25 OC	Serous	High	III	51	MSS	-	-	-	-	-	+	+	+	+	U	U	U	e	3.0

Colored column showed the cases who are suspected Lynch syndrome.
 AC, Amsterdam II criteria; AEH, atypical endometrial hyperplasia; BC, breast cancer; CC, colorectal cancer; EC, endometrial cancer; IHC, immunohistochemistry; M, methylated; MSI, microsatellite instability; MSI-H, high MSI; MSP, methylation-specific polymerase chain reaction; MSS, microsatellite stable; OC, ovarian cancer; rBG, revised Bethesda guidelines; SGO, Society of Gynecologic Oncology; U, unmethylated.

(2) 重複癌における遺伝的背景の解析および臨床病理学的特徴の解析

上記の研究結果より、重複癌において Lynch 症候群が多い可能性が示唆され、子宮体癌卵巣癌の重複癌に着目した。重複癌症例 33 名を対象として、まず臨床病理学的背景を検討した。重複癌症例において子宮体癌は 31 名が類内膜癌、2 名が漿液性癌、卵巣癌は 23 名が類内膜癌、3 名が明細胞、4 名が漿液性、1 名が粘液性、1 名が漿液性、1 名が癌肉腫であった。このうち 9 名が MSI または dMMR を示した。このうち 5 名が遺伝学的検査より Lynch 症候群の診断に至り、2 名が検査中である。Lynch 症候群が確定した 5 名のうち組織が使用可能であった 4 名において、子宮体癌、卵巣癌両者より DNA を抽出し、全エクソン解析を行なった。結果としては、子宮体癌/卵巣癌の各原発は case1: 22.51/ 25.35, case2: 12.50/ 14.17, case3: 18.33/ 23.31, case4: 14.99/ 40.86 mutations/Mb と 10 mutations/Mb を超える多くの遺伝子変異を保有しており、Lynch 症候群の MMR 遺伝子の特徴を反映していた(図参照)。詳細な遺伝子変異の解析、各原発癌間での比較解析は現在解析中である。また、免疫組織化学においては、各症例が保有する MMR 遺伝子に見合う、dMMR を呈していた。その他の免疫細胞の浸潤、PD-L1 などの腫瘍免疫関連タンパクの発現に関しては、現在さらに解析を進めている。



(3) MSI status による婦人科癌の臨床病理学的解析

ペンプロリズムの治療選択としてのコンパニオン診断として保険適応となった MSI 検査につき、2019 年 1 月から 2020 年 2 月までに婦人科癌において施行した 67 症例を対象に、解析を行なった。対象患者の内訳は、子宮体癌 26 例、卵巣・腹膜・卵管癌 25 例(うち 2 例は子宮体癌との重複癌)、子宮頸癌 16 例、卵巣境界悪性腫瘍 1 例、腔癌 1 例であり、年齢中央値は 57 歳(24-87 歳)、19 例が初発進行例、48 例は再発例であった。再発例のうち生検や摘出などから再発腫瘍を MSI 検査に提出したものは 9 例のみであった。死亡例は 15 例あり、検査から死亡までは中央値で 109 日(7-249 日)であった。MSI-H を示したのは 3 例、類内膜癌の子宮体癌進行例、類内膜癌の子宮体癌および明細胞癌の進行卵巣癌の重複癌例、大細胞性神経内分泌癌(LCNEC)の子宮体癌進行例であった。MSI の陽性率は子宮体癌では 11.5%(3/26 例)、卵巣癌としては 4.0%(1/25 例)であり、子宮頸癌では認められなかった。MSI-H を示した子宮体癌進行例は、MLH1、PMS2 の発現低下を認め、MLH1 遺伝子の病的バリエーションを有するリンチ症候群、重複癌症例は MSH2、MSH6

の発現低下から、*MSH2* 遺伝子の病的バリエーションを有するリンチ症候群の診断に至ったものの、再発はなくペンプロリズマブ投与には至っていない。子宮体癌 LCNEC の症例 1 例のみが、標準治療抵抗性のためペンプロリズマブの投与に至ったものの、腸管穿孔、感染、多臓器不全を併発し、原病死に至った。MSI 検査を切り口として、婦人科癌を解析すると特に子宮体癌、卵巣癌において遺伝性背景を考慮する必要があると考えられる。今後、原発巣と再発巣における MSI status の変容、遺伝子変異のバリエーションの変化など解析を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeda Takashi, Komatsu Masayuki, Chiwaki Fumiko, Komatsuzaki Rie, Nakamura Kanako, Tsuji Kosuke, Kobayashi Yusuke, Tominaga Eiichiro, Ono Masaya, Banno Kouji, Aoki Daisuke, Sasaki Hiroki	4. 巻 10
2. 論文標題 Upregulation of IGF2R evades lysosomal dysfunction-induced apoptosis of cervical cancer cells via transport of cathepsins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 876-876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-019-2117-9	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 Anko Mayuka, Nakamura Masaru, Kobayashi Yusuke, Tsuji Kosuke, Nakada Sakura, Nakamura Yoshio, Funakoshi Takeru, Banno Kouji, Aoki Daisuke	4. 巻 46
2. 論文標題 Primary malignant melanoma of the uterine cervix or vagina which were successfully treated with nivolumab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 190 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14136	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 Takeda Takashi, Tsuji Kosuke, Banno Kouji, Yanokura Megumi, Kobayashi Yusuke, Tominaga Eiichiro, Aoki Daisuke	4. 巻 29
2. 論文標題 Screening for Lynch syndrome using risk assessment criteria in patients with ovarian cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 e29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3802/jgo.2018.29.e29	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 -

〔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 永井晋平, 辻 浩介, 安康真由香, 高橋孝幸, 小林佑介, 山上 亘, 岩田 卓, 富永英一郎, 阪埜浩司, 青木大輔
2. 発表標題 当院における子宮癌肉腫症例の術前子宮内膜細胞診に関する臨床的検討
3. 学会等名 第60回 日本臨床細胞学会総会(春期大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯島茂異人, 阪埜浩司, 辻 浩介, 小林佑介, 富永英一郎, 長谷川純崇, 青木大輔
2. 発表標題 ヒト子宮頸癌細胞に対する量子線治療による免疫調節因子の発現変化
3. 学会等名 第37回 日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iijima M, Okonogi N, Banno K, Tsuji K, Kobayashi Y, Tominaga E, Hasegawa S, Aoki D
2. 発表標題 Postirradiation PD-L1 expression and low tumor-infiltrating CD8+ cytotoxic lymphocytes are predictors of an improved prognosis after carbon ion radiotherapy for uterine cervical adenocarcinoma
3. 学会等名 Royal College of Obstetricians & Gynaecologists (RCOG) World Congress 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda T, Komatsu M, Banno K, Tsuji K, Kobayashi Y, Tominaga E, Sasaki H, Tanaka M, Aoki D
2. 発表標題 Insulin like growth factor 2 receptor act as a prognostic biomarker and behaves as an oncogene escaping from lysosomal dysfunction-induced apoptosis in cervical cancer
3. 学会等名 Royal College of Obstetricians & Gynaecologists (RCOG) World Congress 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda T, Komatsu M, Chiwaki F, Sera A, Tsuji K, Kobayashi Y, Tominaga E, Banno K, Sasaki H, Aoki D
2. 発表標題 Targeting casein kinase 2 disrupts intracellular trafficking of IGF2R and lysosomal homeostasis and induced cell death in cervical cancer
3. 学会等名 The 6th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO 2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iijima M, Okonogi N, Banno K, Tsuji K, Kobayashi Y, Tominaga E, Hasegawa S, Aoki D
2. 発表標題 Post-irradiation PD-L1 expression predicts better prognosis after carbon ion radiotherapy in uterine cervical adenocarcinoma
3. 学会等名 The 6th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO 2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田 貴, 中村加奈子, 小松将之, 千脇史子, 辻 浩介, 小林佑介, 富永英一郎, 阪埜浩司, 佐々木博己, 青木大輔
2. 発表標題 子宮頸がんに対する治療戦略構築のための新規予後相関バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第7回婦人科がんバイオマーカー研究会 学術集会
4. 発表年 2019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