

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07780

研究課題名(和文) 婦人科癌の重複癌症例に対する マルチ遺伝子パネル検査によるがん関連遺伝子の解析

研究課題名(英文) Development of multigene gene test for analysis of cancer-related genes associated with gynecologic double cancer

研究代表者

楠木 総司 (Kusunoki, Soshi)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50459103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：RNAの発現パターンを転移症例と重複癌症例で比較すると、転移症例では原発腫瘍と転移部腫瘍で同じ発現パターンを示し、重複癌ではそれぞれの原発腫瘍組織で異なる発現パターンを認めた。また、転移腫瘍組織で優位に発現する遺伝子variantを検証すると、ERCC, SPEN, DICER1, ATRのvariantが優位に発現していることが示された。さらに、同一症例のDNAを用いてInfinium Methylation EPIC Bead Chipを用いてメチル化定量解析を実施した結果、転移症例では一致、重複癌では不一致のエピゲノムパターンを示し、RNAseqと同様の傾向を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

婦人科悪性腫瘍における若年発症および重複癌の代表例は遺伝性乳癌卵巣癌症候群やリンチ症候群であり、近年その遺伝子変異の頻度や治療法について研究が進められている。しかし一方で、遺伝性乳癌卵巣癌症候群やリンチ症候群以外の同時性・異時性の重複癌についての報告は少なく、原因遺伝子の特定には至っていない。本研究では、婦人科悪性腫瘍の同時もしくは異時性の重複癌症例を特異的に抽出し、マルチ遺伝子パネル検査を用いて網羅的に癌関連遺伝子の解析を実施することによって、重複症例における子宮体癌と卵巣癌の癌種に共通の遺伝子異常の解析から発がん機構の解明、臨床所見、予後について検討することを目指す。

研究成果の概要(英文)：Comparing the RNA expression patterns between metastatic cancers and double cancers the same expression pattern was observed in the metastatic cases, and different patterns were observed in the double cancer cases. In addition, by the variant analysis it was shown that the ERCC, SPEN, DICER1, and ATR variants were more significantly expressed in metastatic tumor tissue. Furthermore, as a result of performing methylation quantitative analysis using the Infinium Methylation EPIC Bead Chip using the DNA of the same cases, it is indicated the same pattern as RNAseq, the same methylation pattern was observed in the metastatic cases, and different patterns were observed in the double cancer cases.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：重複癌 子宮体癌 卵巣癌 転移 遺伝子パネル

## 1. 研究開始当初の背景

婦人科癌領域で広く認知されているのは若年性の子宮体癌と卵巣癌の重複である。ここで臨床上最も問題となるのは若年発症という点である。なぜなら若年発症の場合、卵巣の温存の可否による妊孕性維持が問題となる。また、卵巣摘出に伴う卵巣機能欠落により女性の長期予後の増悪も指摘されている。米国の Nurses' Health Study によって、45 歳未満の症例に対する卵巣摘出は、冠動脈疾患発症のリスクを増加(HR:1.26, 95%CI 1.04~1.54)させると報告している。また、予防的な卵巣摘出術は、卵巣癌および乳癌の発症率は減少したが、肺癌、脳卒中の発症率は増加し、全原因による死亡率も増加することが示され、「予防的卵巣摘出術が患者にメリットをもたらす年齢はない」と結論づけられている(Parker WH et al. Obstet Gynecol 2009; 113: 1027-1037)。本邦の子宮体がん治療ガイドライン(2013)では、子宮体癌の初回治療において原則として両側付属器摘出術をおこなうこと(グレード A: 施行が強く勧められる)とされ、卵巣温存に関しては高分化型で筋層浸潤の浅い若年症例では卵巣温存に伴う危険性を十分に説明した上で温存が考慮される(グレード C1: 施行を考慮しても良いが、未だ科学的根拠は十分でない)。すなわち、卵巣温存に対する明確な基準は現時点では確立しておらず、長期予後や妊孕性を考慮すべき若年発症症例に対する治療法選択のエビデンスは乏しい。本研究では遺伝子発現に着目し、治療法の個別化の根拠となるエビデンスの確立を目指す。

## 2. 研究の目的

子宮頸がんは HPV 感染を契機に発症し、発症年齢は他のがん種と比較しても若く、40 歳未満の女性において最も高い罹患率を有する悪性腫瘍は子宮頸がんである。一方、子宮体癌、卵巣癌の発症年齢は 50 代半ばであり閉経期以降の女性に好発する。

しかしながら、これら婦人科悪性腫瘍を若年で罹患しただけでなく、その後の経過において再度悪性腫瘍を発症、もしくは過去に悪性腫瘍の既往を有する場合は臨床上散見される。これらの患者集団においては、ある特定のがん遺伝子が関与することで同時もしくは異時に悪性腫瘍が発生している可能性が考えられる。婦人科悪性腫瘍における若年発症および重複癌の代表例は遺伝性乳癌卵巣癌症候群やリンチ症候群であり、近年その遺伝子変異の頻度や治療法について研究が進められている。しかし一方で、遺伝性乳癌卵巣癌症候群やリンチ症候群以外の同時性・異時性の重複癌についての報告は少なく、原因遺伝子の特定には至っていない。本研究では、婦人科悪性腫瘍の同時もしくは異時性の重複癌症例を特異的に抽出し、マルチ遺伝子パネル検査を用いて網羅的に癌関連遺伝子の解析を実施することによって、重複症例における子宮体癌と卵巣癌の癌種に共通の遺伝子異常の解析から発がん機構の解明、臨床所見、予後について検討することを目指す。

## 3. 研究の方法

重複癌と転移性癌の分子生物学的因子の相違を利用したマルチ遺伝子パネルを設計し、正確な病期診断に基づく適切な妊孕性温存および治療選択を実現させるため、次の 3 つの目標を定めた。

1) 癌原発巣の凍結検体から抽出した核酸を用いた全エクソンシーケンスによるパネル遺伝子候補の決定

2) 癌原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋検体から抽出した核酸を用いた候補パネル遺伝子の検証

3) 重複癌と転移性癌を判別するマルチ遺伝子パネルの設計

以下は目標達成のための研究内容である。

【研究項目 1】癌原発巣の凍結検体から抽出した核酸を用いた全エクソンシーケンスによるパネル遺伝子候補の決定

子宮体癌と卵巣癌の重複もしくは転移症例の癌原発巣凍結検体を用いて、合計 10 症例程度を目安に全エクソンシーケンスを実施する。リファレンスとしては、同一の対象患者から血液検体を採取して用いる。これらの解析結果から、重複癌と転移性癌を判別するマルチ遺伝子パネルに包含すべき候補遺伝子を探索する。ただし、実際の遺伝子変異率等を考慮し、実施した全エクソンシーケンスでは有為な相違を認めなかった場合を想定し、これまでに蓄積されてきた公共データベースや文献を参照することでも候補遺伝子を探索する。具体的には、APEX1、APLF、ATX、EME1、FANCL、FANCM、MAD2L2、PARP2、PARP3、POLN、RAD54L および SMUG1 の 12 の DNA 修復遺伝子(Oncotarget. 2017 Aug 1; 8(31): 50930-50940.)などを候補遺伝子として考慮する。

【研究項目 2】癌原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋検体から抽出した核酸を用いたパネル候補遺伝子の検証

子宮体癌と卵巣癌の重複もしくは転移症例の癌原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いて、合計 20 症例程度を目安に研究項目 1 において抽出されたマルチ遺伝子パネル候補遺伝子の判別精度検証を行う。リファレンスとしては、研究項目 1 と同様に、同一の対象患者から血液検体を採取して用いる。さらに、これまでに蓄積されてきた公共データベースに参照するこ

とで候補遺伝子の生物学的な意味づけを強化する。

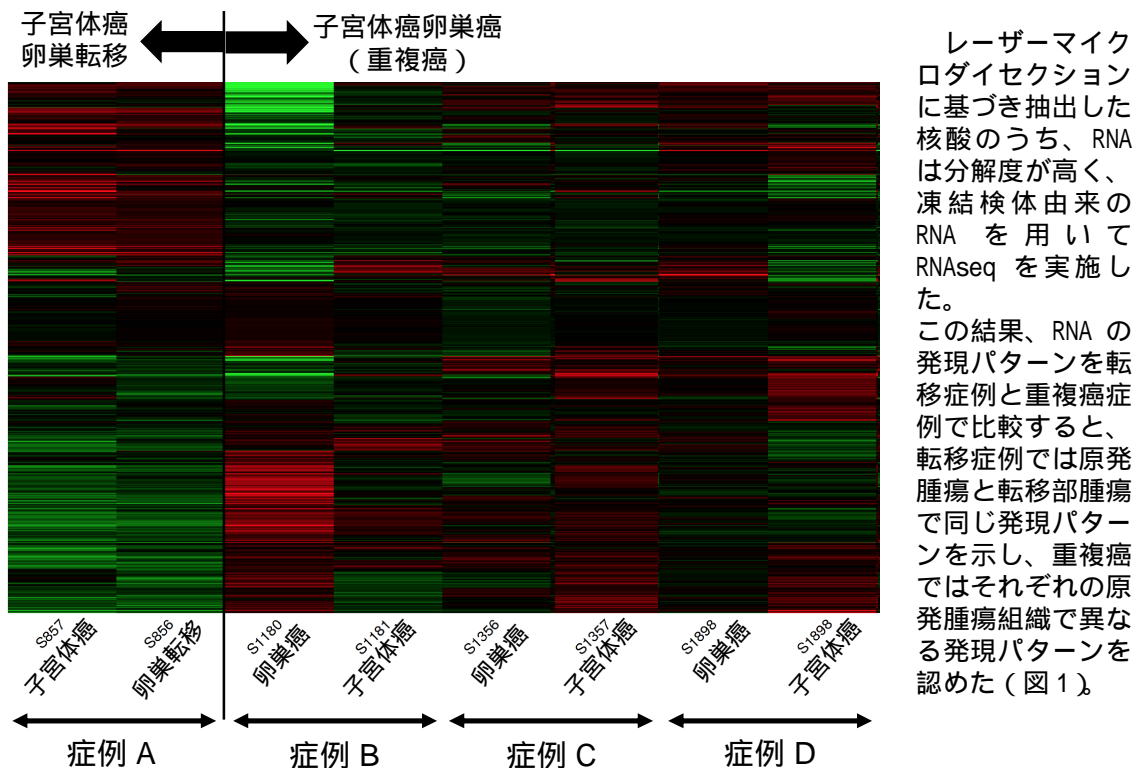
### 【研究項目3】重複癌と転移性癌を判別するマルチ遺伝子パネルの設計

上記で得られたシーケンスデータのバイオフィンフォーマティクス解析を施行し、重複癌と転移性癌を判別するマルチ遺伝子パネルを設計する。さらに、これまでに蓄積されてきた公共データベースに参照することで、パネルに包含された遺伝子の制御や生物学的な意味づけを強化する。具体的には、FANTOM、ENCODE、Roadmap、そしてPubmed やその他の様々な公共データベースを最大限に活用する。臨床データとも紐づけて解析を行うことで、予後予測などに活用できる可能性を検討する。

## 4. 研究成果

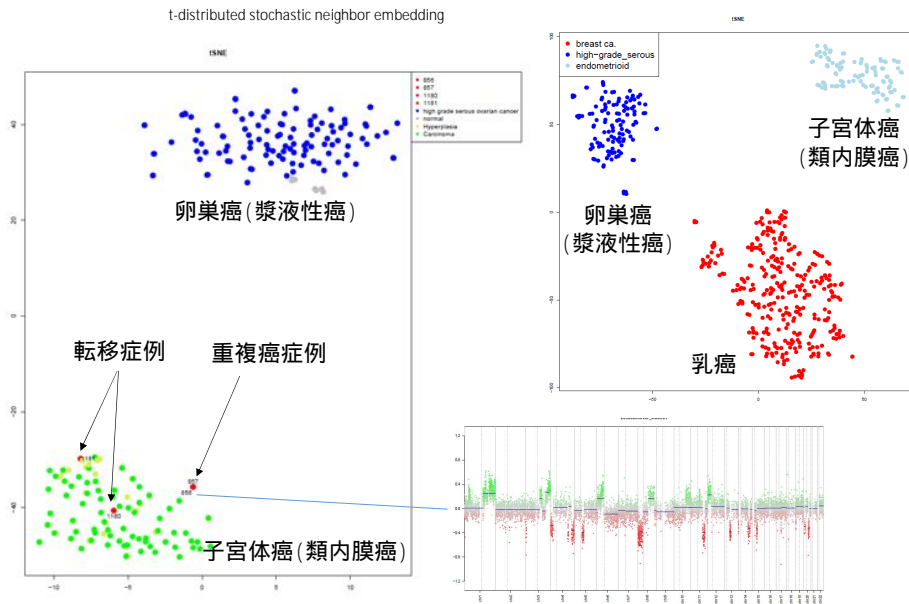
子宮体癌卵巣癌の重複癌と子宮体癌の卵巣転移症例の判別に寄与する診断マーカー遺伝子の抽出のため、重複癌症例と子宮体癌の卵巣転移症例における発現遺伝子を比較し、変異あるいは発現差のある遺伝子候補の抽出を試みた。

しかし、子宮体癌において、腫瘍が原発巣に局限する臨床的I期における卵巣癌の合併は5%程度と症例頻度としては極めて少ない。すでに凍結検体として保存し、オプトアウトにて本研究への同意を得た症例のうち、重複癌かつ子宮体癌、および卵巣癌の双方の検体を採取保管してある重複癌症例3検体、子宮体癌卵巣転移症例1検体を収集し、腫瘍組織より核酸を抽出した。さらに当院で婦人科癌手術を施行した症例年間300症例の病理診断結果を後ろ向きに約10年分探索し、子宮体癌卵巣癌同時発症症例9症例、および子宮体癌卵巣転移症例7症例を抽出した。これらのFFPEブロックから作成した薄切切片から腫瘍組織部分をレーザーマイクロダイセクションで腫瘍部分のみを切り抜き、これより各腫瘍部位に特異的な核酸抽出を実施した。



(図1) 転移性癌と重複癌の遺伝子発現パターンの比較

さらに、これらの凍結検体由来のDNAを用いて、重複癌症例1症例(症例B)、転移症例1症例(症例A)を用いてInfinium Methylation EPIC Bead Chipを用いて85万のCpG sitesのメチル化を定量解析を実施した。また卵巣癌、子宮体癌に関するデータベースのInfinium Methylation EPIC Bead Chip解析データをリファレンスとして使用しエピゲノム解析も実施した。この結果、卵巣癌と子宮体癌では全く独立したクラスターを示すことが示され、転移症例では一致するエピゲノムパターン、重複癌では不一致のエピゲノムパターンを示すことが明らかとなった(図2)。この解析結果では、転移症例では同一メチル化パターン、重複癌では異なるメチル化パターンを示すことが明らかとなったが、リファレンスとして用いたEPIC Beads Chipアレイデータでは卵巣癌は漿液性癌、子宮体癌では類内膜癌のデータのみであり、サブタイプごとの検証に関しては未検討であり、今後追加解析の予定である。



しかしながら、RNAseq のパターンと同様にメチル化プロファイルとコピー数解析も転移腫瘍と重複癌では異なるパターンを示しており、これらのパターン解析により両者が鑑別できる可能性が示唆された。

さらに、RNAseq データから転移腫瘍組織で優位に発現する遺伝子 variant を検証すると、ERCC, SPEN, DICER1, ATR の variant が優位に発現していることが示された。現在、FFPE 検体由来の核酸の抽出量不足から再抽出を実施しており、追加症例を加えた症例数で再度 RNAseq および EPIC Bead Chip アレイ解析を実施し検証を行う。なお、本研究では大学院生を積極的に参画させ、若手育成も含めて継続し、研究目標の達成を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	江口 英孝  (Eguchi Hidetaka)  (00260232)	順天堂大学・大学院医学研究科・先任准教授   (32620)	
研究分担者	平山 貴士  (Hirayama Takashi)  (20816962)	順天堂大学・医学部・助教   (32620)	
研究分担者	藤野 一成  (Fujino Kazunari)  (40543666)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	
研究分担者	吉田 恵美子  (Yoshida Emiko)  (90825788)	順天堂大学・大学院医学研究科・助教   (32620)	

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