

機関番号：31201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791158

研究課題名 (和文) 子宮内膜癌の予後改善を目指した単一癌腺管の分子病理学的解析

研究課題名 (英文) Molecular pathological analyses of single tumor gland using crypt isolation method in 25 endometrial carcinoma patients

研究代表者

永沢 崇幸 (NAGASAWA TAKAYUKI)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：10453309

研究成果の概要 (和文)：腺管分離法を用いて、子宮内膜癌 (類内膜腺癌) 25 例の単一癌腺管の分子病理学的解析を行い、また、分子異常の形態と治療効果及び予後との関連を検討した。腺管分離法を用いない従来法サンプルと、腺管分離法を用いた代表サンプルにおける LOH 頻度を比較すると、多くの領域において後者に高頻度に LOH が認められ、このことは腺管分離法によって解析の感度が高められたことを示唆する。局所再発症例を除けば、治療中の癌の進行もしくは治療後の再発は 4 例で認められた。遺伝子異常の形態の観点のみから考えると、3 例では複数の領域で LOH を有し、かつ単一癌腺管間で多様性が認められている。残りの 1 例では代表サンプルにこそ LOH を認めないが、単一癌腺管サンプルの一部に LOH を認めた。少なくとも単一癌腺管で 5 q 領域に LOH を有するという事は 4 例に共通して見られた。5 q での LOH は子宮内膜癌の発癌における役割としては低い、予後不良因子である可能性が示唆される。25 例中 16 例 (64%) に単一癌腺管間に多様性を認め、子宮内膜癌が高頻度で異なる分子異常を有した多様な単一癌腺管によって構成されていることが明らかとなった。また、個々の癌腺管の遺伝子異常の形態が化学療法に対する感受性、抵抗性と関係があることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We analyzed molecular abnormalities of single tumor glands using crypt isolation method in 25 endometrial endometrioid adenocarcinoma patients. In addition, we investigated the relation between the form of molecular abnormalities among single tumor gland and the disease prognosis. The frequency of LOH in the pooled gland sample obtained using crypt isolation was higher in many loci than that in the sample obtained using the conventional method, in which crypt isolation was not used. This suggests that by analyzing a pure sample of only tumor glands obtained using crypt isolation, gene abnormalities that cannot be detected in samples obtained by the conventional method can be detected and that the analysis sensitivity is improved. With the exception of local recurrence, progression of cancer during therapy or recurrence after therapy was observed in 4 cases. From the view point of genetic abnormality, the 3 cases had LOH in a plurality of regions and heterogeneity among single tumor glands. Among the other case, although LOH was not found in the pooled gland sample, it was only found in some single tumor gland samples. All 4 cases had LOH in the 5 q loci at least in a single tumor gland. This suggests the possibility that although LOH in the 5 q has a minor role in endometrial carcinogenesis, it is a poor prognostic factor. Heterogeneity of gene abnormality between single tumor glands was confirmed in 16 (64%) of the 25 cases, indicating that endometrial carcinoma consists of various single tumor glands with different molecular abnormalities. In addition, it was suggested that the form of gene abnormalities in individual tumor glands is related to sensitivity and resistance to chemotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌、腺管分離、遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

本邦における子宮内膜癌の標準治療は手術療法及び化学療法である。手術療法後化学療法を行う症例のうち約90%は奏効するが、約10%は再燃または再発が認められる。これらの症例を解析することが予後の改善につながると考えられる。子宮内膜に発生する腺癌（以下、子宮内膜癌）は多数の単一癌腺管で構成されている。これらの癌腺管は、最初は単一の細胞から発生し、癌の進行過程において多くの分子異常を蓄積していると考えられる。しかしながら、これらの単一癌腺管の分子異常のパターンは一様ではなく、個々の腺管により異なっていることが推測される。この分子学的な異常の差異が癌の生物学的多様性、複雑性の重要な原因の一つになっていると考えられる。これまでの子宮内膜癌の遺伝子解析の報告では、間質を含んだ腫瘍組織を一塊として解析材料に用いることがほとんどである（以下、従来法）。この方法による腫瘍組織の遺伝子解析では各単一癌腺管に生じた遺伝子変化を解析することは困難である。従って同一腫瘍内の個々の単一癌腺管の遺伝子変化を評価するためには腫瘍組織から単一の癌腺管を得る必要がある。

腺管分離法は癌腺管と間質組織とを分離し、腫瘍組織から腺管のみを回収する方法であり、純粋な腺管を得ることができる。腺管分離法を用いることによって間質を排除し、より精度の高い遺伝子解析が可能になる。加えて、得られた個々の単一癌腺管を解析することによって同一腫瘍内に生じる単一癌腺管間の遺伝子変化の相違を比較することが可能となる。

発癌機序に関しては、現在のところ、loss of heterozygosity (LOH) 等の染色体の構造上の変化を主体とする異常 (chromosomal instability: CIN型) と、DNAの短い繰り返し塩基配列 (microsatellite) の変化を主体とする異常 (microsatellite instability:

MIN型) に大きく分けられている。消化管腫瘍の場合は前者の頻度が高く (80~90%)、後者は稀とされているが、子宮内膜癌においては MSI の頻度が比較的高いことが特徴とされている。MSI 陽性癌の場合、MSI そのものに発癌作用がある訳ではなく、ターゲット遺伝子とされる増殖や分化に関わる遺伝子の繰り返し配列に異常が生じることによって発癌するとされている。MSI 陽性癌では TGF  $\beta$  receptor II、BAX、IGF II receptor 等のターゲット遺伝子が知られており、個々の単一癌腺管においてこれらの遺伝子の異常パターンがどのように生じているかを知ることが、MSI 陽性癌の発癌メカニズムを知る上で極めて重要である。一方、遺伝子配列の変化ではない異常として遺伝子プロモーター領域のメチル化が知られており、これにより当該遺伝子の機能が不活化され、発癌に関与すると推測されている。特に子宮内膜癌ではミスマッチ修復遺伝子 MLH1 のプロモーター領域のメチル化が重要であり、その結果様々な遺伝子に変異を来とし、発癌の主要な役割を担っていることが指摘されている。

2. 研究の目的

上記の発癌メカニズムが個々の癌腺管でどのように生じているかについてはほとんど報告されていない。LOH、MSI 及び MSI ターゲット遺伝子変異、遺伝子プロモーター領域のメチル化等の観点から個々の単一癌腺管の分子異常の解析を行うことによって、子宮内膜癌が異なる分子異常を有した多様な単一癌腺管によって構成されていることを明らかにすること、またその分子学的異常の形態と予後との関連を検討することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腺管分離法

腺管分離は Nakamura らの方法に従って行う。子宮内膜癌新鮮手術標本より新鮮腫瘍組織片を採取する。組織片を剃刀で 2 mm 程度に細切れにし、それらを 30 mmol/L の ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) を含む CMF Hanks 溶液 (calcium- and magnesium-free Hank's balanced salt solution) 20ml に入れ、37°C で 30 分間加温振盪する。1,600 回転で 5 分間遠心分離し、分離腺管と残った間質を含んだ組織片を沈降させ、上澄みを捨てる。次に CMF Hanks 溶液を 20ml 加え、室温で 40 分間振盪後、同様に遠心分離を行い上澄みを捨てる。70%エタノールをよく攪拌しながら加えて固定する。実体顕微鏡 (SZ60; Olympus, Tokyo, Japan) 下に固定された腺管を観察選別し、癌腺管群を回収して 4°C で冷蔵保存する。

#### (2) サンプル作製

当科において手術を施行した子宮内膜癌症例で、十分な説明の上で同意を得られたものを対象とする。子宮内膜癌 (類内膜腺癌) 25 例を対象とした。新鮮手術標本の腫瘍中央部より、互いに近接した部位から腺管分離用サンプルと従来法サンプルを採取する。腺管分離用サンプルについては、上述の腺管分離法を用いて癌腺管を単離し DNA を抽出するためのサンプル (腺管分離による DNA 抽出用サンプル) と、組織標本作製用のサンプルの二群に分けて回収する。前者は更に癌腺管を 10 個以上まとめて回収し DNA を抽出する代表サンプルと、個々の単一癌腺管をそれぞれ 1 個ずつ 5 個のサンプルに分けて DNA を抽出する単一癌腺管サンプル (S1-S5) に分ける。後者は分離腺管の形態解析のため、パラフィン包埋して Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色標本を作成し、純粋な癌腺管であることを確認する。従来法サンプルについても型のごとく DNA を抽出する。正常サンプルは腫瘍より最も離れた部位の内層より採取し、型のごとく DNA を抽出した。形態像については採取したサンプルの一部より組織標本作製し、正常内膜組織であることを確認する。

#### (3) 遺伝子解析

##### ① Loss of heterozygosity 解析

子宮内膜癌症例より得られた正常内膜組織及び癌腺管 DNA サンプルにおいて、癌抑制遺伝子が位置する各領域、3p (FHIT)、5q (APC)、10q (PTEN)、13q (Rb)、17p (p53)、18q (DCC) の LOH 解析を、13 種のマイクロサテライトマーカー (D3S1234、D3S2402、D5S82、D5S127、D5S299、D5S346、D10S2491、D10S2492、D13S118、D13S153、TP53、D18S487、DCC MS-1) を用いて行う。プライマーの塩基配列はゲノムデータベース (<http://gdbwww.Gdb.org/gdb/>)

より得る。

Polymerase chain reaction (PCR) の反応液は、50-100 ng の DNA を鋳型とし、プライマー 25 pmol、及び Ampli Tag Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて全量 25  $\mu$ l に調製する。PCR は thermal cycler system 9700 (Applied Biosystems) を用い、94°C 30 秒、55-58°C 30 秒、72°C 30 秒を 25-30 サイクル行い、最後に 72°C で 10 分間反応させ増幅する。PCR 増幅サンプルに 3  $\mu$ l ホルムアミドと 0.5  $\mu$ l TAMRA 500 size standard (Applied Biosystems) を加え、310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてフラグメント解析を行う。癌腺管サンプルにおける各領域の評価は、2 つの対立遺伝子の面積比 (q-value) をもとに以下の式により算出する。

$$N = \text{normal sample} \\ T = \text{tumor sample}$$

N1, T1 は 2 つのアレルのピーク面積の一方を、N2, T2 はもう一方の面積を表す。各領域の allelic imbalance (AI) の評価を行い、正常サンプルとの比較において 40% 以上の変化を示したもの (q-value < 0.6) を LOH と

$$qLOH = \frac{T1:T2}{N1:N2} \text{ or } \frac{N1:N2}{T1:T2} \quad (0.00 < q\text{-value} < 1.00)$$

見なす。同一染色体領域内で少なくとも 1 つのマーカーに LOH を認めた場合、その染色体領域における LOH 陽性と見なす。正常サンプルにおいてピークが 1 つのみのもの

(homozygosity)、MSI を示したものは LOH の評価を行わない (not informative case)。

##### ② Microsatellite instability 解析

MSI 解析は前述のマイクロサテライトマーカーに加え、高感度マーカーである BAT25、BAT26 を用いて同様のフラグメント解析を行う。癌腺管サンプルにおいて、正常サンプルにはないピークを認めるものを MSI と評価する。

##### ③ MSI ターゲット遺伝子解析

MSI を認めた症例に対しては、MSI のターゲット遺伝子として TGF  $\beta$  receptor II、BAX、IGF II receptor、E2F4、MSH3、MSH6 の変異解析を同様のフラグメント解析により行う。

##### ④ メチル化解析

Methylation-specific PCR 法にてミスマッチ修復遺伝子 MLH1 のメチル化解析を行った。MLH1 のプロモーター領域のメチル化及び非メチル化特異的プライマー塩基配列は、過去の報告に従って作製する。また、ゲノムワイドのメチル化を検索するために MINT1、MINT2、MINT31 のメチル化解析も行う。上記の解析を行い、症例ごとに臨床病理学的項目 (年齢、組織型、分化度等) と単一癌腺管の分子異常との関連、再発再燃の有無との関連を解析する。

#### 4. 研究成果

腺管分離法を用いた単一癌腺管の分子病理学的解析が子宮内膜癌でも可能であった。25例中16例(64%)に単一癌腺管間に多様性を認めた。腺管分離法を用いない従来法サンプルと、腺管分離法を用いた代表サンプルにおける LOH 頻度を比較すると、多くの領域において後者により高頻度に LOH が認められた。このことは、腺管分離法を用いて純粋な癌腺管群のみを解析材料とすることによって、従来法では検出し得なかった遺伝子異常が検出可能となり、解析の感度が高められたことを示唆する。LOH 解析では、代表サンプルにおいて、10q の LOH 頻度が最も高く(42.9%)、次いで 17p (30.8)、18q (28.6%) で比較的高頻度に LOH を認め、子宮内膜癌の発生において重要な癌抑制遺伝子の存在が考えられた。一方、5q での LOH 頻度は最も低く(5.9%)、子宮内膜癌の発癌における役割は低いと推測される。

25例中10例(40.0%)に MSI を認めた。MSI タイプにおいて散発性に LOH がみられた。このことは MSI 陽性子宮内膜癌においては、MSI は初期に引き起こされ、LOH は後期に加わるものと示唆された。MSI ターゲット遺伝子の変異に関しては、単一癌腺管サンプルにおける多様性はほとんど認められなかった。MSI タイプ 10例中7例(70.0%)に MLH1 のメチル化を認めた。MLH1 免疫染色において、MLH1 タンパクの発現を検討したところ、MLH1 メチル化陽性の全例で MLH1 免疫染色陰性であり、タンパク発現の減弱が示された。このことから、MSI 陽性子宮内膜癌においては特に MLH1 のメチル化による不活化が発癌に密接に関連していると思われた。

異なった遺伝子異常を有する単一癌腺管で癌組織が構成されているということは、補助療法に対する感受性、抵抗性を分子病理学的に考える上で新たな重要な知見を示しているかもしれない。本研究において、治療中の癌の進行もしくは治療後の再発は5例で認められた。局所再発症例を除けば、LOH タイプから3例、その他のタイプから1例であり、そのうち3例は予後不良であった。一般的に MSI を有する子宮類内膜腺癌は予後良好とされているが、本研究でも同様の結果が支持された。上記4例は臨床病理学的に再発高リスク群ではあるが、遺伝子異常の形態の観点のみから考えると、LOH タイプの3例では複数の領域で LOH を有し、かつ単一癌腺管間で多様性が認められている。その他のタイプでは代表サンプルにこそ LOH を認めないが、このタイプの中では唯一、単一癌腺管サンプルの一部に LOH を認めた。興味深いことに、少なくとも単一癌腺管で 5q 領域に LOH を有するということは4例に共通して見られた。この共通点で特筆すべきは、前述のごとく 5q 領

域での LOH 検出頻度は最も低くわずか1例のみであり、これも腺管分離法を用いて単一癌腺管サンプルを解析することによってはじめて明らかにされたということである。このことにより、5q での LOH は子宮内膜癌の発癌における役割としては低い、予後不良因子である可能性が示唆される。

本研究により子宮内膜癌が高頻度で異なる分子異常を有した多様な単一癌腺管によって構成されていることが明らかとなった。また、個々の癌腺管の遺伝子異常の形態が化学療法に対する感受性、抵抗性と関係があることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

第60回日本産科婦人科学会学術講演会

(横浜、12-15/4/2008)

子宮内膜癌における腺管分離法を用いた単一癌腺管の分子病理学的解析  
永沢崇幸、菅井有、庄子忠宏、杉山徹

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

永沢 崇幸 (NAGASAWA TAKAYUKI)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：10453309

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：