

機関番号：32651  
研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2008～2010  
課題番号：20791170  
研究課題名（和文） 卵巣癌腹膜播種の分子生物学的機構解明と予後予測プログラムの構築  
研究課題名（英文） Cytokine Gene Expression Signature in Ovarian Cancer  
研究代表者  
矢内原 臨 (YANAIHARA NOZOMU)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20349624

研究成果の概要（和文）：腫瘍局所の免疫機構は癌の発生・進展に大きく関わる。本研究では、上皮性卵巣癌における免疫関連遺伝子発現を解析し、腫瘍局所免疫と臨床病理学的因子との関与を明らかにすることを目的とした。免疫関連遺伝子の網羅的発現解析により上皮性卵巣癌の病理組織型を特徴づける発現プロファイルを見いだした。特に明細胞腺癌ではTh2サイトカイン優位の発現パターンを呈し、そのユニークな臨床病態解明の一助と成りうる可能性が示唆された。また、12種の免疫関連遺伝子の発現プロファイルが漿液性腺癌における患者予後と関連することが明らかとなり、予後予測可能な発現プロファイル構築の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Host defense against tumors are controlled by several immunological mediators including cytokines that play an important role in host-tumor immune system conflict. In this study, we sought to clarify whether the cytokine gene expression profile could have clinical association with ovarian cancer development and /or progression. We found that a cytokine gene expression signature of ovarian cancer could distinguish the histological subtypes and prognosis. A unique expression pattern found in ovarian clear cell adenocarcinoma might be involved in the pathogenesis of this subtype of ovarian cancer.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は婦人科領域の中で最も予後の悪い腫瘍であり、特有な播種進展の様式を持つ。卵巣癌の予後改善のためには、発生や播種性病変を含む病巣進展に関わる分子機構の解明が急務である。上皮性卵巣癌の予後因子としては患者因子一年齢・全身状態(PS)、腫瘍因子一進行期・組織型・分化度、治療因子一残存腫瘍径・化学療法(薬剤の種類・投与量)などが一般的であるが、様々な腫瘍関連遺伝子・蛋白の発現の有無・強弱・パターンが新たな予後因子(腫瘍因子)として報告されている。一方、近年、新しい分子機構として腫瘍近傍の非腫瘍組織の持つ性格も転移能や予後に関与するという概念が着目されている(非腫瘍因子)。我々は肺癌を対象とした研究より、非腫瘍組織でのTh2 サイトカイン優位の発現パターンが、腫瘍細胞の進展・転移に影響を及ぼすことを確認した。卵巣癌においては、腫瘍組織におけるTh1 サイトカイン優位の発現パターンが独立した予後良好因子になることが報告されているが、非腫瘍組織を対象とした解析の報告はない。上皮性卵巣癌において非腫瘍因子という新たな概念が癌の分子機構解明、また予後因子として卵巣癌克服に貢献する可能性があると思われる。

## 2. 研究の目的

腫瘍局所の免疫機構は癌の発生及び進展に大きく関わることが知られており、卵巣癌においても各種サイトカイン遺伝子の発現異常と発癌・予後との関連が報告されているが全容は不明である。本研究は上皮性卵巣癌における免疫関連遺伝子発現を網羅的に解析し、腫瘍局所免疫と臨床病理学的因子との関与を明らかにする事を目的とした。卵巣癌における免疫系遺伝子の発現プロファイルを経験病期・予後などの臨床病理学的情報と対比・解析することで、卵巣癌の局所免疫機構の分子生物学的な解明、また、患者予後を予測可能な発現プロファイルを構築することを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床情報のデータベース化

東京慈恵会医科大学附属病院で外科的切除が施行された上皮性卵巣癌症例63例よりインフォームド・コンセントを得て収集した

腫瘍組織を解析対象とした。診療録等より各種臨床病理学因子として、患者因子一年齢・全身状態(PS)、腫瘍因子一進行期(FIGO進行期・pTNM分類)、治療因子一初回手術後残存腫瘍径・化学療法(投与量・投回数)、また、無増悪生存期間・全生存期間・転機についての情報をデータベース化した。

### (2) 卵巣癌組織における免疫関連遺伝子16種のmRNA発現解析

63例の卵巣癌患者より同意を得て採取した腫瘍組織より抽出したRNAを用いて、Real-time RT-PCR法(Applied Biosystems StepOnePlus Real-time PCR System)により以下に示す16種の免疫関連遺伝子及び内在性のコントロールとしてHuman 18S ribosomal RNAの定量的発現解析を施行した。

**TaqMan Cytokine Gene Expression Plate**  
interleukin 1 $\alpha$  (*IL-1 $\alpha$* ), interleukin 1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ), interleukin 2 (*IL-2*), interleukin 4 (*IL-4*), interleukin 5 (*IL-5*), interleukin 8 (*IL-8*), interleukin 10 (*IL-10*), interleukin 12 p35 (*IL-12p35*), interleukin 12 p40 (*IL-12p40*), interleukin 15 (*IL-15*), interferon- $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* )

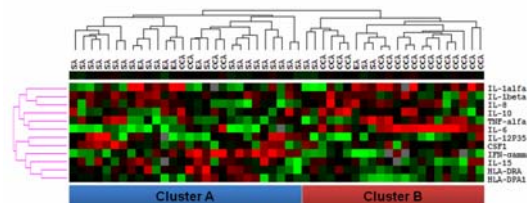
### TaqMan Gene Expression Assays

interleukin 6 (*IL-6*), MHC class II antigen, DR alpha (*HLA-DRA*), MHC class II antigen, DP alpha 1 (*HLA-DPA1*)

Lawデータは $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用いて相互比較可能な値へと変換後に解析に使用した。発現データはNormalization後、Gene Cluster及びTree Viewプログラムを用いてクラスタリング解析を行い、同解析にて得られたクラスター間の患者情報を対比することで、各種臨床病理情報に特異的な発現プロファイルの抽出を行った。

## 4. 研究成果

(1) 解析対象 16 遺伝子中、発現頻度が 30% 以下であった 4 遺伝子を除く 12 遺伝子を解析に使用した。サンプルセレクションとしてCT値の平均が35サイクル以上の13症例を除く50症例を解析対象とした。Real-time RT-PCR法により得られた相対的発現比を用いてクラスタリング解析を行ったところ、50症例はその遺伝子発現の類似性から大きく2つのクラスターに分類された(下図)。

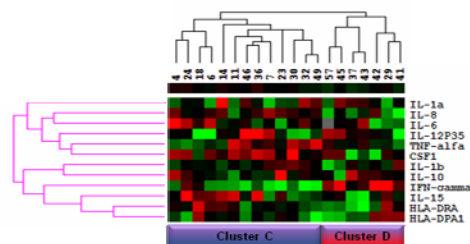


クラスターAには、漿液性腺癌 20 症例 (83%)、類内膜腺癌 4 症例 (80%) 及び明細胞腺癌 4 症例 (19%) がクラスターした。一方、クラスターBには漿液性腺癌 4 症例 (17%)、類内膜腺癌 1 症例 (20%) 及び明細胞腺癌 17 症例 (81%) が含まれた。このクラスターと組織型及び臨床病期との相関は統計学的に有意であった。その他の因子には有意な相関関係は認められなかった。また、クラスターBには、*IL-6*、*IL-8* 及び *IL-10* を含む Th2 サイトカイン遺伝子の発現が相対的に高い傾向を認めた。

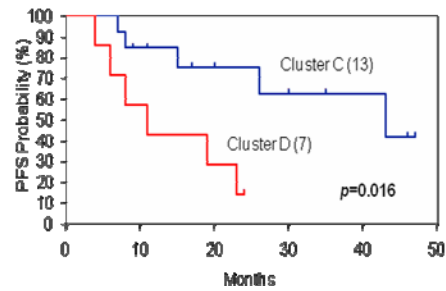
因子	A	B	P
年齢			
≤ 60	23	18	0.733
> 60	5	4	
組織型			
明細胞腺癌以外	24	5	<0.001
明細胞腺癌	4	17	
FIGO stage			
I+II	9	15	0.011
III+IV	19	7	
残存腫瘍			
≤ 1 cm	17	16	0.373
> 1 cm	11	6	

次に、各々の遺伝子について、組織型間での発現の違いを検討したところ、*IL-6* は明細胞腺癌において有意に漿液性腺癌に比べ発現が高い事が明らかとなった。*IL-6* は感染、損傷、炎症などで重要な役割を果たす Th2 サイトカインであり、卵巣癌においては、明細胞腺癌において高発現であることがすでに報告されている。また、卵巣癌患者の血清及び腹水における発現量は予後と相関することも確認されている。

(2) サイトカイン発現プロファイルと予後との相関関係を検討したところ、メインクラスター間 (A 及び B) において有意な予後との相関関係は認められなかった。しかしながら、クラスターA 内におけるサブクラスター間においては予後との相関傾向を認めた。そこで、クラスターA が漿液性腺癌有意なクラスターであることより、II 期から IV 期の漿液性腺



癌 20 症例のみを対象としたクラスター解析を行い得られた新たなクラスター (C 及び D) 間の予後との相関を検討したところ有意な



相関を認めた。

本解析にて得られた予後に影響を与えるサイトカイン発現パターンは、これまでの諸家の報告と相反する部分もあり、それぞれのサイトカイン発現に複雑な因果関係がある事が想定された。

(3) 本研究では、免疫関連遺伝子の網羅的発現解析により上皮性卵巣癌の病理組織型を特徴づける発現プロファイルを見いだした。特に卵巣明細胞腺癌では Th2 サイトカイン優位の発現パターンを呈し、そのユニークな臨床病態解明の一助と成りうる可能性が示唆された。また、12 種の免疫関連遺伝子の発現プロファイルが漿液性腺癌における患者予後と相関することが明らかとなった。症例の追加および independent validation などのさらなる検討が必要と考えられるが、免疫関連遺伝子の網羅的発現解析により予後予測可能な発現プロファイル構築の可能性が示唆された。

## 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 1 件)

1. Hashimoto T, Yanaihara N, Okamoto A, Nikaido T, Saito M, Takakura S, Yasuda M, Sasaki H, Ochiai K and Tanaka T

Cyclin D1 predicts the prognosis of advanced serous ovarian cancer

Experimental and Therapeutic Medicine 査読有、2 巻、2011、213-219

[学会発表] (計 2 件)

1. Nozomu Yanaihara

Cytokine Gene Expression Signature in Ovarian cancer

13<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer society

2010/10/23 Prague

2. 矢内原 隆

上皮性卵巣癌における免疫関連遺伝子の発現解析

第 62 回 日本産婦人科学会 学術講演会、2010/4/22 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢内原 臨 (YANAIHARA NOZOMU)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20349624