

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18216

研究課題名(和文) Bloom syndrome protein異常による子宮内膜発癌誘導作用の検討

研究課題名(英文) Examination of the effect inducing endometrial carcinogenesis of Bloom syndrome protein abnormality

研究代表者

小幡 武司 (Obata, Takeshi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：70748615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はBLM蛋白が子宮内膜癌発生の初期から関与している可能性を解明することを目的としている。BLM蛋白の免疫組織学的発現を正常子宮内膜100例、前癌病変である子宮内膜増殖症15例、子宮内膜癌109例に対して行った。正常子宮内膜において、非閉経期ではBLM蛋白の発現が腺上皮で観察されたが、閉経期では半数以上の検体でBLM蛋白の発現が部分的に低下することが分かった。さらに、子宮内膜増殖症および子宮内膜癌においてもBLM蛋白の発現低下が確認された。これらは、BLM蛋白の発現低下と閉経期における子宮内膜癌発生増加との関連を示唆する結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は病理検体と臨床情報を詳細に再検討し、子宮内膜癌の発生に対するBLM蛋白の役割に着目して実験を行った。手術検体を用いたBLM蛋白の免疫組織学的発現の結果からはBLM蛋白発現低下が閉経期の正常子宮内膜で起こっていること、さらに前癌病変の段階からBLM発現低下が確認されたことで、BLM蛋白の発現異常が閉経期の子宮内膜癌発生に関与していることが示唆される。これまで婦人科悪性腫瘍の発生とBLM蛋白との関連について検討報告がなく、かつ本研究の成果として、子宮内膜形態変化の初期段階での癌化リスクの判定評価法の発見に繋がることが予想される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the possibility that BLM protein is involved from the early stage of endometrial cancer development. BLM protein expression was examined by immunohistochemical method in uterine samples from patients with normal endometrium (n=100), endometrial hyperplasia as precancerous lesion (n=15) and endometrial cancer (n=109). In the normal endometrium tissues during premenopausal phase, BLM expression was observed in the glandular epithelial cells. On the other hand, the expression of BLM protein in the endometrium during menopausal phase was partially attenuated in more than half of this experimental samples. Furthermore, decreased expression of BLM protein was confirmed in endometrial hyperplasia and cancer samples. These results may suggest the association between decreased expression of BLM protein and increased incidence of endometrial cancer during menopausal phase.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮体癌 BLM

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌の診断は、超音波検査にて子宮内膜肥厚像や子宮内腔に腫瘤が疑われる患者に対し、子宮内膜細胞および組織の採取を行い、病理学的に癌細胞および癌の組織構築を確認して行っている。子宮内膜癌の発生において、形態学的な変化が起こる以前より、分子生物学的な変化が子宮内膜で起こっていると考えられているが、将来的な子宮内膜癌のリスクを形態学的変化が軽度な時期に的確に評価するパラメーターは報告されていない。子宮内膜形態変化の初期段階で癌化のリスクを正確に判定することが可能となれば、子宮内膜検査の頻度を患者ごとに調整することができる。これまで本研究申請者は、子宮体部類内膜癌の悪性度を規定する因子として p53 の免疫染色性について着目してきた。p53 が癌細胞の 10-50%しか染色されない通常 p53 陰性と判定される群において、p53 過剰発現群と同様の頻度でリンパ節転移・術後再発が確認された。以上から p53 蛋白の代謝カスケードに関係する可能性のある Estrogen receptor (ER) の発現を免疫染色学的に観察して同様の検討をおこなったところ、ER 発現と悪性度との間に相関を示した。しかしながら、患者のほとんどは閉経後に発症しており、類内膜癌の増悪化をエストロゲン依存機構で説明するのは疑問の余地があると考え、ER に並行して発現が変化する因子を探索する目的で、抗 ER 抗体に交差反応する可能性のある候補分子群について検索したところ、遺伝子の複製・修復に必須な RecQ ヘリカーゼファミリーに属する BLM に着目することとなった。Bloom syndrome は生下時からの小柄の体型、日光過敏性紅斑、免疫不全症を特徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患であり、なかでも際立った特徴は癌腫の合併が高率に認められることである。病因遺伝子は遺伝子の複製・修復に必須な RecQ ヘリカーゼファミリーに属する BLM 遺伝子である。BLM 遺伝子からは 1417 アミノ酸から成る分子量 159kDa のタンパク質が作られるが、ヘリカーゼ領域は分子のほぼ中央に位置している。ヘリカーゼは核内で機能すると考えられるが、細胞質で合成されたタンパク質が核膜を通過して核に入るには核移行シグナル(NLS)と呼ばれる塩基性のアミノ酸配列が必要であり、NLS は C 末端に近い領域に存在している。NLS が不完全なタンパク質は、たとえ生化学的酵素活性が正常であったとしても、核内への移行が妨げられ、細胞内で正常に機能できないと考えられている。BLM 遺伝子ノックアウトマウスでは様々な部位に悪性腫瘍が発生することが報告されているが、子宮内膜癌を含めて婦人科悪性腫瘍に関わる BLM の分子生物学的意義については報告例がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床検体を用いて BLM 機能異常の子宮内膜悪性化に対する役割を解析して、子宮内膜形態異常が軽度な段階において BLM の異常が将来的な子宮内膜癌発生のリスク因子である可能性を検討することである。本研究の成果は子宮体部類内膜癌の新たな発癌誘導因子の発見に繋がることを期待される。

3. 研究の方法

本研究は 2 年の研究期間中に BLM 分子に焦点をあて、ヒト子宮内膜の臨床検体を用いた検証を施行した。臨床検体としては、良性子宮疾患あるいは良性卵巣腫瘍に対して子宮全摘を行った正常子宮内膜症例、前癌病変である子宮内膜増殖症、子宮体部類内膜癌の各症例における代表的な腫瘍組織に対して BLM の免疫組織学的発現を解析した。腫瘍組織における BLM 蛋白の局在は ABC 法における免疫染色にて確認した。免疫染色は BLM の N 末端および C 末端を免疫原として作成された 2 種類の抗体を用いて検討を行った。BLM 免疫染色の判定基準は histoscore (H score) を用いて、腫瘍細胞あるいは内膜上皮細胞の核の染色面積と染色強度をかけ合わせて計算を行い、臨床背景および病理学的因子との関連を解析した。また、免疫染色で用いた抗体を使用して western blot 解析も行い、正常子宮内膜と子宮内膜癌における BLM 蛋白の検出も行った。そして、RT-PCR 法にて正常子宮内膜および子宮内膜癌における BLM の RNA 発現についても解析を行った。

4. 研究成果

臨床検体として、正常子宮内膜検体 100 例(非閉経期として増殖期 30 例と分泌期 30 例、閉経期 40 例)、前癌病変である子宮内膜増殖症 15 例、子宮体部類内膜癌 109 例に対して、免疫染色にて BLM 蛋白の発現を解析した。N 末端の抗体を用いた検討では、正常子宮内膜、子宮内膜増殖症、子宮内膜癌において腺上皮の核に BLM 蛋白が観察され、特に大きな違いは認められなかった。一方で、C 末端の抗体を用いた検討では、まず正常子宮内膜において非閉経期で腺上皮に BLM 蛋白の発現が観察された一方で、閉経期では半数以上の症例で部分的に BLM 蛋白の発現低下が確認された。正常子宮内膜 100 例に対して、C 末端の抗体を用いた免疫染色で算出した H score と子宮内膜癌リスクに関わると考えられている臨床的因子との相関関係を多変量解析したところ、閉経期であることが BLM 発現低下に関わる独立した因子であることが同定された。続いて、子宮内膜増殖症および子宮内膜癌では正常子宮内膜に比べて BLM 蛋白発現が有意に低下しており、さらに子宮内膜癌は子宮内膜増殖症に比べて有意に BLM 蛋白の発現が低下していることが

確認された。子宮内膜増殖症および子宮内膜癌をそれぞれ非閉経期と閉経期とに分けて BLM 蛋白発現を比較検討したが、ともに有意な差は観察されなかった。C 末端の抗体を用いた免疫染色で算出した H score 50 未満を Low expression、50 以上を High expression と分類して、子宮内膜癌の臨床経過との関連を検討したが、Disease free survival および Overall survival とともに有意な差は認められなかった。

また、子宮内膜癌の同一症例において、部位による BLM 蛋白の発現変化を C 末端の抗体を用いて解析したところ、癌から離れた正常内膜部位では BLM 蛋白の発現が保たれているのに対し、癌に近接した正常内膜部位の BLM 蛋白の発現が減弱していることが確認された。

C 末端の抗体を用いた Western blot 解析においては、非閉経期での正常子宮内膜で BLM 蛋白の発現が観察された一方で、子宮内膜癌において発現低下しており、免疫染色での実験結果に矛盾しない結果であることが確認された。

さらに、RT-PCR の実験では、正常子宮内膜と同様に、子宮内膜癌において BLM の RNA 発現が保たれていることが確認され、RNA から蛋白への翻訳後に BLM 蛋白発現低下をきたす何らかの変化が起きたものと推察された。

以上の結果をまとめると、閉経期の子宮内膜では、ある一定の割合で BLM 蛋白が発現低下しており、さらに前癌病変である子宮内膜増殖症の段階から BLM 蛋白発現が低下していることから、閉経に伴う子宮内膜の BLM 蛋白発現低下が閉経期に子宮内膜癌発生が増加する一因になっている可能性が示唆される。

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

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 子宮内膜癌の発症の予測方法	発明者 藤原浩、大黒多希子、中村充宏、水本泰成、小幡武司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-136995	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------