

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年04月10日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592147

研究課題名（和文）卵巣子宮内膜症のがん化に関与する腫瘍間質細胞の解析

研究課題名（英文）Analysis of tumor intestinal cell in carcinogenesis of endometriosis related ovarian cancer.

研究代表者

山澤 功二（YAMAZAWA KOJI）

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：60292687

研究成果の概要（和文）：

平成21年度は、1) 卵巣子宮内膜症 2) Atypical endometriosis 3) 明細胞腺癌の手術が施行される際に順次新鮮サンプルを採取し、測定充足数ごとに DNA アレイによる測定を随時行う。よって腫瘍間質細胞から産生される生理活性物質の相違を解析することにより、平成22年3月31日までに卵巣子宮内膜症からの発がんプロセスにおける腫瘍間質細胞の関与およびその責任分子を明らかとする。

研究成果の概要（英文）：

In 2009, when operations of ovarian-endometriosis, typical endometriosis, and clear-cell adenocarcinoma are underwent, fresh samples will be extracted one by one, and measurements by DNA array will be performed at any time when every number of samples are sufficient.

Then, by analyzing differences of the physiologically active substances produced from a tumor-stroma cell, the presence or absence of participation and responsibility of molecule from the tumor-stroma cell in the carcinogenic process from ovarian endometriosis will be clarified by March 2010.

交付決定額

(金額単位：円)

|      | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|------|-----------|-----------|-----------|
| 21年度 | 2,200,000 | 660,000   | 2,860,000 |
| 22年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 23年度 | 100,000   | 30,000    | 130,000   |
| 年度   |           |           |           |
| 年度   |           |           |           |
| 総計   | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

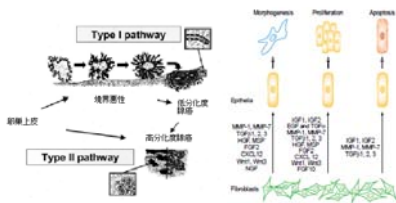
研究分野：医歯薬学

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：(1) 癌 (2) 蛋白質 (3) 細胞・組織 (4) 病理学

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の発生モデルは図 1 のような Dualistic model が提唱されており、de novo に発生する漿液性腺癌 Type II に対し、卵巣子宮内膜症（Endometrioma）、Atypical endometriosis（嚢胞線腫、腺線維腫）を発生母地として境界悪性腫瘍、類内膜型腺癌（明細胞腺癌）へと多段階に進展する Type I がある。また、卵巣子宮内膜症と卵巣癌の合併（15-50%）、悪性転化（0.3-1.6%）など臨床疫学的にもその関連が支持され、注目を集めている。さらに、卵巣子宮内膜症から発生する癌の殆どが類内膜型腺癌、明細胞腺癌で、病理学的な特徴がある点でも極めて興味深い。然しながら、正常から前癌病変、癌への分子機構は明らかではない。その解明は臨床で極めて重要で、卵巣子宮内膜症のうちどのような特徴を有する症例が癌へと進展するのかを峻別する方法の発見が切に望まれている。



子宮内膜症は良性疾患にも拘らず、浸潤、接着・増殖、血管新生さらには転移など癌によく似た特徴を有し‘Benign Cancer’と呼ばれることもあり、内膜組織に異常発現しその病態に深く関与している遺伝子およびその産物として、表 1 のようなホルモン、細胞増殖因子、血管新生因子、ケモカインなどが候補として知られている。

表 1.

|                                     |   |                                    |
|-------------------------------------|---|------------------------------------|
| Aromatase                           | Matrix metalloproteinases 3, 7, 11      | Thrombospondin 1                   |
| Endometrial bleeding factor (TGFβ4) | Tissue inhibitors of metalloproteinases | Vascular endothelial growth factor |

|                          |                                |                                   |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| Hepatocyte growth factor | Progesterone receptor isoforms | 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase |
| Integrin αvβ3            | Complement 3                   | Glycodelin                        |
| HOXA10, 11               | Glutathione peroxidase         | Leukaemia inhibitory factor       |

一方、いわゆる腫瘍間質微小環境（腫瘍間質細胞、血管内皮細胞、免疫応答細胞など）は単なる支持組織ではなく、腫瘍間質細胞は細胞外マトリックスとともに種々の分泌性生理活性物質（細胞増殖因子など）を発現し（図 2）、上皮細胞の変異、形質転換に直接的に、深く関与していることも知られている。また、乳癌においては腫瘍間質細胞自体に p53 遺伝子の変異があり、予後因子として極めて重要であることが明らかとなっている。

### 2. 研究の目的

Type I 卵巣癌は卵巣子宮内膜症、Atypical endometriosis（嚢胞線腫、腺線維腫）、類内膜型腺癌（明細胞腺癌）へと多段階に進展する。一方、腫瘍間質細胞は単なる支持組織ではなく、細胞外マトリックスとともに細胞増殖因子など分泌性生理活性物質を発現し、上皮細胞の変異、形質転換に関与している。本研究においてはこの腫瘍間質に着目し、卵巣子宮内膜症の癌化における責任因子を明らかとする。また、癌へと進展する症例を峻別できるかどうか検討する。

### 3. 研究の方法

（平成21年度）

#### 1) 卵巣子宮内膜症がん化に関与する細胞増殖因子候補遺伝子の特定

1) 子宮体癌、乳癌など他の悪性疾患を既往もしくは合併する症例は除外し、2) 東邦大学医療センター佐倉病院および関連施設でインフォームドコンセントの得られた卵巣子宮内膜症、Atypical endometriosis（境界悪性腫瘍）、類内膜型腺癌（明細胞腺癌）患者全員から開腹、腹腔鏡手術を問わず、新鮮病変組織および術前血清各2mlを網羅的に採取、保存した後、以下のような手順

で解析する。

① 目標症例数：

- 1) 卵巣子宮内膜症50例
- 2) Atypical endometriosisまたは境界悪性腫瘍10例
- 3) 類内膜型腺癌または明細胞腺癌10例 (既存症例を含む)

② 症例70例全例において、Laser microdissectionにて

- 1) 腫瘍間質組織 (上皮から5mm以内)
  - 2) 正常間質組織
  - 3) 腫瘍上皮組織
- を別個に保存する。

③ ②の1)は細胞増殖因子の Real-time PCR Array 解析、2)は無血清細胞培養用正常線維芽細胞作製に使用する。3)は1)にて特異的に産生されている因子に対応するレセプター発現解析に使用する。

とくに PCR Array 解析においては、Wnt1,3、Transforming growth factor-β1 (TGF-β1)、Hepatocyte growth factor (HGF)、Fibroblast growth factor (FGF)、Insulin-like growth factor (IGF)、Epidermal growth factor (EGF)、Nerve growth factor (NGF)といった腫瘍間質細胞から分泌される細胞増殖因子および子宮内膜症組織に異常発現すると既に報告されている生理活性物質に着目して解析する。

④ ① ② ③より明らかとなった卵巣子宮内膜症がん化責任分子を同定する。

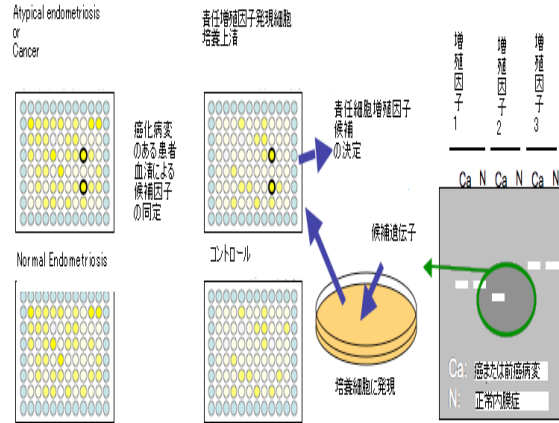
## 2) 患者血清中の細胞増殖因子の測定

1)にて判明したがん化責任因子について、卵巣子宮内膜症、Atypical endometriosis (境界悪性腫瘍)、類内膜型腺癌 (明細胞腺癌)患者血清中の活性をELISA法にて測定する。これらを比較することにより癌化の診断マーカーとなるか否かを統計学的に検討する。

(平成22年度)

## 3) 細胞培養による細胞増殖因子活性の確認

平成21年度の結果より明らかになった、正常卵巣子宮内膜症には発現せず、Atypical endometriosis (境界悪性腫瘍)または類内膜型腺癌 (明細胞腺癌)における腫瘍間質組織に発現している細胞増殖因子の候補遺伝子をクローニングし、発現ベクターを構築する。次に無血清培養線維芽細胞に発現させ、その培養上清中の細胞増殖因子活性を分析し、産生を確認する。



## 4) 子宮内膜腺上皮細胞の癌化の検討

不死化子宮内膜腺上皮細胞株と3)により責任細胞増殖因子を発現させた線維芽細胞を共培養し、不死化子宮内膜腺上皮細胞のWST-1 assayによる増殖活性および癌化の可能性を検討する。癌化の検討は、細胞培養足場依存性の消失、コロニー形成、ヌードマウスでの腫瘍形成などで確認する。さらに、同定された責任細胞増殖因子に対して、既知の各種阻害剤の効果を検討する。また、癌化した不死化子宮内膜腺上皮培養細胞にたいし、責任増殖因子遺伝子の si RNA による増殖抑制効果を検討する。

(平成23年度)

平成23年度は学会参加のみ。

## 4. 研究成果

卵巣子宮内膜症、Atypical endometriosis (境界悪性腫瘍)、明細胞腺癌各々における腫瘍間質細胞から産生される生理活性物質に着目し、卵巣子宮内膜症からの発がんプロセスにおける責任分子を同定することを目的とした。

平成21年度の等電点電気泳動、二次元電気泳動、Molecular Imager FX、PDQuestを用いた解析により、卵巣子宮内膜症、Atypical endometriosis (境界悪性腫瘍)、明細胞腺癌と進行するにつれ、2倍以上発現が増加するタンパクが腫瘍間質に8スポット存在することが確認できた。

また、平成22年度には、上記8スポットをPeptide Mass Fingerprinting解析のMascot解析により同定したところ、Cytokeratin 9であることが判明した。

このCytokeratin 9に関して、平成21年度に使用した同一症例標本を使用し免疫組織

染色を行ったところ、各々の腫瘍間質において、①卵巣子宮内膜症：陰性、②Atypical endometriosis：弱陽性、③明細胞腺癌：陽性、であった。

同時に同パラフィン封埋切片から RNA を抽出し cDNA へ変換後、Cytokeratin 9 の Primer に lightcycler にて増幅し、① ② ③間の発現を検討したが相違を認めなかった。以上より、平成 23 年度の検討により、卵巣子宮内膜症から明細胞腺がんが発生する段階に腫瘍間質由来の Cytkeratin 9 が関与している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)

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山澤 功二 (YAMAZAWA KOJI)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授  
研究者番号：60292687

##### (2)研究分担者

川島 秀明 (KAWASHIMA HIDEAKI)  
東邦大学・医学部・助手  
研究者番号：00339152

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：