

機関番号：15201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791558

研究課題名 (和文) 卵巣癌 3 期における FISH 法を用いた遺伝子コピー数の変化による新分類の試み

研究課題名 (英文) A trial of the genetic classification for stage 3 ovarian carcinoma with the change of the number of gene by FISH analysis

研究代表者

石川 雅子 (ISHIKAWA MASAKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50467718

研究成果の概要 (和文)：

*CCNE1* の遺伝子増幅と、既存の臨床病理学的因子、患者予後との関連について検討し、3期卵巣癌症例の予後を規定しうる遺伝子増幅の頻度による新分類 (Genetic classification) を試みた。これまでのところ、*Cyclin E1 (CCNE1)* の増幅が、予後不良因子となることが示唆された。*CCNE1* の遺伝子増幅は 20.4% に認められ、*CCNE1* の遺伝子コピー数と免疫染色の HSCORE は有意に正の相関を示した ( $r=0.522$ ,  $P<0.0001$ )。*CCNE1* 遺伝子増幅と卵巣癌患者の予後について Kaplan-Meier 法で検討したところ、*CCNE1* の遺伝子増幅症例は無病生存期間、全生存期間ともに有意に短く *CCNE1* の遺伝子増幅は卵巣癌患者の予後に重大な影響を与えている事が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

Our previous genome-wide analysis, single nucleotide polymorphism array identified *CCNE1 (Cyclin E1)* as the most frequent amplified gene in ovarian serous carcinomas.

We tried to establish the genetic classification for stage 3 ovarian carcinoma with the change of the number of gene by FISH analysis with investigation of the association between the amplification of *CCNE1* and clinicopathological factor and the prognosis of these patients.

Gene amplification was identified in 18 (20.4%) of 88 ovarian carcinomas. *CCNE1* copy number significantly correlated with *CCNE1* protein expression ( $r = 0.522$ ,  $P < .0001$ ). *CCNE1* amplification significantly correlated with shorter disease-free survival and overall survival ( $P < .001$ ). We indicated ovarian cancer tumors with *CCNE1* amplification make their poor prognosis for many patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	300,000 円	90,000 円	390,000 円
2010 年度	500,000 円	150,000 円	650,000 円
年度	円	円	円
年度			
年度			
総計	800,000 円	240,000 円	1040,000 円

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：癌、ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は早期診断が困難で、約 60 %は腹膜播種を伴った臨床進行期 3 期で発見される。卵巣癌 3 期の 5 年生存率は 40 %前後と考えられているが、同じ 3 期でも極めて予後不良な症例と長期生存している症例を、日常臨床においてしばしば経験する。日常臨床において卵巣癌患者を診察、治療する中で、同じ 3 期症例でも、上述したように予後が全く異なることに強く疑問を抱いた。申請者の指導医は卵巣癌における遺伝子増幅プロファイルの報告を、Digital Karyotyping、SNP array、dual color FISH 法を用いて行っており、近年、発癌に関する遺伝子異常については、真に意味のある変異 (Driver gene) と、付随的に生じた変異 (Passenger gene) とが存在すると考えられるようになった。遺伝子増幅は癌に特徴的な遺伝子変化であり、増幅領域には Driver gene が存在すると考えられている。すなわち、2007 年に報告された卵巣癌の遺伝子増幅 Profile に存在する遺伝子 (*Cyclin E1*, *RSF-1*, *Notch3*, *AKT2*, *PIK3CA*) は卵巣癌発生、進展に強く関っており、臨床病理学的因子、患者予後に影響を与えている可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

今回、我々は卵巣癌において最も遺伝子増幅の頻度が高い遺伝子群と報告された *Cyclin E1*, *RSF-1*, *Notch3*, *AKT2*, *PIK3CA* の遺伝子コピー数を、卵巣癌症例が多数プロットされた Tissue Microarray (以下 TMA) を用いて FISH 法で検討する事とした。さらに、3 期卵巣癌症例の予後を規定しうる遺伝子増幅の頻度による新分類 (Genetic classification) を試みる事とした。

## 3. 研究の方法

(1) インフォームドコンセントの得られた卵巣癌手術後の臨床検体を初代培養し、上皮細胞に対する鉄ビーズ付加上皮細胞特異抗体 (anti-EpiCAM-conjugated beads) とマグネットを用いたセルソーティングを用いて癌細胞のみの検体から DNA を抽出した。難治性症例 (予後不良例; 初回治療後 6 ヶ月以内の死亡症例) 約 10 例で Digital Karyotyping を用いて難治性卵巣癌における遺伝子増幅領域を同定した。当科関連病院での症例を含めた卵巣癌 (約 100 例) を使用した TMA を用いて dual color FISH 法にて大規模サンプルでの遺伝子増幅の頻度、予後等について検討した。

遺伝子増幅がみられた症例は網羅的な遺伝子発現解析を行い遺伝子増幅領域内の責任候補遺伝子を同定する指標とした。遺伝子

増幅領域の高発現遺伝子が同定されたら、臨床検体を用いて real-time PCR 法にて遺伝子発現プロファイルを作成し責任遺伝子を絞り込んだ。責任候補遺伝子は PCR 法を用いて遺伝子クローニングし、腫瘍増殖能を持たない正常卵巣表層上皮細胞株に安定遺伝子導入して細胞増殖能を検討し癌遺伝子としての機能について検討することとした。また、siRNA を用いた発現抑制解析を *in vitro*, *in vivo* で行い、本遺伝子が分子標的因子になりうるかどうか検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Digital karyotyping の結果

Digital Karyotyping を用いて卵巣癌の染色体 19 短腕に複数に遺伝子増幅領域を認めた。特に 19 p 12 領域には以前から癌遺伝子として報告のある *CCNE1* (Cyclin E1) が存在するため、*CCNE1* に焦点を絞り、卵巣癌症例での臨床病理学的検討、予後について検討した。

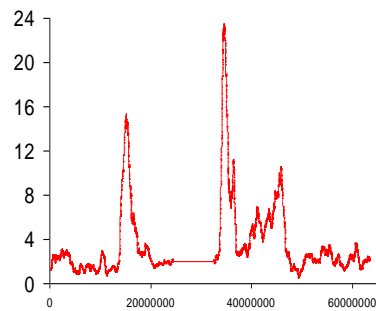


図 1. Digital Karyotyping にて卵巣癌の染色体 19 p 12 領域に *CCNE1* の遺伝子増幅を認めた。

### (2) *CCNE1* の遺伝子コピー数とタンパク発現との関連

① *CCNE1* の遺伝子増幅は 20.4% (18 例/88 例) に認められた。*CCNE1* の免疫染色は HSCORE で評価し中央値は 70 (0~353) であった。*CCNE1* の FISH 及び免疫染色の結果は図 2 に示した。

② *CCNE1* の遺伝子コピー数と免疫染色の HSCORE は有意に正の相関を示した ( $r=0.522$ ,  $P<0.0001$ ) (図 3)。

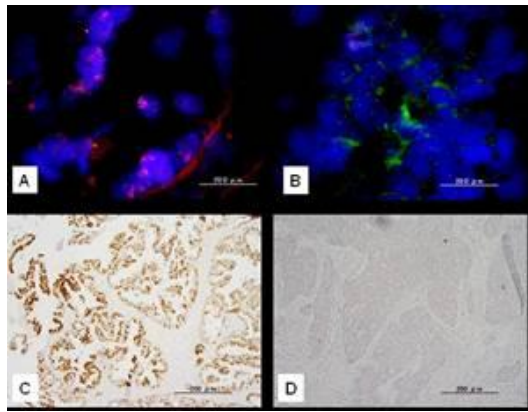


図2 FISHと免疫染色の結果。A. CCNE1 遺伝子増幅症例。B. CCNE1 正常例。C, CCNE1 タンパク高発現例。D, CCNE1 タンパク発現陰性例。

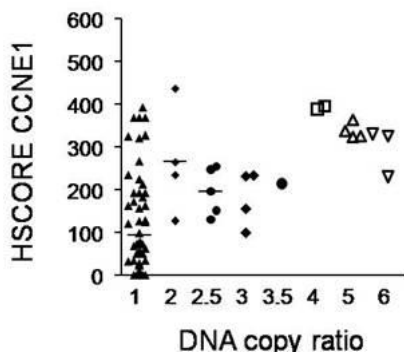


図3 CCNE1 の遺伝子コピー数と免疫染色の HSCORE は有意に正の相関を示した ( $r=0.522$ ,  $p<0.0001$ )

### (3) CCNE1 遺伝子増幅と卵巣癌患者予後

CCNE1 遺伝子増幅と卵巣癌患者の予後について Kaplan-Meier 法で検討したところ、CCNE1 の遺伝子増幅症例は無病生存期間、全生存期間ともに有意に短かった (図4)。免疫染色の HSCORE は中央値で2群に分けたところ、無病生存期間、全生存期間ともに有意差はなかった (図4)。

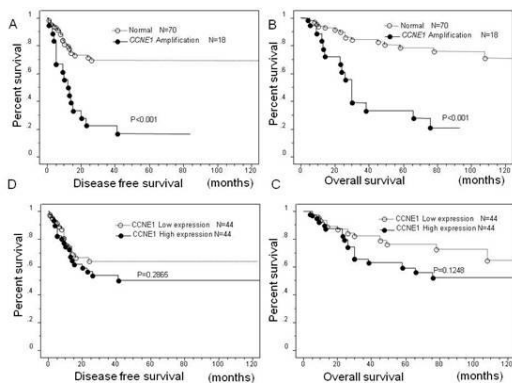


Figure 3

図4 CCNE1 遺伝子増幅、タンパク発現と卵巣癌患者の予後。Kaplan-Meier 法で検討した。

### (4) CCNE1 ノックダウンと細胞増殖抑制効果

①次に卵巣癌細胞株を用いて CCNE1 の機能解析を行った。CCNE1 の遺伝子増幅の状態と Western blotting によるタンパク発現の状態を示した (図5)。CCNE1 の遺伝子増幅を認めた症例は CCNE1 の SiRNA による遺伝子サイレンシングに極めて Sensitive に反応し細胞増殖抑制効果が顕著であった (図5)。興味深い事に CCNE1 タンパク発現を多く認めても CCNE1 の遺伝子増幅を認めない細胞株は CCNE1 の遺伝子増幅を認めた細胞株に比べて細胞増殖抑制効果は弱かった。

②この細胞増殖抑制効果は Annexin V を用いたアポトーシス、BRdU を用いた細胞増殖実験の両方に有意であった (図6)。

③また、この効果は細胞周期解析によりの G1 期の細胞周期停止に依存する事が明らかとなった (図7)。

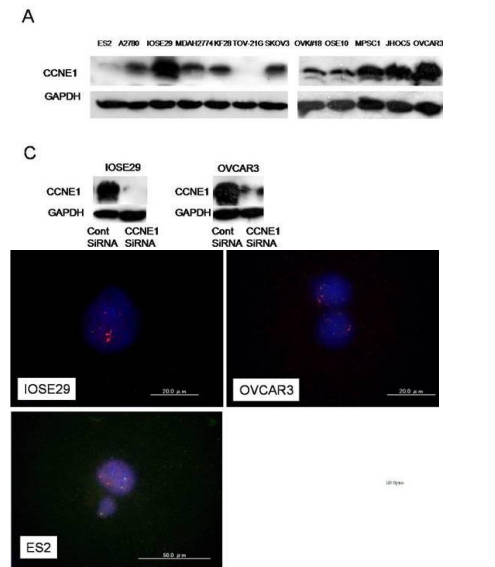


図5 図5-1, 2 CCNE1 の遺伝子増幅の状態と Western blotting によるタンパク発現の状態を示した。

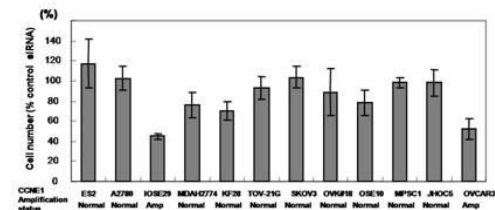


図5-3 CCNE1 の遺伝子増幅を認めた症例は CCNE1 の SiRNA による遺伝子サイレンシングに極めて Sensitive に反応し細胞増殖抑制効果が顕著であった。

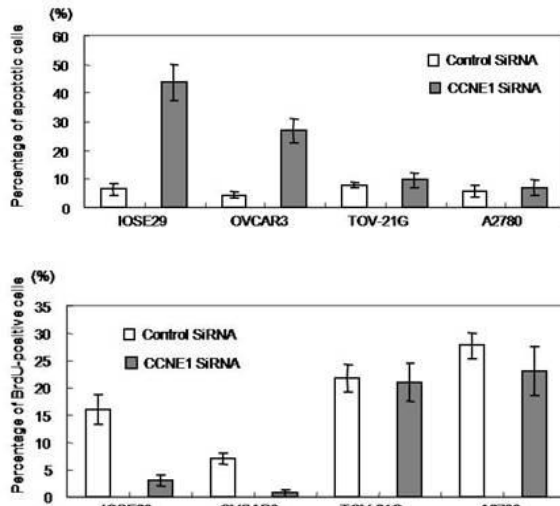


図6 *CCNE1* の遺伝子サイレンシングによる細胞増殖抑制効果は Annexin V を用いたアポトーシス、BrdU を用いた細胞増殖実験の両方に有意であった。

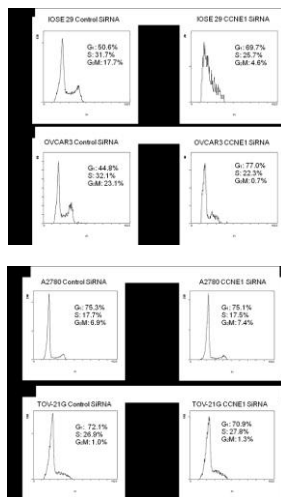


図7 *CCNE1* の遺伝子サイレンシングによる細胞増殖抑制効果は細胞周期解析によりのG1期の細胞周期停止に依存する事が明らかとなった。

(5) *CCNE1* 過剰発現と細胞増殖を促進する

*CCNE1* の遺伝子サイレンシングの結果を確認するために、逆に *CCNE1* 未発現の細胞株 ES2、TOV-21G に *CCNE1* を遺伝子導入した。*CCNE1* 安定発現細胞株は ES2、TOV-21G いずれもコントロールベクター導入株に比べて細胞増殖能が亢進していた (図8)。

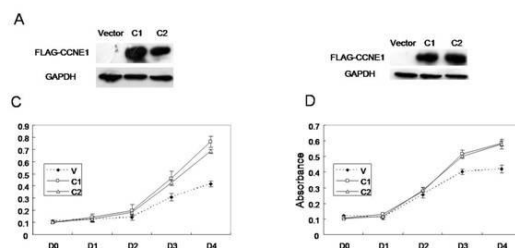


図8 *CCNE1* 安定発現細胞株は ES2、TOV-21G いずれもコントロールベクター導入株に比べて細胞増殖能が亢進していた。

(6) *CCNE1* の遺伝子増幅は卵巣癌患者の予後に重大な影響を与えている事が明らかとなった。また、*in vitro* の結果より、*CCNE1* 遺伝子増幅を示している症例に対しては *CCNE1* は有効な分子標的因子となる可能性が示された。

(7) 今後は、*in vitro* での検討を行うこと、またさらに *CCNE1* の機能解析を進め、*CCNE1* の薬剤抵抗性における役割について明らかにすることを目標とする。

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 18 件)

- ① Ishikawa M, Nakayama K, Mohammed Tanjimur Rahman, Munmun Rahman Katagiri A, Iida K, Miyazaki K. Functional and Clinicopathological Analysis of Loss of MKK4 Expression in Endometrial Cancer. *Oncology* 79; 238-46, 2011  
査読有
- ② Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Yeasmin S, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Miyazaki K. Biological role and prognostic significance of NAC1 in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 119(3):469-78, 2010  
査読有
- ③ Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Ishikawa M, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Aoki S, Miyazaki K. Microwave endometrial ablation is a highly efficacious way to emergently control life-threatening uterine hemorrhage. *Arch Gynecol Obstet.* 2010 May 13. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20464408.  
査読有
- ④ Nakayama K, Nagai Y, Ishikawa M, Aoki Y, Miyazaki K. Concomitant postoperative radiation and chemotherapy following surgery was associated with improved overall survival in patients with FIGO stages III and IV endometrial cancer. *Int J Clin Oncol.* 15(5):440-6, 2010  
査読有

- ⑤ Yeasmin S, Nakayama K, Katagiri A, Ishikawa M, Nakayama N, Miyazaki K. Exaggerated placental site mimicking placental site trophoblastic tumor: case report and literature review. *European Journal of Gynecological Oncology* 31(5):586-9, 2010  
査読有
- ⑥ Nakayama K, Ishikawa M, Nagai Y, Yaegashi N, Aoki Y, Miyazaki K. Prolonged long-term survival of low grade endometrial stromal sarcoma(LGESS) patients with lung metastasis following treatment with medroxyprogesterone acetate(MPA). *International Journal of Clinical Oncology* 15(2):179-83, 2010  
査読有
- ⑦ Ishikawa M, Nakayama K, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Miyazaki K. NAC1, a potential stem cell pluripotency factor: expression in normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. *International Journal of Oncology* 36(5):1097-103, 2010  
査読有
- ⑧ Yeasmin S, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Ishikawa M, Iida K, Otsuki Y, Kobayashi H, Nakayama S, Miyazaki K. Expression of nuclear Notch3 in cervical squamous cell carcinomas and its association with adverse clinical outcomes. *Gynecol Oncol.* 117(3):409-16, 2010  
査読有
- ⑨ Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, Miyazaki K. Gene amplification CCNE1 is related to poor survival and potential therapeutic target in ovarian cancer. *Cancer* 1;116(11):2621-34, 2010  
査読有
- ⑩ Yeasmin S, Nakayama K, Ishibasi M, Nakayama N, Miyazaki K. A case of bilateral pelvic lymph node involvement in stage I squamous cell carcinoma of cervix and a review of the literatures. *International Journal of Clinical Oncology* 14(6):564-7, 2009  
査読有
- ⑪ Yeasmin S, Nakayama K, Ishibasi M, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Aoki S, Kanaoka Y, Miyazaki K. Microwave endometrial ablation as an alternative to hysterectomy for the emergent control of uterine bleeding in patients who are poor surgical candidates. *Arch Gynecol Obstet.* 280(2) : 279-82, 2009  
査読有
- ⑫ Yeasmin S, Nakayama K, Ishibasi M, Oride A, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Miyazaki K. A case of exceedingly chemoresistant pure pleomorphic rhabdomyosarcoma of the uterus associated with a high serum LDH level. *European Journal of Gynecological Oncology* 29(5):518-22, 2009  
査読有
- ⑬ Nakayama K, Nakayama N, Ishibasi M, Yeasmin S, Fukumoto M, Miyazaki K. Fractional allelic loss as a potential biomarker of risk prediction in early-stage mucinous ovarian tumors of low malignant potential. *European Journal of Gynecological Oncology* 30(1):16-9, 2009  
査読有
- ⑭ Yeasmin S, Nakayama K, Ishibasi M, Katagiri A, Iida K, Manabe A, Nabika T, Nakayama N, Miyazaki K. Primary osteosarcoma of ovary. *International Journal of Clinical Oncology* 14(2):163-6, 2009  
査読有
- ⑮ Ishibasi M, Nakayama K, Yeasmin S, Katagiri A, Iida K, Nakayama N, Miyazaki K. Expression of a BTB/POZ protein, NAC1, is essential for the proliferation of normal cyclic endometrial glandular cells and is up-regulated by estrogen. *Clin Cancer Res.* 1;15(3):804-11, 2009  
査読有
- ⑯ 石川雅子、中山健太郎、Mohammed Tanjimur Rahman、Munmun Rahman、片桐敦子、飯田幸司、宮崎康二. RT直後より脳転移を含む多臓器転移をきたし初診後4ヶ月で死亡した子宮頸癌IIa期の一例  
*癌と化学療法* 38(1):133-7, 2011  
査読有
- ⑰ 石川雅子、中山健太郎、Yeasmin Shamima、片桐敦子、飯田幸司、中山真美、宮崎康

二

TC療法 (Paclitaxel+Carboplatin)に抵抗性を示したIc期の成熟嚢胞性奇形腫悪性転化の2症例  
癌と化学療法 37(4):747-52, 2010  
査読有

- ⑱ 石橋雅子、中山健太郎、折出亜希、Yeasmin Shamima、片桐敦子、飯田幸司、中山真美、宮崎康二  
VeIP療法が奏効したPEP(BEP)療法抵抗性卵巣未分化胚細胞腫の1例  
癌と化学療法 36(3):513-7, 2009  
査読有

[学会発表] (計6件)

- ① Ishikawa masako, Nakayama Kentaro, Yeasmin Shamima, Katagiri Atsuko, Miyazaki Kohji, A BTB/POZ gene, NAC-1, a tumor recurrence associated gene, as a potential target for taxol resistance in ovarian cancer. International Gynecologic Cancer Society 13<sup>th</sup> biennial meeting, 2010 October 23-26, Prague (Czech Republic)
- ② 石川雅子、中山健太郎、片桐敦子、長井裕、八重樫伸生、青木陽一、宮崎康二、MPA (酢酸メドロキシプロゲステロン)は、遠隔転移を伴う低悪性子宮内膜間質肉腫の長期担癌生存に寄与する  
第48回日本癌治療学会学術集会, 2010年10月28日, 京都国際会議場(京都府)
- ③ 石川雅子、中山健太郎、片桐敦子、飯田幸司、宮崎康二、新規転写制御因子NAC1は正常子宮内膜の増殖に関与し、エストロゲンにより発現制御される  
第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月22日, 大阪国際会議場(大阪府)
- ④ 石川雅子、中山健太郎、片桐敦子、Yeasmin Shamima、Mohammed Tanjimur Rahman、Munmun Rahman、宮崎康二、新規転写制御因子NAC-1は卵巣癌においてTaxol耐性と関連する  
第9回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会, 2010年9月10日, 大津プリンスホテル(滋賀県)
- ⑤ 石川雅子、中山健太郎、片桐敦子、長井裕、八重樫伸生、青木陽一、宮崎康二、MPA (酢酸メドロキシプロゲステロン)は、遠隔転移を伴う低悪性子宮内膜間質肉腫の長期担癌生存に寄与する  
第48回日本婦人科腫瘍学会学術講演会,

2010年7月8日, つくば国際会議場(茨城県)

- ⑥ 石川雅子、中山健太郎、ヤスミン シャミマ、片桐敦子、飯田幸司、宮崎康二、新規転写抑制因子NAC1は正常子宮内膜の増殖に関与し、エストロゲン(E2)により発現制御される  
第62回日本産科婦人科学会学術講演会, 2010年4月22日, 東京国際フォーラム(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 雅子 (ISHIKAWA MASAKO)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号: 50467718

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: