

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591843

研究課題名（和文）子宮体癌のオーダーメイド治療を目指したリンパ節転移の予測の試み

研究課題名（英文） New Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Patients with Endometrial Cancer using Exon-expression Microarray

研究代表者

首藤 聡子 (SUDO SATOKO)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：10399892

研究成果の概要（和文）：

子宮体癌患者において、術前に子宮内膜生検検体を持ちいてリンパ節転移リスクを予知するため、Exon Microarray・リアルタイム PCR を行いリンパ節転移バイオマーカーの探索を行った。リンパ節転移症例で発現亢進が確認された 5 遺伝子のうち、ANKRD36 (ankyrin repeat domain containing 36), CROP および MALAT-1 の 3 遺伝子が選抜された。ANKRD36 は腫瘍細胞の細胞質に、CROP および MALAT-1 は腫瘍細胞核に局在することが明らかとなり、ANKRD36 タンパク陽性例ではリンパ節転移の頻度が高い傾向にあることが示された。今後はこれら 3 分子の生物学的特性につき研究を継続する予定である。

研究成果の概要（英文）：

To predict lymph node metastasis using primary cancer tissue preoperatively, we explored putative biomarker genes of node metastasis in patients with endometrial cancer. Three up-regulated transcripts in node-positive group were picked up; ANKRD36 (ankyrin repeat domain containing 36), CROP and MALAT-1. Immunostaining analyses elucidated that ANKRD36 and CROP are localized in cytoplasm and nuclei of cancer cells, respectively. Furthermore, in node-positive group, ANKRD36 protein expression levels were significantly high compared with one in node-negative group. *In situ* hybridization showed MALAT-1 was localized in nucleus of carcinoma cells. Further analyses will be performed to clarify biological function of these 3 molecules which might be the putative node-positive biomarkers in endometrial cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

子宮体癌においてはリンパ節転移の有無は重要な予後因子であり、後腹膜リンパ節郭清は臨床進行期の正確な決定と術後補助療法の個別化に重要な役割を担っている反面、術中出血量の増加、手術創の拡張のほか、下肢のリンパ浮腫、リンパ嚢胞の形成など術後の後遺症がおこりうる。

そこでわれわれは、臨床パラメータによる LNM スコアを考案し、リンパ節転移リスクを術前に評価し、術式の個別化に役立てる試みを行ってきた。しかしながら、LNM スコアも万能ではなく、低リスク症例でもリンパ節転移率は 3%に認められる。

2. 研究の目的

LNM スコアと組み合わせてより正確にリンパ節転移を予測するため、子宮体癌リンパ節転移のバイオマーカーとなりうる遺伝子の検索を Affimetrix Exon Microarray およびリアルタイム PCR をもちいて行い、KIAA1641, ANKRD36, VPS13A, CROP, MALAT-1 の 5 遺伝子を選別し、これら 5 遺伝子が子宮体癌におけるリンパ節転移バイオマーカーとなりうるかについて臨床検体を用いて引き続き検証し、選抜されたバイオマーカーがリンパ節転移に関与する分子生物学的機序について解明する。これらバイオマーカーが、乳癌における MammaPrint®や OncotypeDX™のような診断キットの開発につながり、子宮体癌のオーダーメイド治療のクオリティの向上をもたらすことが本研究の究極の目標である。

3. 研究の方法

リンパ節転移を有する子宮体癌組織で有意に発現が亢進している 5 遺伝子が子宮体癌リンパ節転移マーカーとなるかどうかの検索をすすめるため、平成 22 年度以降新た

な症例から採取された子宮体癌組織をもちいた遺伝子発現レベル解析（リアルタイム PCR）を行い、リンパ節転移バイオマーカーの候補を絞り込んだ。さらに、北海道大学病院に保管されている子宮体癌のパラフィン包埋組織を用い、選抜遺伝子に対する *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫染色を用い、マーカー分子の局在に関する検討を行った。

これらの結果にもとづき、選抜されたバイオマーカーの発現解析を通じ、新規症例における術前の子宮内膜生検材料を用いてリンパ節転移のリスクを推定し、手術検体の病理診断と照合した。

4. 研究成果

Affimetrix Exon Microarray およびリアルタイム PCR をもちいて、子宮体癌リンパ節転移バイオマーカー候補としてリンパ節転移症例で発現亢進が確認された KIAA1641, ANKRD36 (ankyrin repeat domain containing 36), VPS13A, CROP, MALAT-1 の 5 遺伝子を選別した。KIAA1641, ANKRD36 は同一遺伝子であることが判明したため、以後、ANKRD36 と記載する。その後、臨床検体の例数を増やしリアルタイム PCR による検証を続けたところ、ANKRD36, CROP, MALAT-1 の 3 遺伝子がリンパ節転移陽性症例の子宮病変においてリンパ節転移陰性症例と比較して有意に高発現していることが証明された。

ANKRD36 は機能未知の理論的タンパクであり 6 個の ankyrin repeat domain を持つと推定される。また Ankyrin repeat domain は様々なタンパク質-タンパク質相互作用（転写開始・細胞周期の制御・細胞骨格・イオントランスポーター・シグナル伝達）に関与することが知られている。そこでわれわれは抗 ANKRD36 ペプチド抗体を作成し、腫瘍組織において ANKRD36 タンパクが発現しているかどうかを免疫染色にて検証した。その結果、腫瘍細胞の細胞質に ANKRD36 が局在することを確認した。さらにリンパ節転移陽性症例は転

移陰性症例と比較して、有意に ANKRD36 の染色性が強いことが判明した (p=0.045)。しかし、ANKRD36 の染色強度と組織学的 grade との間に関連性は認められなかった。また、ANKRD36 陽性症例と陰性症例を比較したところ、overall survival に差を認めなかった。

CROP は cisplatin 抵抗性の ACHN/CDDP 細胞株より同定された Serine/arginine-rich な核タンパクである。抗 CROP 抗体を用い免疫染色を施行したところ、CROP は腫瘍細胞の核に局在していた。CROP の染色強度とリンパ節転移の有無、組織学的 grade との間に有意差は認められなかった。

MALAT-1 は 8000 塩基を超える non-coding large RNA であり、遺伝子座は chromosome 11q13 に存在することが知られており、近年、複数の癌腫において転移との関連が報告されている。Epithelial-to-mesenchymal transition を誘導することにより、細胞の migration に寄与するとの報告もあり、MALAT-1 の高発現は悪性腫瘍の予後因子となる可能性が示唆されている。われわれは in situ hybridization を行い、従来の報告と同様に MALAT-1 が腫瘍細胞の核に存在することを証明した。正常組織において MALAT-1 の発現は明らかでなかった。

本研究において、ANKRD36、CROP、MALAT-1 の 3 遺伝子が子宮体癌リンパ節転移バイオマーカーとして選抜された。今後われわれはこれら 3 遺伝子の診断的応用に加え、生物学的特性を解析することにより子宮体癌の転移、とりわけリンパ節転移における 3 遺伝子の役割を解明していく予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

1. Satoko Sudo, et al. Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Patients

with Endometrial Cancer using Exon-expression Microarray.

第 65 回日本産科婦人科学会. 平成 25 年 5 月 10 日. ロイトン札幌 (札幌)

2. Satoko Sudo, et al. Exploration of Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Patients with Endometrial Cancer using Exon-expression Microarray. 17th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology. 平成 23 年 9 月 14 日, ミラノコンベンションセンター (イタリア)
3. 首藤 聡子, 他. Exon-expression Microarray をもちいた子宮体癌リンパ節転移バイオマーカーの探索. 第 50 回日本婦人科腫瘍学会. 平成 23 年 7 月 23 日. 札幌コンベンションセンター (札幌)
4. Satoko Sudo, et al. Exploration of Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Patients with Endometrial Cancer using Exon-expression Microarray. 2011 ASCO. 平成 23 年 6 月 5 日, MCCORMICK PLACE (米国)
5. 首藤 聡子, 他. 子宮体癌リンパ節転移バイオマーカーの探索. 第 63 回日本産科婦人科学会. 平成 23 年 4 月 16 日, リーガロイヤルホテル (大阪)
6. Satoko Sudo, et al. Exploration of Biomarkers for Lymph Node Metastasis in Patients with Endometrial Cancer using Exon-expression Microarray. 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society. 平成 22 年 10 月 25 日, プラハコンgresセンター (チェコ共和国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首藤 聡子 (SUDO SATOKO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：10399892

(2) 研究分担者

櫻木 範明 (SAKURAGI NORIAKI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70153963

(3) 連携研究者

なし