

## 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 6月 8日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659298

研究課題名（和文）遺伝子損傷検出法TDPPCR法の改良とその子宮内膜癌発生の研究への応用

研究課題名（英文）Modification of DNA damage detecting method, Terminal transferase dependent PCR (TDPCR), and its application to endometrial carcinogenesis

研究代表者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：20235493

研究成果の概要（和文）：

子宮内膜癌発生過程におけるエストロゲンの関与についてはよくわかっていない。そこで我々は内膜細胞にエストロゲンがDNA損傷を惹起し得るかをターミナルトランスフェラーゼ依存PCR(TDPCR)法にて検出を試みた。TDPCR法は煩雑であるが、キャピラリーシーケンサーを応用することで、簡便に検出が可能となった。本法を用いた結果、エストロゲンではPTEN領域にDNA損傷は検出できなかったが、代謝産物ではDNA損傷が検出された。DNA損傷部位は内膜癌で遺伝子変異の報告されている領域と一致していた。この結果はエストロゲン代謝産物がPTEN遺伝子変異の誘因となる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

The involvement of estrogen in endometrial carcinogenesis is controversial, therefore, we intended to examine estrogen or its metabolite could induce DNA damage on endometrial cells by using terminal transferase dependent PCR (TDPCR) method. At first, we modified TDPCR by applying a capillary sequencer and consequently we could avoid its complicated, time-consuming process. By using modified TDPCR, we found that catechol estrogen caused DNA damages on frequently mutated gene in endometrial carcinoma, PTEN, while estrogen did not. In addition, the foci of DNA damage corresponded to known mutation site of PTEN in endometrial carcinoma. Taken together, these data suggest that metabolite of estrogen is responsible for PTEN mutations in endometrial carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,100,000 | 0       | 1,100,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,200,000 | 330,000 | 2,530,000 |

研究分野：産婦人科

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：遺伝子損傷・TDP CR・子宮内膜癌・サイクリン

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は近年我が国で著明な増加を示している。我々は子宮内膜癌発生の初期過程で重要とされている DNA ミスマッチ修復能(MMR)とエストロゲンの関係を検討した。その結果、予想に反して高エストロゲン状態は MMR 活性を高めてむしろ癌の発生を抑制している可能性を示した (Miyamoto et al. *Endocrinology* 2006)。

一方、エストロゲン補充療法やタモキシフェンが子宮内膜癌のリスク因子であることが知られており、エストロゲン類縁物質の子宮内膜癌発生への関与を否定できない。さらに、子宮内膜癌発生に関与するといわれる p53 や K-ras、PTEN の遺伝子変異とエストロゲンとの関係は全く解明されていない。

遺伝子変異は癌原物質による DNA 損傷や、上述の DNA 修復異常などが原因となる。これらは terminal transferase-dependent polymerase chain reaction (TDPCR)法を用い、タモキシフェンが内膜癌細胞株の p53 遺伝子に DNA 損傷 (DNA adducts) を生じさせうることを塩基レベルで示した。

### 2. 研究の目的

そこで我々は内膜癌の発生に関与する遺伝子 (PTEN, K-ras, p53) を対象に、内膜癌手術症例から得られた遺伝子変異部位に関する情報と、TDPCR により実験的に得られたエストロゲン様物質による DNA 障害部位情報を包括的に検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) TDPCR 標的遺伝子の設定

TDPCR 法の標的遺伝子とし、現在までに子宮内膜癌で遺伝子変異が報告されている p53 (exon 6, exon 8), PTEN (exon 8)、K-ras, B-raf を標的とした primer set を作成する。

(2) TDPCR 法で複数領域を同時解析する multiplex TDPCR 法の検討：従来の TDPCR 法では、シーケンスゲル

への電気泳動を要するため、多検体の処理が困難である。さらに蛍光修飾 primer を使用した場合でも複数の標的配列を同時に電気泳動し、個々のバンドを解析することは煩雑なため困難であった。キャピラリー式 DNA シーケンサーを使用した TDPCR 法では、理論上、標的配列に異なった波長の蛍光色素標識を行うことで、同時に複数の配列を解析可能であると考えられる。

また、その結果はそれぞれの配列毎、個別に解析可能であり、その結果もデータファイルとし保存、加工可能である。そこで TDPCR 法に複数の primer を用い、同時に PCR 反応を行う multiplex PCR 法の手法が応用可能か検討する。

### 4. 研究成果

シーケンサーを応用することで TDPCR の簡略化が得られ、DNA 損傷部位の同定、程度の評価がより簡便となった。

エストロゲンおよびエストロゲン代謝産物であるカテコールエストロゲンを細胞に添加し、TDPCR を行った結果、エストロゲンでは PTEN 領域に DNA 損傷は惹起できなかったが、カテコールエストロゲンでは DNA 損傷が検出された。

検出された DNA 損傷部位は内膜癌で遺伝子変異の報告されている領域と一致していた。この結果はエストロゲンではなくその代謝産物が PTEN 遺伝子変異の誘因となる可能性を示唆するものである。

### 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 20 件)

① Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Nagase S, Ishiko O, Shiozawa T, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Tonegawa S, Konishi I. Involvement of proteasome  $\beta$ 1i subunit, LMP2, on development of uterin leiomyosarcma. *N Am J Med Sci*. 2011;3(9):394-9. PubMed PMID: 22362447;

PubMed Central PMCID: PMC3271393.  
(査読あり)

②Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Sudo T, Tagawa Y, Nishimura R, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Konishi I.

Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. *Sci Rep*. 2011;1:180. Epub 2011. PubMed PMID:22355695; PubMed Central PMCID: PMC3240965.(査読あり)

③Miyamoto T, Ishii K, Asaka R, Suzuki A, Takatsu A, Kashima H, Shiozawa T. Immunohistochemical expression of keratan sulfate: a possible diagnostic marker

for carcinomas of the female genital tract. *J Clin Pathol*. 2011

Dec;64(12):1058-63. Epub 2011. PubMed PMID: 21836037.(査読あり)

④Miyamoto T, Asaka R, Suzuki A, Takatsu A, Kashima H, Shiozawa T.

Immunohistochemical detection of a specific receptor for lipocalin2 (solute carrier family 22 member 17, SLC22A17) and its prognostic significance in endometrial carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2011 Oct;91(2):563-8. Epub 2011. PubMed PMID: 21763306.(査読あり)

⑤Takatsu A, Shiozawa T, Miyamoto T, Kurosawa K, Kashima H, Yamada T, Kaku T, Mikami Y, Kiyokawa T, Tsuda H, Ishii K, Togashi K, Koyama T, Fujinaga Y, Kadoya M, Hashi A, Susumu N, Konishi I.

Preoperative differential diagnosis of minimal deviation adenocarcinoma and lobular endocervical glandular hyperplasia of the uterine cervix: a multicenter study of clinicopathology and magnetic resonance imaging findings. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;1287-96. PubMed PMID:

21685796.(査読あり)

⑥Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kanai Y, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Molecular Approach to Uterine Leiomyosarcoma: LMP2-Deficient Mice as an Animal Model of Spontaneous Uterine Leiomyosarcoma. *Sarcoma*. 2011;476498. Epub 2011. PubMed PMID: 21437229; PubMed Central PMCID: PMC3061316.(査読あり)

⑦Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Kikuchi N, Konishi I, Seki N, Shiozawa T. Laser-captured microdissection-microarray analysis of the genes involved in

endometrial carcinogenesis: stepwise up-regulation of lipocalin2 expression in normal and neoplastic endometria and its functional relevance. *Hum Pathol*. 2011 Sep;42(9):1265-74. Epub 2011. PubMed PMID: 21334721.(査読あり)

⑧ホルモン エストロゲンと子宮内膜癌 宮本強, 塩沢丹里:産婦人科治療 103(4), 422-429, 2011(査読あり)

⑨婦人科悪性腫瘍に対するホルモン療法 宮本 強, 塩沢丹里:内分泌外科 =Endocrine surgery 28(3), 152-156,2011(査読あり)

⑩Okamoto T, Matsumura N, Mandai M, Oura T, Yamanishi Y, Horiuchi A, Hamanishi J, Baba T, Koshiyama M, Shiozawa T, Konishi I. Distinguishing primary from secondary mucinous ovarian tumors: an algorithm using the novel marker DPEP1. *Mod Pathol*. 2011 Feb;24(2):267-76. Epub 2010. PubMed PMID: 21076463.(査読あり)

⑪Satoh T, Hatae M, Watanabe Y, Yaegashi N, Ishiko O, Kodama S, Yamaguchi S, Ochiai K, Takano M, Yokota H, Kawakami Y, Nishimura S, Ogishima D, Nakagawa S, Kobayashi H, Shiozawa T, Nakanishi T, Kamura T, Konishi I, Yoshikawa H. Outcomes of fertility-sparing surgery for stage I epithelial ovarian cancer: a proposal for patient selection. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1727-32. Epub 2010 Mar 1. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2011;4725. PubMed PMID: 20194858.(査読あり)

⑫Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Baba T, Horiuchi A, Mikami Y, Yoshioka S, Wakasa T, Shiozawa T, Konishi I. Oct4 expression in immature teratoma of the ovary: relevance to histologic grade and degree of differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2010;1842-8. PubMed PMID: 21107090.(査読あり)

⑬Ohira S, Miyake M, Kobara H, Kikuchi N, Osada R, Ashida T, Hirabayashi K, Nishio S, Kanai M, Shiozawa T. Fetal goitrous hypothyroidism due to maternal thyroid stimulation-blocking antibody: a case report. *Fetal Diagn Ther*. 2010;28(4):220-4. Epub 2010. PubMed PMID: 20881365.(査読あり)

⑭Fakhry H, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Ke H, Konishi I, Shiozawa T. Immunohistochemical detection of histone deacetylases in endometrial carcinoma: involvement of histone deacetylase 2 in the proliferation of endometrial carcinoma

cells. Hum Pathol. 2010 Jun;41(6):848-58.  
Epub 2010. PubMed  
PMID: 20178884.(査読あり)

⑮ Suzuki A, Horiuchi A, Oka K, Miyamoto T, Kashima H, Shiozawa T.  
Immunohistochemical detection of steroid receptor cofactors in ovarian endometriosis: involvement of down-regulated SRC-1 expression in the limited growth activity of the endometriotic epithelium. Virchows Arch. 2010 Apr;456(4):433-41. Epub 2010. PubMed  
PMID: 20155281.(査読あり)

⑯ Hayashi A, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi T, Fuseya C, Suzuki A, Konishi I, Shiozawa T. Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. Int J Cancer. 2010;1332-46. PubMed PMID: 20049841.(査読あり)

⑰ Suzuki A, Horiuchi A, Ashida T, Miyamoto T, Kashima H, Nikaido T, Konishi I, Shiozawa T. Cyclin A2 confers cisplatin resistance to endometrial carcinoma cells via up-regulation of an Akt-binding protein, periplakin. J Cell Mol Med. 2010;2305-17. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00839.x. PubMed  
PMID: 19583808.(査読あり)

⑱ 宮本 強, 布施谷千穂, 石川香織, 鹿島大靖, 堀内晶子, 塩沢丹里: 長期経過観察中に子宮体癌に進行した atypical polypoid adenomyoma の1例. 産婦人科の実際 59(5): 845-850, 2010(査読あり)

⑲ 大平哲史, 古川哲平, 小原久典, 菊地範彦, 長田亮介, 芦田 敬, 金井 誠, 塩沢丹里: 産後の大量出血に対して遺伝子組換え活性型血液凝固第Ⅶ因子製剤を投与した1例, 産婦人科の実際 59(7): 1141-1145, 2010(査読あり)

⑳ 菊地範彦, 小原久典, 長田亮介, 大平哲史, 芦田 敬, 金井 誠, 塩沢丹里: 常位胎盤早期剥離・胎児死亡例の経膈分娩管理の検討. 日本周産期・新生児医学会雑誌 46(3): 813-817, 2010(査読あり)

[学会発表] (計3件)

① 塩沢丹里  
子宮体がんの発生とエストロゲン  
第7回子宮体癌治療に関するシンポジウム  
2011年6月25日 東京

② 塩沢丹里  
子宮体癌の発生とエストロゲン

第24回日本臨床細胞学会関東連合学術集会  
2010年9月18日 軽井沢

③ 塩沢丹里  
エストロゲンと子宮内膜癌 update  
第122回近畿産婦人科学会 オープニングレクチャー 2010年6月19日 京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA TANRI)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号: 20235493

### (2) 研究分担者

堀内 晶子 (HORIUCHI AKIKO)  
信州大学・医学部附属病院・特任研究員  
研究者番号: 80334895  
鈴木 昭久 (SUZUKI AKIHISA)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号: 10547095

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: