

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791545

研究課題名（和文） 異所性子宮内膜症から卵巣明細胞癌および類内膜腺癌への悪性転化機構に関する検討

研究課題名（英文） The mechanism of carcinogenesis in ovarian clear cell carcinoma and ovarian endometrioid carcinoma from endometriosis.

研究代表者

赤羽 智子 (AKAHANE TOMOKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40398699

研究成果の概要（和文）：本研究期間中には卵巣癌に対する発癌機構と 17 番染色体上に存在する遺伝子との関連について検討した。Hepatocyte Nuclear Factor 18（以下 HNF18）の蛋白発現と子宮内膜症の有無および卵巣癌の上皮細胞と間質細胞における *TP53* 遺伝子の特性について解明した。その結果、HNF18 は卵巣明細胞癌患者に特異的発現し ($p < 0.001$)、高発現例には子宮内膜症の共存が多かった ($p < 0.016$)。また 1 例の卵巣癌患者に癌上皮細胞と直下間質細胞の双方に共通の p53 蛋白発現と *TP53* 遺伝子変異が検出された。本検討結果より、HNF18 は卵巣癌では明細胞癌特異的のマーカーであり発現の多寡は子宮内膜症からの発癌機構にも関与している可能性が示唆された。また卵巣間質細胞は卵巣癌発癌起源細胞である可能性を解明し報告した。

研究成果の概要（英文）： The origin of ovarian clear cell carcinoma, carcinogenesis from endometriosis. In this study, relation of Hepatocyte Nuclear Factor 18 (HNF18) protein discovery and clinical pathology factor was considered in ovarian cancer patients. Variation of *TP53* gene was compared about ovarian cancer epithelial cells and stromal cells for the purpose of search of an ovarian cancer carcinogenesis origin cell. The result, specific high expression of HNF18 in ovarian clear cell carcinoma patient's tissue ($p < 0.001$). HNF18 high expression patient was coexistence of endometriosis in ovarian cancer cells ($p < 0.016$). Common *TP53* gene mutations cancer cells and stromal cells in one ovarian patient. As a conclusion of HNF18 was a clear cell carcinoma specific marker and suspect of participating in carcinogenesis mechanism from endometriosis. An ovarian stromal cell was the origin was also suggested to the ovarian cancer stem cell.

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
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：

キーワード：卵巣癌 卵巣明細胞癌 卵巣類内膜腺癌 子宮内膜症 癌化メカニズム

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の中でも卵巣明細胞癌および卵巣類内膜腺癌は、他の組織型と比較し同一組織標本中に子宮内膜症の共存が多く、子宮内膜症が両腫瘍の発癌母地であることが 1925 年より推測されている (Sampson *Arch Surg* 1925)。しかし、本来良性であるはずの子宮内膜症細胞が癌化に至るまでのメカニズムの詳細は現在に至っても解明されていない。一見、良性細胞に見える子宮内膜症細胞にも遺伝子レベルでは変化が検出され、特に 17q 染色体の異常が高頻度に検出されることが報告されている (Sato et al. *Cancer Res* 2000)。これまでの我々の検討においても卵巣明細胞癌には 17 番染色体の異常が検出されること (Hirasawa et al *Clin Cancer Res*. 2003) 卵巣明細胞癌に付随している細胞異型のない子宮内膜症細胞には *TP53* 遺伝子の変異が検出されるなどの報告をしている (Akahane T et al. *Int J Gynecol Pathol*, 2007)。これらの検討より、子宮内膜症からの癌化に 17 番染色体の関与は悪性メカニズムの主体的な要因であることが推測される。日本産婦人科学会生殖内分泌委員会報告においては、子宮内膜症が卵巣癌と共存する罹患者が 30 代という比較的若年層において増加しているとされる。また子宮内膜症が不妊要因とされる原発性不妊患者の卵巣癌罹患相対危険率は 2.48 と高率であることも報告されている (Brinton LA *Fertil Steril* 2004)。本邦における卵巣癌発症傾向は、諸外国と比較し異なる特徴を示し、中でも卵巣明細胞癌の罹患率が高い。これら社会的背景および腫瘍との関連から、子宮内膜症は前癌病変としての可能性を否定できない。しかし現代社会において、少子晩婚化の影響や環境要因などにより子宮内膜症罹患者は増加傾向にある。よって本研究は本邦において独自かつ早急に解明すべき課題であると認識している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、卵巣癌における子宮内膜症からの発癌機構の解明および卵巣癌発癌起源について解明し、卵巣癌早期介入と個別化予防法へと応用することが目的である。申請者はこれまでの研究において、子宮内膜症が癌化に至る要因として 17 番染色体に存在する遺伝子とステロイドホルモン活性減弱が関与していることを解明している。しかし結果は一部に過ぎない。本研究期間中、引き続き 17 番染色体上に存在する遺伝子に着目して検討を行い子宮内膜症からの癌化との関連を解明する。卵巣明細胞癌は癌細胞の細胞質内に糖の一種であるグリコーゲンの蓄積を特徴とすることから、糖の代謝に関与する遺伝子である *HNF1β* について子宮内膜症

との関連について検討を行う。また子宮内膜症以外の卵巣癌発癌起源となる細胞の存在を検索するため、*TP53* 遺伝子に着目し卵巣癌病変組織内における存在部位とその特性との関連から卵巣癌発癌起源細胞の検索を行う。

3. 研究の方法

本研究期間中において次の 2 テーマについて検討を行った。①卵巣明細胞癌の特性と子宮内膜症との関連性との検索を目的とし、卵巣癌患者における主要な上皮性卵巣癌病変組織における *HNF1β* 発現と臨床病理学的因子の関与について検討を行った。②卵巣癌における子宮内膜症以外の発癌起源となる細胞を検索するため、患者組織による *p53* 蛋白発現と遺伝子変異の差異について検索した。以下に研究の方法を記載する。

① 卵巣癌患者における卵巣癌特性の検索と臨床病理学的因子との関連

卵巣癌患者の病変組織標本について、卵巣明細胞癌、卵巣類内膜腺癌、卵巣漿液性腺癌、卵巣粘液性腺癌、その他の組織型の計 185 例における *HNF1β* 蛋白発現を比較した (表 1)。

Origin	Histological type	n
Ovary	clear cell adenocarcinoma	123
	endometrioid adenocarcinoma	13
	serous adenocarcinoma	11
	mucinous adenocarcinoma	23
	others	15
Total		185

(表 1 卵巣癌患者組織型内訳)

蛋白発現検索は病変組織の免疫組織化学染色にて行った。一次抗体は anti-*HNF1β* goat polyclonal antibody (c-20) (Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体にシンプルステイン Max-po (goat) (ニチレイ) を使用した。陽性細胞は核内に限局して染色されるため、一視野あたりの陽性細胞数を陰性細胞との百分率にて 5 段階評価した。結果は子宮内膜症の合併、年齢、生存期間、腹水細胞診陽性率等の臨床病理学的因子と比較を行った。さらに卵巣癌培養細胞株についても western blotting 法にて *HNF1β* 蛋白発現を検討した。

② 卵巣癌発癌起源細胞の検索

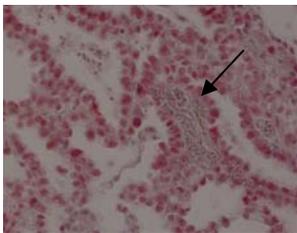
近年の研究において、癌の発生には癌幹細胞の存在が指摘されている。卵巣癌の一部にもその存在が推測される。今回の検討において子宮内膜症以外の発癌起源細胞を検索するため、卵巣癌患者組織の *p53* 蛋白発現と遺

伝子変異を検出し、病変上皮細胞と間質細胞における両者の特性と差異について検討した。症例は卵巣癌患者の手術摘出標本について11症例を対象としP53蛋白発現を免疫組織学的に検討した。一次抗体に anti-human P53 monoclonal antibody (DO-7) (DAKO)、二次抗体にシンプルステイン Max-po (goat) (ニチレイ) を使用した。癌細胞と間質の双方の細胞に免疫組織染色陽性となった患者症例について、染色陽性細胞を Laser Capture Microdissection 法 (以下 LCM) にて単離し、ダイレクトシーケンス法にて *TP53* 遺伝子変異の検出を行った。

4. 研究成果

① 卵巣癌患者における卵巣癌特性の検索と臨床病理学的因子との関連

HNF1βは他の組織型の卵巣癌と比較し、卵巣明細胞癌患者に有意差をもって発現していた ($P=0.001>$) (図2)。また卵巣明細胞癌患者において病変組織内に子宮内膜症を認める症例には HNF1βが有意差をもって高発現していた ($P=0.013$)。この結果から、子宮内膜症から卵巣明細胞癌の発癌過程において、HNF1βの発現が関与している可能性が示唆された。また、卵巣癌培養細胞株においても HNF1βは明細胞腺癌細胞株である RMG-I、RMG-V、JHOC-5 に高発現を認めた。



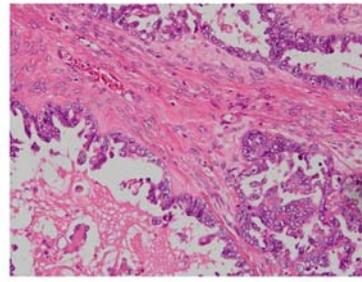
(図2) HNF1β陽性細胞像
陽性像は核内に染色される。

さらにその他の臨床病理学的因子と HNF1β発現との関連性について比較したところ、HNF1β高発現例は低発現例と比較し、腹水細胞診陽性数が高率であった ($P=0.01$)。卵巣癌患者において腹水細胞診陽性となる症例は、後の経過で予後不良症例となる例が多い。したがって卵巣癌本体病変にて HNF1β陽性となる腫瘍は予後不良となる可能性が示唆された。

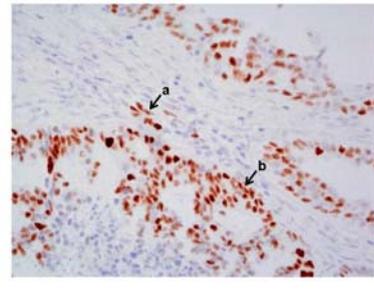
②卵巣癌発癌起源細胞の検索

上皮性卵巣癌患者の病変組織について11例の検討を行った。1例ではあるが卵巣漿液性腺癌患者の組織切片には癌上皮細胞と間質細胞に p53 蛋白発現陽性細胞が検出された。

(図3 AおよびB)

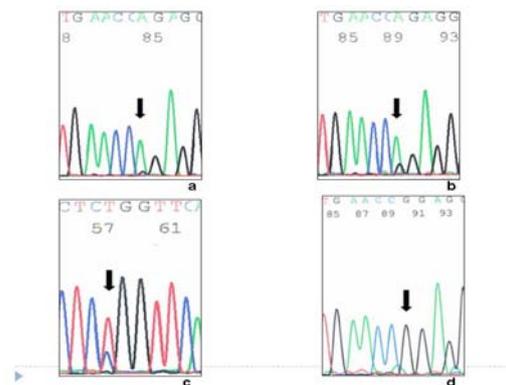


(図3 A) 卵巣漿液性腺癌組織 HE 染色像



(図3 B) p53免疫組織染色
P53陽性像がa上皮細胞とb間質細胞の双方に検出された。

さらに免疫組織染色にて P53 蛋白発現陽性となった細胞を LCM 法にて単離し、*TP53* 遺伝子変異をダイレクトシーケンス法にて検出した。その結果、癌上皮細胞 (図4a) および間質細胞 (図4b c) の双方に同一の遺伝子変異が検出されたが、正常子宮内膜細胞に同部位の変異は検出されなかった (図4d)。



(図4 LCMによる卵巣癌上皮細胞の *TP53* 遺伝子変異の検出)
TP53 遺伝子変異 (R248Q 矢印) は a 癌上皮細胞と b c 間質細胞に同様の変異が検出されたが d 正常子宮内膜細胞には検出されなかった。

本解析結果より、卵巣癌の一部の発癌過程には間質細胞が発癌起源細胞となっている可能性が示唆された。本研究結果は原著論文として成果報告した(Akahane T, *Int. J of Gynec Pathol* 2013)。

現代社会において癌罹患者数は増加しており、いまや2人に1人は一生に何らかの癌を発症する時代である(公益財団法人がん研究振興財団発行「がんの統計'11」より)。しかし、様々な治療法が開発されているにも関わらず、癌克服の最大の効果は早期発見であることは現在に至っても変わり無い。本研究の主題である発癌リスクの解明は発症要因を解明することで早期介入への応用を目的に研究を行った。癌克服者が一人でも多くあるための研究は癌研究者の使命である。

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8件)

1. Hirasawa A, Masuda K, Akahane T, Tsuruta T, Banno K, Makita K, Susumu N, Sugano K, Kosaki K, Aoki D. Establishment of a system for performing risk-reducing salpingo-oophorectomy for *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers in Japan: Our challenges for the future. *Jpn J Clin Oncol*; 43(5): 515-519. 2013
2. Akahane T, Hirasawa A, Tsuda H, Kataoka F, Nishimura S, Tanaka H, Tominaga E, Nomura H, Chiyoda T, Iguchi Y, Yamagami W, Susumu N, Aoki D. The origin of stroma surrounding epithelial ovarian cancer cells. 査読有 *International Journal of Gynecological Pathology*; 32(1): 26-30. 2013
3. Hirasawa A, Akahane T, Kobayashi Y, Masuda K, Banno K, Fujii T, Susumu N, Itsubo T, Kameyama K, Sugano K, Aoki D. Lobular endocervical glandular hyperplasia and peritoneal pigmentation associated with Peutz-Jeghers syndrome due to a germline mutation of *STK11*. 査読有 *Annals of Oncology*; 23(11): 2990-2992. 2012
4. Hirasawa A, Akahane T, Tanigawara Y, Aoki D. Blood-Direct Invaderplus as a new method for genetic testing. 査読有 *Technology report Personalized Medicine* 9(6) 657-663. 2012
5. Kataoka F, Tsuda H, Arao T, Nishimura S, Tanaka H, Nomura H, Chiyoda T, Hirasawa A, Akahane T, Nishio H, Nishio K, Aoki D. EGRI and FOSB gene expressions in cancer stroma are independent prognostic indicators for epithelial ovarian cancer receiving standard therapy. 査読有 *Genes Chromosomes Cancer*. Mar;51(3): 300-12. 2012
6. Hirasawa A, Akahane T, Makita K, Aoki D. Association between copy number variations of estrogen metabolism-related gene and bone mineral density in postmenopausal women of Japanese. 査読有 *Osteoporosis Int*. 21(5); S722-723: 2010
7. Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A,

Takahashi A, Kubo M, Akahane T, Aoki D, Kamatani N, Hirata K, Nakamura Y. A genome-wide association study identifies genetic variants in the *CDKN2BAS* locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet.* 査読有 42(8): 707-710 2010

8. Kamioka N, Akahane T, Kohno Y, Kuroki T, Iijima M, Honma I, Ohba M. Protein kinase C δ and η differently regulate the expression of loricrin and jun family proteins in human keratinocytes. 査読有 *Biophys Res Commun.* Mar 26;394(1): 106-110 2010

[学会発表] (計 5 件)

1. 赤羽智子、富永英一郎、平沢晃、青木大輔 卵巣明細胞癌細胞株における HNF1B 蛋白発現解析 第53回日本臨床細胞学会春季大会 (2012. 6. 1-3 千葉県幕張)
2. 赤羽智子、平沢 晃、小林佑介、鶴田智彦、阪埜浩司、藤井多久磨、進伸幸、菅野康吉、青木大輔 *STK11* 遺伝子陽性を示し子宮頸部分葉状頸管過形成を合併した Peutz-Jegher 症候群の1例 第50回臨床細胞学会秋期大会 (2011. 10. 22-23 東京)
3. 平沢 晃、赤羽智子、鶴田智彦、野村弘行、進伸幸、小崎健次郎、谷川原祐介、青木大輔 抗がん剤の PK/PD と PGx ~ 個別化投薬へ向けて がん臨床現場における ファーマコゲノミクスの導入 第31回日本臨床薬理学会年会 (シンポジウム) (2010. 12. 2 京都)

4. 赤羽智子、富永英一郎、平沢晃、進伸幸、青木大輔 卵巣癌における HNF1B 発現特異性と臨床病理学的因子との関連 第49回臨床細胞学会秋期大会 (2010. 11. 23-24 神戸)

5. 赤羽智子、富永英一郎、平沢晃、進伸幸、青木大輔 卵巣明細胞腺癌における HNF1B 発現特異性と臨床病理学的因子との関連に関する検討 第51回組織細胞化学学会秋期大会 (2010. 9. 3-4 東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤羽 智子 (AKAHANE TOMOKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40398699