

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592480

研究課題名(和文)子宮内膜症性卵巣嚢胞からの悪性転化組織を用いた遺伝子変異と異常発現の解析

研究課題名(英文) Gene mutations and abnormal gene expression in ovarian cancer arising from endometriosis

研究代表者

北脇 城 (KITAWAKI, Jo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00204925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症性卵巣嚢胞(EMoma)は一般に良性であるが、その0.7～1.6%が悪性転化して卵巣癌(OCEM)を発生する。本研究ではその分子メカニズムを調べるために、パラフィン包埋切片から子宮内膜症、移行部、癌細胞をマイクロダイセクションにより切り出し、抽出したDNAより変異を調べた。6染色体上の13マイクロサテライトマーカーを用いて、OCEMおよびEMomaからそれぞれ31および8か所のヘテロ接合性の消失(LOH)を検出した。2か所の点突然変異が検出された。特定の腫瘍関連遺伝子の突然変異ではなく、いくつかの染色体遺伝子座に蓄積されたLOHイベントが子宮内膜症の癌化に関与し得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the genetic alterations during transformation of ovarian endometriosis into cancer, we analysed loss of heterozygosity (LOH) and mutations of tumor-related genes. Each paraffin-embedded section was microdissected to isolate the endometriotic epithelium, transitional epithelium and cancer cells. Extracted DNA was analysed for LOH events and mutations. With 13 microsatellite markers on 6 chromosomes, we detected 31 and 8 LOH events in OCEMs and in solitary ovarian endometriosis, respectively. Only two point mutations of PTEN were detected in cancer cells in one case. Our study suggested that accumulated LOH events on some chromosome loci may be involved in malignant transformation of endometriosis, while mutations in certain tumor-related genes are not.

研究分野：産婦人科学

キーワード：ヘテロ接合性の消失 悪性形質転換 子宮内膜症から発生する卵巣癌 突然変異

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、子宮内膜様の組織が子宮腔の以外の異所性に存在する疾患であり、主として卵巣および腹膜に発生する。生殖年齢女性の 10~15% に発生する一般的な婦人科疾患である。子宮内膜症は通常は良性の経過をたどるが、ときに悪性に変化する可能性、および卵巣癌発生との特異的な関連については古くから議論されている。いくつかの大規模なフォローアップ研究では、子宮内膜症の女性が卵巣癌のリスクが高いこと、そして早期に診断され、長年の子宮内膜症罹患歴がある女性においてよりリスクが高いことが示されている。病理学的な研究において、卵巣子宮内膜症の女性の 5~10% が卵巣癌に進展し、明細胞癌および類内膜腺癌が子宮内膜症関連卵巣癌(EAOC)で最も多いことが示されている。手術標本では、子宮内膜症と類内膜腺癌/明細胞卵巣癌の頻繁な共存が観察される。これを指示する報告として、Vercelliniらは卵巣類内膜腺癌の 26.3% に子宮内膜症が併発していることを示している。EAOC の約 60% において癌が子宮内膜症に隣接するかあるいは子宮内膜症組織から直接生じていることから、子宮内膜症の悪性転換が生じることが示唆されている。組織学的および疫学的な研究から、子宮内膜症がある卵巣癌の種類の起源であると考えられるが、現在のデータは、子宮内膜症と卵巣癌との間の原因の関係を実証するには不十分である。

子宮内膜症と卵巣癌は、同様の危険因子、防御因子および/または先行メカニズムを有するために、子宮内膜症と卵巣の悪性腫瘍との間の関係を調査する際に十分に交絡因子を制御することは困難である。一方、症例の収集の困難性および標本の異質性は、子宮内膜症や癌に共通する特定の原因遺伝子座の分子分析することを妨げる。

組織学的観察と臨床的に精査された症例に基づき、子宮内膜症性卵巣癌の悪性転化の頻度は約 0.7~1.6% と推定されている。Sampson は以下の基準で子宮内膜症の悪性転化の最初の症例を報告した。同じ部位での癌および子宮内膜症の共存、互いに類似の組織学的な関係を呈する、他の場所に第 2 の悪性腫瘍がないこととした。さらに後に Scott は別の基準を追加した。良性と悪性の子宮内膜上皮の間に形態学的な連続性があること。子宮内膜症から発生する卵巣癌の標本(OCEM)は、良性から悪性腫瘍に、直接連続して、悪性転化の直接の組織学的証拠を提供することから、理想的である。しかし、上記の基準を満たす場合を識別することは非常に困難である。

たとえば、癌はその起源の組織を消し去り、子宮内膜症の組織学的証拠を消滅させている可能性がある。子宮内膜症と癌との組織学的連続性を証明するには、手術標本の大規模な切片が必要である。したがって、現在まで OCEM を用いた直接的な研究成果はほとん

どない。

### 2. 研究の目的

本研究は、子宮内膜症性卵巣癌と卵巣癌との間の共通の系統があるかどうかを調査し、子宮内膜症から癌へと悪性転化する過程における分子遺伝学的エビデンスを検討した。我々は 12 例の OCEM 症例において分析した。すべての症例は組織学的基準を満たし、子宮内膜症の病歴を有していた。各症例においてパラフィン包埋切片から異なる種類の細胞を分離するためにマイクロダイセクションを行った。また、12 例の子宮内膜症卵巣癌単独の症例も分析した。本研究では、ヘテロ接合性の消失(LOH)および腫瘍関連遺伝子 PTEN、p53 および K-Ras の変異を含む、上皮性卵巣癌に共通の遺伝的変化を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 臨床検体

OCEM の 12 検体と子宮内膜症性卵巣癌の 12 検体を使用した。ホルマリン固定、パラフィン包埋ブロックを用いた。卵巣子宮内膜症が疑われた時点で平均年齢は 32.3 歳(23~44 歳)であり、卵巣癌の診断時の平均年齢は 43.8 歳(35~60 歳)であった。対照の正常組織は正常間質細胞、または血液検体から得た。また子宮内膜症性卵巣癌の標本から得た DNA も LOH 分析に使用した。研究プロトコルは京都府立医科大学倫理審査委員会によって承認されている。

#### (2) 顕微解剖と DNA 抽出

各組織ブロックから 20 μm の切片を切り出し、軽くヘマトキシリンで染色した。マニュアルマイクロダイセクションは 26 ゲージ針を用いて実体顕微鏡(120 倍)下で行った。この技術は、レーザーマイクロダイセクションに比べて目的の細胞をより高収率に回収することができた。OCEM および子宮内膜症の各症例の上皮内層から、子宮内膜症、癌、および癌細胞と間質細胞との間の移行組織を採取した。

#### (3) 変異の検出

マイクロダイセクションした細胞を用いて、PTEN のエクソン 2~8、TP53 のエクソン 5~11、K-ras のエクソン 2 と 3 の変異を調べた。抽出された DNA が微量のために、nested PCR を行った。増幅中のアーチファクトを回避するために、PCR 反応に uracil-N-glycosylase (UNG) を添加した。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動した。切り出した PCR 産物から双方向配列決定を行った。

#### (4) LOH の検出

LOH イベントは、常染色体 5q、6p、9p、10q、13q および 17q の多型マイクロサテラ

イトマーカ-を用いて分析した。以下のマイクロサテライトマーカ-を用いた：D5S407、D6S470、D9S161、D9S265、D9S270、D9S1870、D10S1765、D10S541、D10S215、D10S579、D13S265、D17S787、TP53。これらのマーカ-は p16<sup>INK4a</sup>、PTEN および TP53 などの癌抑制遺伝子あるいは他の未知の遺伝子に隣接している。プライマ-配列は、ゲノムデータベース (<http://www.GDB.org>) を用いて決定した。フラグメントサイズの分析は、ABI PRISM 377 シークエンサ-を使用して、キャピラリー電気泳動法により行った。結果は、GeneScan 収集とピークスカ-ナ解析ソフトウェアを用いて自動化蛍光検出によって分析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 突然変異

内膜症、移行部、卵巣癌の各部位における PTEN、TP53、および K-Ras の変異を調べた。症例 3 において PTEN 遺伝子のエクソン 2 に 2 箇所の突然変異を発見した。そのいずれもがアミノ酸の転写の変化のない単一ヌクレオチド変化 (A から G への変異) であった。この変異は癌においてのみ検出され、内膜症や移行部ではみられなかった。症例 2、4、5 において TP53 遺伝子の既知の多型 (rs1642786) が内膜症と癌組織の比較で検出された。TP53 および K-ras の変異は認められなかった。

##### (2) LOH

我々は、13 の多型マイクロサテライトマーカ-を選択して、常染色体の 5q、6p、9p、10q、13q、17q の LOH を分析した。卵巣子宮内膜症 12 例のうち 5 例が LOH を示した。そのうち 1~3 のマーカ-によって LOH が 9q (2 例)、10q (3 例) と 13p (3 例) の 4 か所で認められた。11 例の癌組織のうち 10 例において、9p (8 例)、10q (9 例)、13q (6 例) の 5 か所において 1 つまたは複数のマーカ-によって LOH が認められた。5q、6p、17q では LOH は検出されなかった。5 例 (症例 2、6、7、9、10) は 3 本の染色体上に、3 例 (症例 3、5、8) は 2 本の染色体上に、そして 2 例 (症例 4、11) は 1 つの遺伝子座に、それぞれ LOH を呈した。全部で 13 か所の LOH が癌細胞において見出された。一方、13 か所の LOH が同時に対応する子宮内膜症および移行組織で見出された。しかし、内膜症組織における単独の LOH は検出されなかった。

我々は 2 つのパターン の LOH イベントを検出した。パターン I は、LOH が癌組織のみに発生し、移行部や内膜症組織に発生しないものであり、18 か所検出した。パターン II は、同一の LOH が癌、移行および子宮内膜症組織で発生するものであり、13 か所検出した。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 13 件)

Yamanaka K, Xu B, Suganuma I, Kusuki I, Mita S, Shimizu Y, Mizuguchi K, Kitawaki J. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture. *Fertil Steril*, 査読有, 97, 2012, 477-482

DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011

Miller PB, Parnell BA, Bushnell G, Tallman N, Forstein DA, Higdon HL 3rd, Kitawaki J, Lessey. Endometrial receptivity defects during IVF cycles with and without letrozole. *Hum Reprod*, 査読有, 27, 2012, 881-888

DOI: BA.10.1093/humrep/der452

Akita K, Yoshida S, Ikehara Y, Shirakawa S, Toda M, Inoue M, Kitawaki J, Nakanishi H, Narimatsu H, Nakada H. Different levels of Sialyl-Tn antigen expressed on MUC16 in endometriosis and ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer*, 査読有, 22, 2012, 531-538

DOI: 10.1097/IGC.0b013e3182473292

Yamamoto T, Mori T, Sawada M, Kuroboshi H, Tatsumi H, Yoshioka T, Matsushima H, Iwasaku K, Kitawaki J. Estrogen-related receptor- $\gamma$  regulates estrogen receptor- $\alpha$  responsiveness in uterine endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 査読有, 22, 2012, 1509-1516

DOI: 10.1097/IGC.0b013e31826fd623

Minami T, Kosugi K, Suganuma I, Yamanaka K, Kusuki I, Oyama T, Kitawaki J. Antiproliferative and apoptotic effects of norethisterone on endometriotic stromal cells in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 査読有, 166, 2013, 76-80

DOI: 10.1016/j.ejogrb.2012.08.023

Kanbayashi Y, Hosokawa T, Kitawaki J, Taguchi T. Statistical identification of predictors for paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients with breast or gynaecological cancer. *Anticancer Res*, 査読有, 33, 2013, 1153-1156

Yoshioka T, Yogosawa S, Yamada T, Kitawaki J, Sakai T. Combination of a novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells due to increase of Bim with accumulation of ROS. *Gynecol Oncol*, 査読有, 129, 2013, 425-432

DOI: 10.1016/j.ygyno.2013.02.008  
Yamagami T, Yoshimatsu R, Okubo T, Tanaka O, Miura H, Yamada K, Kitawaki J, Tsuji H. Symptomatic deep venous thrombosis of the lower extremity in a pregnant woman successfully treated with endovascular procedures. *J Obstet Gynaecol Res*, 査読有, 39, 2013, 1059-1064  
DOI: 10.1111/j.1447-0756.2012.02071.x  
Senmaru T, Fukui M, Okada H, Mineoka Y, Yamazaki M, Tsujikawa M, Hasegawa G, Kitawaki J, Obayashi H, Nakamura N. Testosterone deficiency induces markedly decreased serum triglycerides, increased small dense LDL, and hepatic steatosis mediated by dysregulation of lipid assembly and secretion in mice fed a high-fat diet. *Metabolism Clinical and Experimental*, 査読有, 62, 2013, 851-860  
DOI: 10.1016/j.metabol.2012.12.007  
Kondo Y, Hasegawa G, Okada H, Senmaru T, Fukui M, Nakamura N, Sawada M, Kitawaki J, Okanoue T, Kishimoto Y, Amano A, Maruyama N, Obayashi H, Ishigami A. Lepr(db/db) mice with senescence marker protein-30 knockout (Lepr(db/db)Smp30(Y/-)) exhibit increases in small dense-LDL and severe fatty liver despite being fed a standard diet. *PLoS One*, 査読有, 8, 2013, e65698  
DOI: 10.1371/journal.pone.0065698  
Ito F, Tatsumi H, Mori T, Suganuma I, Tanaka Y, Sasaki A, Matsuo S, Iwasa K, Kitawaki J. Medroxyprogesterone acetate enhances monocyte-endothelial interaction under flow conditions by stimulating the expression of cell adhesion molecules. *J Clin Endocrinol Metab*, 査読有, 99, 2014, 2188-2197  
DOI: 10.1210/jc.2013-2925  
Suganuma I, Mori T, Ito F, Tanaka Y, Sasaki A, Matsuo S, Kusuki I, Kitawaki J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha enhances local estrogen biosynthesis by stimulating aromatase activity in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 査読有, 99, 2014, E1191-E1198  
DOI: 10.1210/jc.2013-2525  
Sasaki A, Akita K, Ito F, Mori T, Kitawaki J, Nakada H. Difference in mesothelin-binding ability of serum CA125 between patients with endometriosis and epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 査読有, 136, 2015, 1985-1990  
DOI: 10.1002/ijc.29185

〔学会発表〕(計8件)

Kitawaki J, et al. Long-term suppression of endometriosis-associated pelvic pain with sequential administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist followed by danazol, oral contraceptives or dienogest. 2nd Asian Conference on Endometriosis. 2012 November 10; Istanbul, Turkey.

Kitawaki J, et al. Estrogen-related receptors as novel targets in gynecological disease. 15<sup>th</sup> International congress on hormonal steroids and hormones & cancer. 2012 November 16; Kanazawa.

Kitawaki J. Management of endometriosis in perimenopausal women. 5<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asia Pacific Menopause Federation. 2013 October 18; Tokyo.

Kitawaki J. Should Endometriomas Be Resected Prior to In Vitro Fertilization-Embryo Transfer?. 14th Annual Congress of the Asia Pacific Association for Gynecologic Endoscopy and Minimally Invasive Therapy. 2013 November 1; Seoul, Korea.

Kitawaki J. Should Endometriomas Be Resected Prior to In Vitro Fertilization-Embryo Transfer?. 1st East Forum on Endometriosis. 2013 November 23; Shanghai, China.

Kitawaki J. Impact of ovarian endometrioma per se and surgery on ovarian reserve and pregnancy rate in in vitro fertilization cycles. 3rd Asian conference on endometriosis. 2014 October 26; Seoul, Korea.

Kitawaki J. Management of endometriosis: medicine, surgery, or IVF?. 2nd East Forum on Endometriosis. 2014 November 23; Shanghai, China.

Kitawaki J. Long-term medical treatment of endometriosis-associated pelvic pain. Takeda on Endometriosis. 2014 December 12; Beijing, China.

〔図書〕(計5件)

Kitawaki J. Springer, Sex steroids and endometriosis. In: Harada T, editor. Endometriosis: pathogenesis and treatment, 2014, 147-154

北脇 城. 医学書院, 21. 産婦人科疾患. 子宮内膜症. 今日の治療指針 2012版. 山口徹, 北原光夫, 福井次矢 総編集, 2012, 1069-1070

北脇 城. メジカルビュー社, 子宮内膜症

病変の進行度評価 . OGS NOW No.12 . 子宮内膜症・子宮腺筋症 こんなときどうする? 難易度の高い手術を安全、確実に行うための基本手技マスター . 平松祐司、小西郁生、櫻木範明、竹田省 編集、2012, 8-17

北脇 城 . 診断と治療社, 子宮筋腫・子宮内膜症・子宮腺筋症の疫学: 子宮筋腫・子宮内膜症・子宮腺筋症診療マニュアル - 女性3大良性疾患を診る . 百枝幹雄 編集、2013, 11-17

北脇 城 . メディカルレビュー社, XV-1 婦人科疾患 子宮内膜症 診療ガイドラインUP-TO-DATE 2014-2015 . 加藤聖子 責任編集 . 門脇 孝、小室一成、宮地良樹 監修 . 2014, 816-819

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

名称: 卵巣癌の検出方法、並びに、キット  
発明者: 中田 博、秋田 薫、池原 譲、成松 久、中西速夫、北脇 城  
権利者: 京都産業大学、独立行政法人産業技術総合研究所、愛知県、京都公立大学法人  
種類: 特許  
番号: 5 6 8 6 4 3 1  
出願年月日: 平成 2 3 年 1 月 2 8 日  
取得年月日: 平成 2 7 年 1 月 3 0 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
京都府立医科大学産婦人科学教室  
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/ob-gyn/top.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

北脇 城 (KITAWAKI, Jo)  
京都府立医科大学・大学院女性生涯医科学・教授

研究者番号: 0 0 2 0 4 9 2 5