

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670710

研究課題名(和文) 卵巣がんの超早期発見に向けた卵管采部の病理学的検索及び血中循環DNA測定

研究課題名(英文) Pathological examination of tubal fimbria and blood circulating DNA measurement toward the ultra-early detection of fallopian tubal cancer

研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, Nobuo)

東北大学・大学病院・教授

研究者番号：00241597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣がんの最多組織型である漿液性腺癌は卵管采上皮由来とする見解が近年主流となっている。我々は漿液性卵巣がんが初期前駆病変の段階で既にp53変異を持つことに着目し、p53変異の原因と考えられる「DNA損傷反応」に着目して研究を行った。-H2AXをDNA2重鎖切断のマーカースとしてトランスフェリンが細胞にDNA損傷反応を引き起こす事を見出した。siRNAを用いてこの反応がトランスフェリン受容体1に特異的に依存している事を確認した。上記の結果はoncogene誌に論文発表され卵巣癌の発生機序を理解する上で重要な成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Serous adenocarcinoma is the most common tissue type of ovarian cancer, and is thought to be originated from tubal fimbria in recent years. We are focusing on DNA damage response, which is considered the cause of p53 mutations, because serous ovarian cancer has p53 mutations even at the precursor lesions. Using -H2AX as a marker of DNA2 double strand breaks, we found that transferrin cause DNA damage response in cells. We confirmed that this is specifically dependent on transferrin receptor 1 by siRNA knockdown. The above results were published in the oncogene, and are considered to be a significant achievement in understanding the pathogenesis of ovarian cancer.

研究分野：産婦人科学、婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣がん 漿液性腺癌 p53変異 卵管采 DNA損傷 トランスフェリン 卵胞液

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣がんは婦人科がんの中で最も予後不良な疾患でありその5年生存率は40%前後である。予後不良の最大要因は進行して発見される症例が多い事である。卵巣がんの早期発見・予防のためには、卵巣がん発生の自然史を理解する必要がある。

卵巣がんの約半数を占める漿液性腺癌は、現在では半数以上が卵管采由来である可能性が高いことが明らかとなっている。TCGAの大規模解析で卵巣漿液性腺癌では96%の症例(303/316例)でp53変異が認められることが報告された(nature 2011)が、形態学的に正常に見える卵管上皮における変異p53蛋白の局所高発現領域、すなわち‘p53 signature’が漿液性腺癌の前駆病変である事も種々の研究から示唆されている。

(2) 近年では血中に存在する微量の腫瘍由来DNAを検出する技術が進歩し、卵巣漿液性腺癌で高頻度に認められるp53変異を患者血液循環DNA中から検出した報告がなされている。我々は卵巣がんの初期前駆病変とされるp53 signatureがすでにp53変異を伴っていることに注目し、p53 signature由来の血液循環DNAを検出する研究を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究は当初は(1)-(3)を目的として開始されたが、研究の進行に伴い(4)が追加となった。

(1) 卵巣癌の多くを占めるStage III以上の進行卵巣漿液性腺癌症例において、患者血液循環DNAを抽出してp53変異を同定する実験系を確立する。

(2) ホルモン固定された卵管采の免疫組織化学染色において同定されたp53 signatureに対して、LCMで腫瘍DNAを抽出してp53をシーケンスし、変異部位を同定できるか検討する。

(3) 上記が可能であれば、同じDNA変異を次世代シーケンサーを用いて術前に採取した患者血清より検出できるかどうかを明らかにする。

(4) 卵管采上皮細胞にDNA変異を起こす生理学的な誘因・機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では卵巣癌の極初期の前駆病変と考えられるp53 signatureで認めるp53変異を血液中で循環するDNAから検出する方法を以下の4ステップで行う(図参照)。

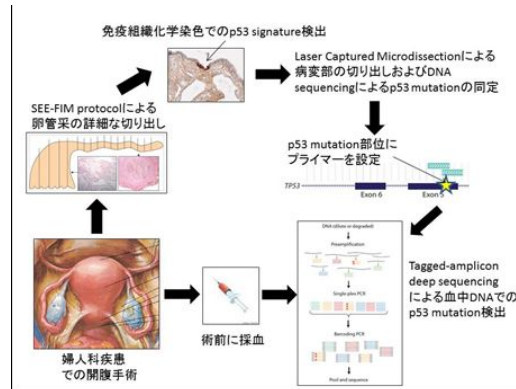
(1) 卵管切除を行った手術検体を対象として、免疫組織化学染色を行いp53 signatureを検出

(2) p53 signatureをlaser capture microdissection法で切り出しDNAを抽出、hot spotを中心としたp53 exon領域のPCR増幅及びsequenceにより変異を同定

(3) 特定した変異領域とターゲットとした、血中循環DNAの変異p53検出用プライマーを

作成

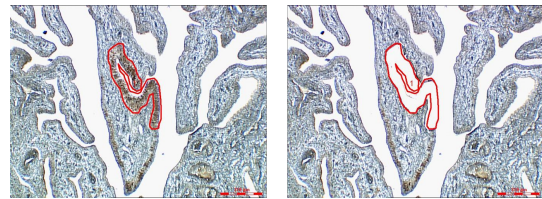
(4) TAm-Seqを用いた微量な血中循環DNAからの変異p53検出



(5) 生理学的に卵管采上皮に暴露する卵胞液成分にDNA損傷を起こす物質が含まれていると仮定し、トランスフェリンに着目した研究を行った。

### 4. 研究成果

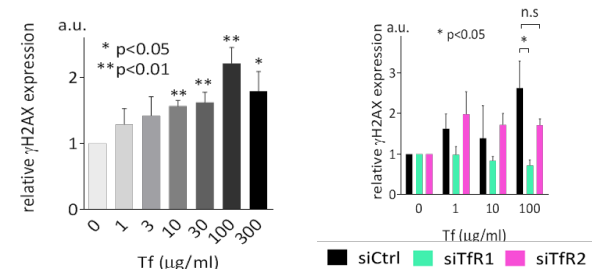
(1) 進行卵巣がん症例についてホルモン固定標本にマイクロダイセクションにてp53 signature領域を切り出し、DNAを抽出してシーケンスを確認した(下図参照)



その結果、この部位よりp53変異を確認する事が十分に可能であった。

しかしながら、患者血液から循環腫瘍DNAでp53変異を検出する事は出来なかった。

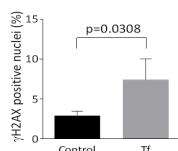
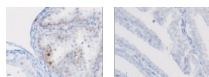
(2) DNA2重鎖切断のマーカである-gH2AXを利用して、卵胞液に高濃度で含まれるトランスフェリンがフェントン反応を介して細胞にDNA損傷反応を引き起こす事を見出した(下図左参照)。



さらにこの反応はトランスフェリン受容体1に特異的に依存している事を、siRNAを用いた実験で確認した(上図右参照)。

ヒト卵胞液中のトランスフェリン測定では5913±1947.6 µg/mlと高値であり、実験系では十分にDNA損傷を起こしうる濃度のトランスフェリン

ンスフェリンが含まれている事を確認した。さらにマウス卵管を用いた ex vivo の実験において、トランスフェリンが生体において DNA2 重鎖切断を起こす事を確認した(下図参照)。これらの結果は oncogene 誌に論文発表され、卵巣癌の発生機序を理解する上で重要な成果であると考えられる。



## 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 9 件)

Toyoshima M, Momono Y, Makino H, Kudo T, Oka N, Sakurada J, Suzuki H, Kodama H, Yoshinaga K  
Cytokeratin 7-positive/cytokeratin 20-negative cecal adenocarcinoma metastatic to the uterine cervix: a case report, 査読あり World Journal of Surgical Oncology 2016 14:22  
DOI:10.1186/s12957-016-0774-z

Shigeta S, Toyoshima M, Ishibashi M, Usui T, Kitatani K, Yaegashi N  
Transferrin facilitates the formation of DNA double-strand breaks via transferrin receptor 1: the possible involvement of transferrin in carcinogenesis of high-grade serous ovarian cancer, 査読あり Oncogene 2015, Nov 9 DOI:10.1038/onc.2015.425

Kitatani K, Usui T, Sriraman S, Toyoshima M, Ishibashi M, Shigeta S, Nagase S, Sakamoto M, Hannun Y, Torchilin V, Okazaki T, Ogiso H, Yaegashi N  
Ceramide limits phosphatidylinositol-3-kinase C2 -controlled cell motility in ovarian cancer: potential of ceramide as a metastasis-suppressor lipid, 査読あり Oncogene 2015, Sep 14  
DOI:10.1038/onc.2015.330

Toyoshima M, Kudo T, Igeta S, Makino H, Momono Y, Shima T, Matsuura R, Ishigaki N, Akagi K, Takeyama Y, Iwahashi H, Rikimaru H, Sato A, Yoshinaga K  
Spontaneous retroperitoneal hemorrhage

caused by rupture of an ovarian artery aneurysm: a case report and review of the literature, 査読あり Journal of Medical Case Reports 2015 9:84 April  
DOI:10.1186/s13256-015-0553-4

Toyoshima M, Iwahashi H, Shima T, Hayasaka A, Kudo T, Makino H, Igeta S, Matsuura R, Ishigaki N, Akagi K, Sakurada J, Suzuki H, Yoshinaga K  
Solitary uterine metastasis of invasive lobular carcinoma after adjuvant endocrine therapy: a case report, 査読あり Journal of Medical Case Reports 2015 9:47 DOI:10.1186/s13256-014-0511-6

Mashiko S, Kitatani K, Toyoshima M, Ichimura A, Dan T, Usui T, Ishibashi M, Shigeta S, Nagase S, Miyata T, Yaegashi N  
Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer, 査読あり Cancer Biology & Therapy 2015 16(2), 1-8  
DOI:10.1080/15384047.2014.1001271.

Tokunaga H, Watanabe Y, Niikura H, Nagase S, Toyoshima M, Shiro R, Yoshihito Yokoyama Y, Mizunuma H, Ohta T, Nishiyama H, Watanabe T, Sato N, Sugiyama T, Takano T, Takahashi F, Yaegashi N  
Outcomes of Abdominal Radical Trachelectomy: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study in a Tohoku Gynecologic Cancer Unit, 査読あり International Journal of Clinical Oncology 2015 20, 776-780  
DOI:10.1007/s10147-014-0763-6

Takano T, Otsuki T, Tokunaga H, Toyoshima M, Utsunomiya H, Nagase S, Niikura H, Ito K, Yaegashi N, Yamada H, Tase T, Kagabu M, Shoji T, Sugiyama T, Sato N, Fujimoto T, Terada Y, Nakahara K, Kurachi H, Yokoyama Y, Mizunuma H, Soeda S, Nishiyama H, Matsumoto T, Sato S, Shimada M, Kigawa  
J.Paclitaxel-carboplatin for advanced or recurrent carcinosarcoma of the uterus: the Japan Uterine Sarcoma Group and Tohoku Gynecologic Cancer Unit Study, 査読あり International journal of clinical oncology 2014 19(6), 1052-1058  
DOI:10.1007/s10147-013-0658-y

Takano T, Niikura H, Ito K, Nagase S, Utsunomiya H, Otsuki T, Toyoshima M,

Tokunaga H, Kaiho-Sakuma M, Shiga N, Nagai T, Tanaka S, Otsuki A, Kurosawa H, Shigeta S, Tsuji K, Yamaguchi T, Yaegashi N.

Feasibility study of gemcitabine plus docetaxel in advanced or recurrent uterine leiomyosarcoma and undifferentiated endometrial sarcoma in Japan. 査読あり International journal of clinical oncology 2014 19, 897-905 DOI:10.1007/s10147-013-0627-5

[学会発表](計 8 件)

Shigeta S, Toyoshima M, Kitatani K, Ishibashi M, Usui T, Minato J, Yaegashi N

Transferrin in follicular fluid can facilitate DNA double-strand breaks to fallopian tube epithelium: possible involvement of transferrin in the carcinogenesis of high-grade serous ovarian cancer.

Society for Reproductive Investigation 63th scientific annual meeting 2016/3/16-19 Montreal, Canada

北谷和之, 張雪薇, 臼井利典, 豊島将文, 重田昌吾, 石橋ますみ, 湊純子, 小木曾英夫, 岡崎俊朗, 八重樫伸生

卵巣がん転移に関わるセラミド生成代謝酵素

第4回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会2016/2/27 岐阜大学サテライトキャンパス(岐阜市)

石橋 ますみ, 豊島 将文, Mahy Egiz, 張 雪薇, 湊 純子, 重田 昌吾, 北谷 和之, 八重樫 伸生

大規模 siRNA スクリーニングを用いた卵巣がんのシスプラチン抵抗性を克服する分子標的の検討

第4回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会2016/2/27 岐阜大学サテライトキャンパス(岐阜市)

Shigeta S, Toyoshima M, Kitatani K, Minato J, Ishibashi M, Usui T, Yaegashi N

Transferrin facilitates the formation of DNA-double strand breaks via Transferrin receptor 1 in fallopian tube epithelial cells.

AACR special conference Advance in Ovarian Cancer Research 2015/10/17-20 Orland, USA

湊純子, 豊島将文, 北谷和之, 重田昌吾, 石橋ますみ, 臼井利典, 八重樫伸生  
卵巣癌における c-myc と合成致死作用を持つ治療標的分子の探索

第14回日本婦人科がん分子標的研究会 2015/7/18 美ヶ原温泉ホテル翔峰(長野県松本市)

重田昌吾・豊島将文・北谷和之・石橋ますみ・八重樫伸生

月経血や卵胞液に含まれるトランスフェリンは 型トランスフェリン受容体を介して卵管上皮細胞における DNA 二重鎖切断を誘導・増幅する

第66回日本産科婦人科学会学術総会 2015/4/10 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Shigeta S, Toyoshima M, Kitatani K, Ishibashi M, Usui T, Yaegashi N  
Transferrin facilitates DNA-double strand breaks via transferrin receptor 1 in human fallopian tube epithelial cells: possible involvement of transferrin in carcinogenesis. Hilton, San Francisco, Society for Reproductive Investigation 62th scientific annual meeting, 口演 San Francisco, USA 2015/3/25-28

北谷和之、豊島将文、臼井利典、重田昌吾、石橋ますみ、永瀬智、八重樫伸生

セラミドによる卵巣がん播種転移制御 第3回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会、口演、九州大学医学部百年記念講堂(福岡市) 2015/2/21

[図書](計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
<http://www.ob-gy.med.tohoku.ac.jp/laboratory/category01/m-toyoshima.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八重樫 伸生 (YAEGASHI, Nobuo)  
東北大学・大学病院・教授  
研究者番号: 00241597

(2) 研究分担者

豊島 将文 (TOYOSHIMA, Masafumi)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号: 70451581

(3) 連携研究者

北谷 和之 (KITATANI, Kazuyuki)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教  
研究者番号: 40539235