

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16810

研究課題名(和文) 子宮体癌の分子病理学的検討

研究課題名(英文) Molecular analysis of endometrial cancer

研究代表者

深川 安寿子 (FUKAGAWA, YASUKO)

岩手医科大学・医学部・任期付助教

研究者番号：30772511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体癌はホルモン依存性で5年生存率は85%以上と比較的予後良好な癌腫である。その中でも転移や再発、化学療法に治療抵抗を示す症例が存在する。本研究では、特にリンパ節転移に関わるmicroRNA(miRNA)について解明する。microRNAは腫瘍抑制因子または腫瘍遺伝子として機能しており、乳癌においてはmiRNAが予後予測因子である癌細胞の浸潤や転移能、薬剤耐性などに関与し、その種類の特定や作用機序をはじめ、癌の診断や治療の対象としての研究がなされている。本研究では子宮体癌のリンパ節転移に関わる7つのmicroRNAの発現低下に関連することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体癌の腺管分離法を用いて癌腺管からRNAを抽出し、MicroRNA(miR)の解析を行い、リンパ節転移に関わる7つのmicroRNAの発現低下に関連することを明らかにした。

子宮体癌は比較的予後良好な癌腫である一方で、一部では再発や転移、化学療法に抵抗性を示す症例も認める。特にリンパ節転移を示す症例を的確に予測することにより、治療選択肢の拡大につなげることができると考えられる。逆にリンパ節転移を認めない症例には最低限の侵襲に治療を抑えることも可能となる。臨床病理学的な関連性を解明し、子宮体癌の予後不良因子を明らかにし、今度の子宮体癌の予後の改善、治療選択肢の拡大につなげることである。

研究成果の概要(英文)：Endometrial cancer is a hormone-dependent carcinoma with a favorable prognosis with a 5-year survival rate of 85% or more. However, there are cases in which metastasis, recurrence, and resistance to chemotherapy are present. This study elucidates the microRNA(miRNA) involved in lymph node metastasis.

The microRNA functions as a tumor suppressor or an oncogene. In breast cancer, it has been found that miRNAs are involved in cancer invasion, metastasis, and drug resistance. In this study, it is related to the down-regulation of seven microRNAs involved in lymph node metastasis of endometrial cancer.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮体癌 類内膜癌 microRNA リンパ節転移

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮体癌は増加傾向にあることから、その診断や治療は今後ますます重要になると考えられる<sup>1</sup>。本腫瘍は組織学的にタイプ1と2に大別され、タイプ1は中分化(Grade2)から高分化(Grade1)の類内膜癌の像を示し、ホルモン依存性(エストロゲン)で、5年生存率は85%以上と比較的予後良好な癌腫である<sup>2</sup>。分子異常としてはPTENおよびKRAS遺伝子変異を高頻度に認め、MSI(microsatellite instability)を含んでいることも特徴の1つである。一方、タイプ2は、組織学的に低分化型(Grade3)の類内膜癌や漿液性癌、明細胞癌であり、予後は不良とされる<sup>2</sup>。p53変異や多数のLOH(loss of heterozygosity)がみられる。子宮体癌の約9割を占めるタイプ1の多くは、外科的治療や化学療法により良好な経過をたどるが、その中にも転移や再発、化学療法に治療抵抗を示す症例が存在する。これら予後不良の経過をたどる類内膜腺癌に関する分子生物学的機序については、いまだ十分に解明されていない。

(2) 近年、タンパク質へ翻訳されないRNAであるnon-coding RNA(ncRNA)が生命機能維持に重要な役割を担っており、そのうち22塩基前後の小分子から成るmicroRNA(miRNA)やlong ncRNAが癌をはじめ様々な病態へ関連することが明らかとなった。その機能としてmicroRNAが腫瘍抑制因子または腫瘍遺伝子として機能している<sup>3</sup>。乳癌においては、miRNAが予後予測因子である癌細胞の浸潤や転移能、薬剤耐性などに関与し、その種類の特定や作用機序をはじめ、癌の診断や治療の対象としての研究がなされている<sup>4</sup>。

### 2. 研究の目的

(1) 研究の目的は、子宮体癌の腺管分離法を用いて癌腺管からRNAを抽出し、MicroRNA(miRNA)の解析を行い、臨床病理学的な関連性を解明し、子宮体癌の転移、再発、薬剤耐性に関わる因子を明らかにし、今度の子宮体癌の予後の改善、治療選択肢の拡大につなげることである。

### 3. 研究の方法

(1) 手術前に同意を得られた子宮体癌27症例に対して、採取された検体を用いて、癌腺管の腺管分離法を行い、得られた分離腺管からRNAを抽出し、発現解析を行う。

対象とした子宮体癌27症例の臨床病理学的背景を表1に示す。

(2) 腺管分離法はAraiら<sup>5</sup>の方法を用いて行う。新鮮腫瘍組織片を採取し、EDTAを加えたCMF Hanks溶液に入れ、加熱震盪し、1600回転で5分間遠心し上清を捨てた後、CMF液を加え常温で30分間震盪させ、癌腺管を分離する。その後、70%エタノール液で固定。分離された腺管を実体顕微鏡(SZX16、Olympus、Tokyo、Japan)で観察後、癌腺管のみを同定し回収し一部は、形態解析用サンプルとして、パラフィン包埋後、薄切しHematoxylin & Eosin(HE)染色標本を作成し、純粋な癌腺管であることを確認する。腺管分離法により回収された癌腺管からRNAを抽出し、解析を行う。

(3) miRNAの測定は、Thermo Fisher社のGeneChip<sup>R</sup> miRNA 4.0 Arrayを用いて行う。プローブ数は6631を持つ。正常組織と癌組織それぞれの比較検定を行う。正常組織を1とした時の比較対象の比を数値化する。

(4) 統計学的解析は、D'Agostino-Pearson正規性検定、Matched-t検定、Wilcoxon検定、Bonferroni's補正を用いて行う。統計ソフトはJMP Pro 13(SAS Institute Inc. Cary, NC, USA)、GraphPad Prism 6(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとする。

### 4. 研究成果

(1) 子宮体癌27症例のmicroRNAの特徴として、57のmicroRNAに発現レベルの上昇を認め、176のmicroRNAに発現レベル低下を認めた(図1)。特に発現レベルの頻度の高いものを表2に示す。

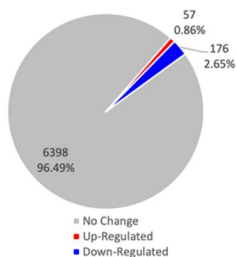


図1 子宮体癌27症例のmicroRNAの発現レベル

| miRNA ID        | log2ratio | regulate | P-value | miRNA ID        | log2ratio | regulate | P-value  |
|-----------------|-----------|----------|---------|-----------------|-----------|----------|----------|
| Has-miR-642a-3p | 8.36      | Up       | 0.0428  | Has-miR-199a-3p | -142.68   | Down     | > 0.0002 |
| Has-miR-4284    | 7.64      | Up       | 0.0002  | Has-miR-199b-3p | -142.68   | Down     | > 0.0002 |
| Has-miR-4454    | 5.53      | Up       | 0.0018  | Has-miR-199a-5p | -96.58    | Down     | > 0.0002 |
| Has-miR-3178    | 5.49      | Up       | 0.0004  | Has-miR-143-3p  | -62.99    | Down     | > 0.0002 |
| Has-miR-6820-5p | 5.06      | Up       | 0.0107  | Has-miR-152-3p  | -48.25    | Down     | > 0.0002 |
| Has-miR-6813-5p | 4.93      | Up       | 0.0270  | Has-miR-99a-5p  | -39.64    | Down     | 0.0024   |
| Has-miR-6132    | 4.61      | Up       | 0.0019  | Has-miR-195-5p  | -38.78    | Down     | 0.0245   |
| Has-miR-5100    | 4.24      | Up       | 0.0288  | Has-miR-486-5p  | -36.09    | Down     | > 0.0002 |
| Has-miR-4492    | 4.22      | Up       | 0.0005  | Has-miR-19b-3p  | -31.58    | Down     | 0.0160   |
| Has-miR-7975    | 4.22      | Up       | 0.0132  | Has-miR-126-3p  | -30.27    | Down     | 0.0033   |

表2. (A) Top 10 Up-regulated microRNAs

表2. (B) Top 10 Down-regulated microRNAs

| Total                 | 27 (%)           |
|-----------------------|------------------|
| Age( means)           | 64 (36-85)       |
| Grade                 |                  |
| 1                     | 13 (48)          |
| 2                     | 4 (15)           |
| 3                     | 10 (37)          |
| FIGO stage            |                  |
| I A                   | 8 (30)           |
| I B                   | 8 (30)           |
| III C1                | 7 (26)           |
| III C2                | 4 (15)           |
| Myometrium invasion   |                  |
| < 1/2                 | 10 (37)          |
| ≥ 1/2                 | 17 (63)          |
| Vascular invasion     | positive 7 (26)  |
| Lymphatic invasion    | positive 19 (70) |
| Lymph node metastasis | positive 11 (41) |

表1 子宮体癌27症例における臨床病理学的検討

(2) 子宮体癌 27 症例のうち、リンパ節転移陽性症例を A 群、リンパ節転移は陰性だが、リンパ管侵襲や脈管侵襲が陽性の症例を B 群、リンパ節転移陰性、かつリンパ管侵襲、脈管侵襲陰性を C 群として分類した。各群における臨床病理学的背景について表 3 に示す。

| Clinicopathological findings | A<br>11 (%)   | B<br>8 (%)    | C<br>8 (%)    | Total<br>27   |          |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------|
| Age (mean)                   | 61<br>(36-82) | 62<br>(52-85) | 68<br>(61-81) | 64<br>(36-85) |          |
| Grade                        | 1             | 5 (45%)       | 5 (63%)       | 13 (48%)      |          |
|                              | 2             | 2 (18%)       | 0 (0%)        | 2 (25%)       |          |
|                              | 3             | 4 (36%)       | 3 (38%)       | 10 (37%)      |          |
| FIGO stage                   | I A           | 0 (0%)        | 3 (38%)       | 5 (63%)       |          |
|                              | I B           | 0 (0%)        | 5 (63%)       | 3 (38%)       |          |
|                              | III C1        | 7 (64%)       | 0 (0%)        | 0 (0%)        |          |
| III C2                       | 4 (36%)       | 0 (0%)        | 0 (0%)        | 4 (15%)       |          |
| Myometrium invasion          | ≥1/2          | 9 (82%)       | 5 (63%)       | 3 (38%)       | 17 (63%) |
| Vascular invasion            | positive      | 4 (36%)       | 3 (38%)       | 0 (0%)        | 7 (26%)  |
| Lymphatic invasion           | positive      | 11 (100%)     | 8 (100%)      | 0 (0%)        | 19 (70%) |
| Lymph node metastasis        | positive      | 11 (100%)     | 0 (0%)        | 0 (0%)        | 11 (41%) |

表3 各群における臨床病理学的検討

A群:リンパ節転移陽性  
B群:リンパ節転移陰性、リンパ管侵襲陽性または脈管侵襲陽性  
C群:リンパ節転移陰性、リンパ管侵襲陰性かつ脈管侵襲陰性

(3) 各群における miRNA の発現レベルの差

A 群と C 群間における miRNA の発現レベルは、7 つの miRNA において有意な差を認め、表 4 に示す。miR-6068 が Up regulation を示し、その他 6 つの項目で Down-regulation を認めた。

B 群と C 群間における miRNA の発現レベルは、5 つの miRNA において有意な差を認め、表 5 に示す。いずれも Down-regulation を認めた。

A 群と B 群間における miRNA の発現レベルは、2 つの miRNA において有意な差を認め、表 6 に示す。どちらも Down-regulation を認めた。

| miRNA ID        | log2ratio | Regulation | P-value |
|-----------------|-----------|------------|---------|
| hsa-miR-6068    | 2.22      | Up         | 0.0032  |
| hsa-miR-10b-5p  | -2.1      | Down       | 0.0156  |
| hsa-miR-2110    | -2.16     | Down       | 0.0193  |
| hsa-miR-3131    | -2.21     | Down       | 0.0324  |
| hsa-miR-3158-2  | -2.45     | Down       | 0.0439  |
| hsa-miR-6876-5p | -2.52     | Down       | 0.0095  |
| hsa-miR-874-3p  | -3.53     | Down       | 0.0053  |

表4. A vs C microRNAs

| miRNA ID        | log2ratio | Regulation | P-value  |
|-----------------|-----------|------------|----------|
| hsa-miR-6753-5p | -2.15     | Down       | 0.0035   |
| hsa-miR-6836    | -2.26     | Down       | > 0.0002 |
| hsa-miR-4788    | -2.43     | Down       | 0.0331   |
| hsa-miR-711     | -2.62     | Down       | 0.0387   |
| hsa-miR-874-3p  | -2.93     | Down       | 0.0250   |

表5. B vs C microRNAs

| miRNA ID       | log2ratio | Regulation | P-value |
|----------------|-----------|------------|---------|
| hsa-miR-20a-5p | -2.27     | Down       | 0.0404  |
| hsa-miR-20b-5p | -2.87     | Down       | 0.0213  |

表6. A vs B microRNAs

(4) 考察

上記結果より、リンパ節転移やリンパ管、脈管侵襲に関わる microRNA の詳細について言及した。今後、分子生物学的背景を理解することにより、正確な病期決定の一助となり、適切な治療選択、予後改善につなげることが重要である。

< 引用文献 >

- Collins, Y., Holcomb, K., Chapman-Davis, E., Khabele, D. & Farley, J. H. Gynecologic cancer disparities: a report from the Health Disparities Taskforce of the Society of Gynecologic Oncology. *Gynecol Oncol* 133, 353-361, doi:10.1016/j.ygyno.2013.12.039 (2014).
- Bokhman, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15, 10-17, doi:10.1016/0090-8258(83)90111-7 (1983).
- Farazi, T. A., Hoell, J. I., Morozov, P. & Tuschl, T. MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 774, 1-20, doi:10.1007/978-94-007-5590-1\_1 (2013).
- O'Day, E. & Lal, A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res* 12, 201, doi:10.1186/bcr2484 (2010).
- Arai, T. & Kino, I. Morphometrical and cell kinetic studies of normal human colorectal mucosa. Comparison between the proximal and the distal large intestine. *Acta pathologica japonica* 39, 725-730, doi:10.1111/j.1440-1827.1989.tb02421.x (1989).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|