

## 論文内容の要旨

Molecular analysis of isolated tumor glands in endometrioid adenocarcinomas  
(子宮類内膜腺癌における分離腫瘍腺管を用いた分子解析)

(菅安寿子, 菅井 有, 深川智之, 上杉憲幸, 山本栄一郎, 鈴木 拓, 杉山 徹)  
(Modern Pathology (投稿審査中))

## I. 研究目的

子宮体癌は分子病理学的な観点から Type 1 と Type 2 に大別されるが、Type1 は組織学的には中分化型から高分化型の類内膜腺癌の像を示し、ホルモン依存性 (エストロゲン) で、予後も良好とされている。分子解析にも PTEN 遺伝子変異を高頻度に認め、*KRAS* 変異も比較的多いとされている。加えて MSI (microsatellite instability) を含んでいることも特徴の 1 つとされている。しかしながら、MSI と MSS (microsatellite stable) が Type 1 のカテゴリーの中に包括されており、類内膜腺癌において MSS の分子病理学的特徴については十分に検討されていないのが現状である。本研究では類内膜腺癌の分離腺管を用い癌細胞のみの DNA を抽出し、1) 染色体コピー数変化 (Copy number variation: CNV)、2) *p53*、*KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA*、PTEN 異常、3) MSI、4) DNA メチル化について解析し、a) 上記分子異常の相互関係を明らかにすること、b) CNV の観点から類内膜腺癌の分子異常の特徴を明らかにすること、を目的とした。

## II. 研究対象ならび方法

岩手医科大学付属病院産婦人科で外科的に切除された子宮類内膜腺癌症例 32 例を対象とした。新鮮腫瘍組織から腺管分離法を用いて癌腺管を単離し、DNA を抽出した。CNV については SNP array を用いて解析した。解析には、Illumina Human CytoSNP-12 Bead Chip を用い、CNV Partition Algorithms (Illumina) の判定基準に従い、コピー数増加、コピー数変化のない LOH およびコピー数減少に分類した。また、CNV の結果をもとに Ward's method を用い、階層的クラスター解析を行った。遺伝子変異は pyro-sequence 法 (*KRAS*、*BRAF*) または PCR-SSCP 変異解析 (*p53*、*PIK3CA*) を用いて解析した。後者については direct sequence 法により変異を同定した。PTEN 発現異常は免疫組織化学的に解析した。DNA メチル化解析は pyro-sequence 法を用いて行い、CIMP 陽性を同定した。また、MSI 解析は PCR 法を用いて行い、MSI と MSS に分類した。

## III. 研究結果

1. PTEN 発現低下もしくは消失 (*PTEN* 変異) は類内膜腺癌に共通の分子異常であった。一方 *KRAS* 変異及び *BRAF* 変異は低頻度であった。
2. MSI は類内膜腺癌の 25% にみられたが、CIMP や *BRAF* 変異とは関連しなかった。
3. 1) 染色体コピー数増加は、1q (23%)、8q (13%)、10p (13%)、10q (28%) に高頻度に見られた。  
2) コピー中性的 LOH は 10q (22%) にやや多くみられたが、LOH の頻度は低かった。

4. 染色体全領域におけるコピー数異常は、コピー数増加やコピー中性的 LOH の頻度が高く、これに対してコピー数減少は有意に低頻度であった ( $p < 0.01$ )。
5. 階層的クラスター解析によって 4 群に分類され、Cluster 1 では 10q のコピー数変化が多く、高度核異型を示す頻度が高かった ( $p < 0.05$ )。Cluster 2 ではコピー数変化に乏しいが ( $p < 0.01$ )、MSI high の頻度が高い傾向が見られた (7/17, 41%)。また、低異型度を示す症例の頻度が高かった ( $p < 0.05$ )。一方、cluster 3 では 1q のコピー数増加が多くみられた ( $p < 0.01$ )。
6. 染色体コピー数変化と p53、KRAS 及び PIK3CA 変異、PTEN 発現低下、CIMP との関連性は認めなかった。

#### IV. 結 語

子宮類内膜腺癌の発生においては、CNV は重要な役割を担っていない可能性が示唆される結果ではあったが、一部の症例においては 1q、10q のコピー数増加もしくは 10q のコピー数の変化のない LOH との関連性が示唆された。子宮内膜腺癌では、コピー数増加領域の DNA サイズはコピー数減少と比べ大きく、コピー数増加が重要な役割を担っていることが示唆された。階層的クラスター解析では子宮類内膜腺癌の染色体異常のパターンは 4 群に層別化されることが示された。これらの分類はコピー数異常や MSI の出現などに特異性がみられた。

今回用いた SNP array による解析では、従来指摘されてこなかったコピー数変化のない LOH の検出が可能となった。また、分離腫瘍腺管による SNP array を用いた染色体コピー数の検討はこれまで皆無で信頼性の高いデータが得られた。

#### V. 学位申請後経過

- ※1 最終審査後、Pathology International 65 巻 5 号に 2015 年 5 月掲載予定
- ※2 査読による内容の変更は不要であった。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 人見 次郎 (解剖学講座：人体発生学分野)  
副査 教授 菅井 有 (病理学講座：病理病態学分野)  
副査 教授 増田 友之 (病理学講座：病理病態学分野)

本研究は子宮類内膜腺癌の生物学的特性の解明を目的に、分離腺管のゲノム解析を行ったものである。腺管分離法は、間質から腺管を分離することで癌細胞由来の DNA のみを抽出可能にする著者の研究グループの独創的な手法である。

ゲノム解析は 1) 染色体コピー数変化 (Copy number variation: CNV)、2) *p53*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN* 異常、3) MSI、4) DNA メチル化について実施され、CNV 解析では、一定の頻度で 1q や 10q のコピー数増加、10q のコピー数の変化のない LOH などが認められた。しかし、大腸がんなどと比較して、CNV の頻度と程度は低値で、変異解析や MSI 解析、DNA メチル化解析との関連性も認められず、子宮類内膜腺癌の発生で、CNV の役割は限定されたものと結論を得た。ただし、コピー数増加領域の DNA サイズはコピー数減少と比べ大きく、コピー数増加が何らかの役割を担っている可能性がある。階層的クラスター解析では、子宮類内膜腺癌を 4 群に層別化でき、それぞれの階層でコピー数異常の頻度および領域や MSI の出現などの変異や核異型度に特異性があった。

本研究は、がん細胞特異的な解析により、類内膜腺癌が比較的ゲノム変異の少ない「がん」であること、ゲノム変異と核異型度に相関があること、を明らかにした。また、従来指摘されて来なかった「コピー数変化のない LOH」の存在を発見した。類内膜腺癌の発生の解明に重要な知見を与える有意義な研究であり、学位に値する論文である。

## 試験・試問の結果の要旨

子宮類内膜腺癌の分類、発がんの分子機序におけるゲノム変異の様式、さらに染色体コピー数変化の解析手法について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると判断できる。

## 参考論文

- (1) Molecular analysis of endometrial endometrioid adenocarcinoma based on estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 expression: a proposal for novel classification of endometrioid adenocarcinomas (エストロゲンレセプター, プロゲステロンレセプター, HER2 発現に基づいた子宮類内膜腺癌の分子病理学的解析: 子宮類内膜腺癌の新しい分類の提唱) (苫米地英俊, 他 7 名と共著).  
岩手医学雑誌 66 巻 3 号, 2014 年 8 月掲載予定
- (2) A pilot study of oxaloplatin with oral S-1 as second-line chemotherapy for patients with recurrent adenocarcinoma of the uterine cervix (再発子宮頸部腺癌のオキサロプラチンと経口 S-1 を用いたセカンドライン化学療法の研究) (高取恵里子, 他 9 名と共著)  
International Journal of Clinical Oncology, Publish online, 2013 年 3 月掲載