

論文の内容の要旨

論文題目 日本人の卵巣癌の発生と進展に関する病理組織学的研究

指導教員 深山正久

東京大学大学院医学系研究科

平成18年4月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

前田大地

卵巣癌は卵巣表層上皮性・間質性腫瘍に分類される悪性腫瘍で、主に明細胞腺癌、漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌という4つの組織型からなる。現在、卵巣癌に対する手術術式や術後化学療法の種類は、その組織型とは関係なく一定のものが選択されることがほとんどである。しかしながら、近年、卵巣癌の各組織型は組織像が異なるだけではなく、その発生母地や腫瘍化に関わる遺伝子変異にも大きな違いがあることが分かってきた。今後卵巣癌研究を行っていくにあたっては、組織型ごとの特性を明らかにしていくことが重要になってくるだろう。また、将来的には卵巣癌の治療戦略も組織型ごとに特化したものになっていく可能性がある。

私は、東京大学医学部附属病院で過去24年間に切除された卵巣癌症例の組織像の見直しを行う過程で、明細胞腺癌の特異性、卵巣癌が卵巣表層上皮以外に由来する可能性、粘液性腫瘍における良性腫瘍→境界悪性腫瘍→腺癌という段階的な発癌過程、といった点に興味を持つに至った。そして、大学院博士課

程ではこれらのテーマに関して病理組織学的、分子生物学的手法を用いた研究を行った。

本研究は以下の三部から構成されている。

①卵巣明細胞腺癌における Glypican-3 発現

②卵巣癌に併存する卵管上皮内癌の意義

③卵巣粘液性腫瘍の悪性化と ribonucleotide reductase subunit M2 (RRM2) 発現との関連

それぞれの内容に関して以下に概説する。

①卵巣明細胞腺癌における Glypican-3 発現

卵巣明細胞腺癌は欧米に比べて日本における発生頻度が高い卵巣癌である。また、明細胞腺癌は卵巣癌の中でも特に化学療法抵抗性で予後不良であることが知られている。明細胞腺癌の病態を解明し、新しい治療戦略につなげることは日本の婦人科腫瘍研究者にとって重要な課題とされてきた。本研究で我々は、卵巣癌の中で明細胞腺癌特異的に Glypican-3(GPC3)という oncofetal protein の発現亢進が起きていることを免疫組織化学的に示した。GPC3 陽性症例の割合は明細胞腺癌：41例/94例 (44%)、漿液性腺癌：6例/56例 (11%)、粘液性腺癌：1例/25例 (4%)、類内膜腺癌：2例/38例 (5%) となっていた。び慢性のGPC3陽性像が見られたのは明細胞腺癌のみであった。また、明細胞腺癌の benign counterpart と考えられる婦人科領域の非腫瘍性上皮 (卵巣表層上皮封入嚢胞、卵管上皮、子宮内膜腺、子宮頸管腺、子宮内膜定性病変)のGPC3発現を検討したところ、妊娠期の内膜腺以外はGPC3を発現していなかった。このことから明細胞腺癌のGPC3発現は癌化に伴って亢進したものと考えられた。続いて我々は明細胞腺癌とGPC3の関係について臨床病理学的検討を行い、Stage III/IVの明細胞腺癌症例ではGPC3陽性例の予後がGPC3陰性例の予後に比べて有意に悪いことを示した ($P=0.019$)。さらに、GPC3を発現している明

細胞腺癌細胞株RMG-Iに対してRNAiによるGPC3発現抑制を行ったところ細胞増殖が抑制されたことから、GPC3発現が明細胞腺癌細胞の増殖促進に寄与していると考えられた。近年、GPC3を標的とした抗体治療や免疫療法に関しては目覚ましいペースで研究が進んでおり、その中には臨床試験の段階に入っているものもある。我々の知見は、GPC3を標的とした治療が、予後不良とされる卵巣明細胞腺癌の一群に対して有効である可能性を示唆した点においても重要だと思われる。

②卵巣癌に併存する卵管上皮内癌の意義

従来、卵巣漿液性腺癌の大部分を占める high-grade serous adenocarcinoma は卵巣表層上皮に TP53 変異が起きて *de novo* に生じてくると考えられていた。しかし、近年、卵管采を含む卵管全長の詳細な検討によって、卵巣漿液性腺癌と腹膜漿液性腺癌（特に high-grade serous adenocarcinoma）に高頻度に卵管上皮内癌 (tubal intraepithelial carcinoma: TIC) が併存することが報告された。これらの報告に基づき、「卵管上皮内癌 (TIC) が卵巣・腹膜の high-grade serous adenocarcinoma の前駆病変である」という新仮説が唱えられ、広い支持を集めつつある。しかし、TIC と卵巣癌の関連を検討した研究は欧米の少数施設でなされたものに限られており、それらは主に high-grade serous adenocarcinoma 症例を対象としている。また、TIC の特徴として、免疫組織化学的に p53 蛋白の過剰発現が見られることを挙げているものが多い。明細胞腺癌を含む非漿液性腺癌と TIC の関係や p53 蛋白の過剰発現を伴わない TIC が存在する可能性に関してはほとんど検討されていない。

我々は、日本人の卵巣癌・腹膜癌症例を対象として卵管全割全埋法による TIC 検索を行い、上記の新仮説の検証を行った。本研究は明細胞腺癌を含む幅広い卵巣癌・腹膜癌症例を対象とした。また、TIC が存在していた症例に関しては TIC と卵巣・腹膜の主腫瘍の両者に対して p53 の免疫染色を施行し、p53

蛋白過剰発現の有無を調べた。

我々が卵管全割全包埋法を遂行できた症例は卵巣癌 53 例 (漿液性腺癌 12 例、明細胞腺癌 23 例、類内
膜腺癌 9 例、粘液性腺癌 4 例、その他の癌 4 例) と腹膜漿液性腺癌 3 例であった。このうち TIC の併存
を認めたのは 7 例であった。これら 7 例では、いずれも卵巣・腹膜の主腫瘍の組織型が漿液性腺癌であ
った。TIC と卵巣・腹膜主腫瘍の p53 に対する染色態度は一致しており、p53 陽性を示したのは 7 例中 3
例であった。一方、非漿液性腺癌症例 (n=41) には TIC の併存は見られなかった。この結果からは、TIC
が非漿液性腺癌の発癌には関与していないことが示唆される。なお、本研究で検出された TIC のほとん
どは卵管采に局在していた。卵管病変を探索するにあたっては卵管采を含む卵管全長を切り出すことが
重要だと言えよう。

本研究における漿液性腺癌の TIC 併存率 (7 例/15 例) は、既報のデータとほぼ同等であった。この結
果は、卵巣・腹膜の漿液性腺癌とされてきた腫瘍の一部が TIC を前駆病変とする卵管上皮由来の腫瘍で
あることを支持するものである。ただし、本研究で p53 陰性の TIC が半数以上存在したことは、既報と
異なる知見であり、注目に値する。今まで TIC から卵巣癌・腹膜癌に至る過程は TP53 遺伝子の異常が
関与する経路として説明される傾向にあったが、TIC の中にはその発生、進展に TP53 遺伝子異常が関与
していないものも存在すると考えられる。今後 TIC の意義を掘り下げていく際には他の因子が関与して
いる可能性も考慮していくべきである。

③卵巣粘液性腫瘍の悪性化と ribonucleotide reductase subunit M2 (RRM2) 発現との関連

卵巣粘液性腺癌は良性粘液性腫瘍、境界悪性粘液性腫瘍を経て生じてくると考えられている。我々は
ribonucleotide reductase subunit M2 (RRM2) という蛋白に注目し、RRM2 が卵巣粘液性腫瘍の悪性化に関わ

っている可能性を探った。Ribonucleotide reductase (RR)は DNA 合成の重要なステップである ribonucleotide 5'-diphosphates から 2'-deoxyribonucleotides への変換に働く酵素であり、RR の酵素活性はその M2 subunit (RRM2)のレベルに依存していると考えられている。今までにくつかの癌において、主に mRNA レベルでの RRM2 発現の検討が行われており、mRRM2 の発現亢進が化学療法に対する抵抗性、腫瘍細胞の浸潤能上昇、不良な患者予後につながることを示されてきた。ただし、蛋白レベルでの RRM2 発現を検討した研究は少なく、卵巣癌に関しては報告がない。

我々は卵巣粘液性腫瘍(良性、境界悪性、癌)の蛋白レベルでの RRM2 発現を免疫組織化学的に検討し、各腫瘍における RRM2 陽性細胞の割合を RRM2 index として計算した。良性粘液性腫瘍 (n=30)、境界悪性粘液性腫瘍 (n=23)、粘液性腺癌 (n=15)を対象として検討した結果、各腫瘍群の RRM2 index の平均は良性粘液性腫瘍 : 0.88%、境界悪性粘液性腫瘍 : 9.37%、粘液性腺癌 : 21.11% となった。良性粘液性腫瘍と境界悪性粘液性腫瘍の間、境界悪性粘液性腫瘍と粘液性腺癌の間には RRM2 index の値に統計学的有意差 (いずれも $P < 0.0001$) を認めた。また、粘液性腺癌を Stage I/II 症例と Stage III/IV 症例に分けて、両者の RRM2 index を比較したところ、Stage III/IV 症例の RRM2 index の方が有意に高いことが分かった ($P = 0.0264$)。粘液性腺癌症例に関して生存曲線解析を行ったところ、統計学的に有意とは言えないものの、RRM2 index $\geq 20\%$ 以上の症例の方が RRM2 index $< 20\%$ の症例に比べて予後が悪い傾向にあった ($P = 0.0957$)。以上の結果より、我々は、RRM2 が粘液性腺癌の発癌の過程で発現が亢進してくる重要な遺伝子であり、かつ、RRM2 発現は粘液性腺癌の malignant behavior の指標になりうる考えた。

続いて我々は3種類の粘液性腺癌細胞株 (MCAS、RMUG-S、OMC-3) に対して siRNA による RRM2 発現抑制を行い、いずれの細胞においても増殖抑制が起きることを示した。この結果は RRM2 が粘液性腺

癌細胞において増殖促進に働いていることを示すものである。また、RRM2を特異的に阻害するような薬剤が卵巣粘液性腺癌に対する有効な治療オプションになりうることを示唆している。

最後に、RRM2が粘液性腺癌の化学療法抵抗性に関与している可能性に着目し、検討を行った。具体的には粘液性腺癌細胞株 (MCAS) に対してsiRNAを用いたRRM2のknockdownを行い、cisplatin、paclitaxel、gemcitabineという3種類の抗癌剤に対する感受性の変化を見た。その結果、RRM2の発現抑制によってMCAS細胞のcisplatin感受性が増加することが判明した。このことから、RRM2発現は粘液性腺癌細胞のcisplatin抵抗性に寄与していると考えられた。逆に、paclitaxel、gemcitabineに対する感受性はRRM2の発現抑制によって低下した。卵巣粘液性腺癌ではRRM2の発現がpaclitaxel、gemcitabineに対する感受性を増す方向に働いている可能性が考えられた。RRM2がどのようにして化学療法感受性に変化を及ぼしているかに関しては今後さらに検討を加えて明らかにしていきたいと考えている。