

学位論文

「Identification of new prognostic molecules,  
their functional analyses, and clinical application  
for ovarian cancer」

(卵巣癌の新規予後因子の同定、機能解析、  
そして臨床応用に関する研究)

DM18032 横井 愛香

北里大学大学院 医療系研究科 医学専攻 博士課程  
生体構造医科学群 分子病理学  
指導教授 三枝 信

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 要旨

### 【緒論】

上皮性卵巣癌（OECa）は婦人科腫瘍の中でも死亡率が高く、最も予後不良な腫瘍である。卵巣癌は腹腔内で発生するため、初期段階での自覚症状が乏しいことが多く、患者の75%以上が転移・播種を伴う進行期として診断される。標準的治療は、手術により可及的に腫瘍を取り除き、術後化学療法を行う。この化学療法では、組織型（漿液癌（SeCa）／類内膜癌（EmCa）／明細胞癌（CCCa）／粘液癌（MuCa））によって感受性が異なるため、病理診断時の組織型判定が重要となる。しかし、一部のOECaでは複数の組織型の混在や特定の組織構造を示さない低分化癌の様相など多彩な組織像を呈するため、病理診断は難渋する。

この背景から、OECaを組織型に依存しない分類で確立するため、OECaと関連性の高い12種類の免疫組織化学（IHC）マーカー（p53、HNF-1 $\beta$ 、ARID1A、ER $\alpha$ 、PR、Vimentin、PTEN、PIK3CA、WT1、LEFTY、 $\beta$ -catenin、Ki-67）の発現パターンから、階層的クラスター解析を用いてOECaをタンパク発現プロファイルの観点から簡易的な分類システムを構築することを目的とした。さらに、この分類から予後予測を可能とするために予後不良表現型を特定し、予後不良となる詳細な分子機構を解明する。

### 【材料・方法】

臨床検体は、2006年から2017年までの北里大学病院にて外科的に切除された卵巣癌のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体282症例（SeCa：82例／EmCa：47例／CCCa：85例／MuCa：41例／分類不能腺癌（HGCa）：27例）を用いた。12種類のIHCマーカー（p53、HNF-1 $\beta$ 、ARID1A、ER $\alpha$ 、PR、Vimentin、PTEN、PIK3CA、WT1、LEFTY、 $\beta$ -catenin、Ki-67）で免疫組織化学染色を行い、染色強度4段階及び陽性細胞率5段階を乗じてIHC scoreとして評価した。その結果を統計解析ソフト「R」ver.3.3.1よりクラスター解析を行った。また、FFPE検体55例よりDNAを抽出し、Direct-Sequence法を用いて遺伝子変異の有無を解析した。

培養細胞は、卵巣癌培養細胞（CCCa細胞株：OVISe, ES-2, OVTOKO, TOV21G／High Grade SeCa（HGSeCa）細胞株：OVSAHO, OVCAR3）を用いた。OVISe細胞よりp53-shRNA細胞株を作製し、タンパク発現（Western blotting）、mRNA発現（RT-PCR, real time RT-PCR）、細胞増殖能検討（Cell Counting Kit-8 assay）、細胞周期解析（Flow cytometry）、薬剤耐性能検討（Apoptotic index）、細胞移動能

検討 (Wound healing assay, Migration assay) を行った。さらに、p53-shRNA 細胞株より total RNA を抽出し、NextSeq 500 System (Illumina) を用いて次世代シーケンス解析を行った。この研究は北里大学医学部・病院倫理委員会にて承認されている (B16-10)。

## 【結果】

### 1. immunoprofile による新規予後因子の同定

OECa をタンパク発現のみで分類するため、FFPE 検体 282 症例を 12 種類の IHC マーカーで免疫組織化学染色後 Score 化し、階層的クラスター解析を行った結果、(I) HNF-1 $\beta$ - / p53- / WT1+, (II) HNF-1 $\beta$ - / p53+ / WT1-, (III) HNF-1 $\beta$ - / p53+ / WT1+, (IV) HNF-1 $\beta$ - / p53- / WT1-, (V) HNF-1 $\beta$ + / ARID1A-, (VI) HNF-1 $\beta$ + / p53- / ARID1A+, (VII) HNF-1 $\beta$ + / p53+ / ARID1A+ と 7 つの群に分類 (immunoprofile groups : IPGs) し、発現パターンによる Flow Chart システムを構築した。(+: 高発現, -: 低発現または発現無し) また、IPGs と遺伝子異常の関連を調べるため、*CTNNB*, *TP53*, *PIK3CA*, *K-ras* の点突然変異を検索した。IPGs 間で比較すると、*CTNNB* は EmCa 主体である IV 群、*TP53* は p53 高発現であった II 群・III 群・VII 群、*PIK3CA* は CCCa が主体となる V 群で点突然変異が高頻度であり、さらに、*CTNNB* 及び *TP53* の点突然変異と IHC score では正の相関が認められた ( $p < 0.0001$ )。

Kaplan-Meier 生存曲線より、組織型別では EmCa が Overall survival (OS)・Progression-free survival (PFS) 共に最も予後良好であり、一方で MuCa は OS で有意に予後不良であった。IPGs 間では、OS・PFS 共に IV 群が最も予後良好で、対して VII 群が予後不良であった。尚、VII 群の組織型内訳は MuCa 15 例、HGSeCa 6 例、CCCa 5 例であったことにより、予後不良の組織型である MuCa を除いた Non-MuCa 群として、他群と比較しても同様に有意に予後不良であった。

これらの結果から、日常病理診断時でも使用しているマーカーによって OECa をタンパク発現のみで 7 つの群に分類し、特に VII 群 : HNF-1 $\beta$ + / p53+ / ARID1A+ を示す腫瘍は予後不良であることが明らかとなった。また、考案した IPGs は遺伝子異常と相関し、高精度な分類法であることが示唆された。

### 2. 同定した新規予後因子表現型腫瘍の特徴

VII 群に含まれていた CCCa 及び HGSeCa における予後不良の分子機構を解明す



るため、HNF-1 $\beta$ +／p53+／ARID1A+表現型細胞モデルを作製した。CCCa 細胞株及び HGSeCa 細胞株の中から、内在性 HNF-1 $\beta$ 及び ARID1A が発現し、p53 wild-type (p53wt) である OVISE 細胞を用いて、shRNA ベクターで p53 発現を抑制した細胞株を作製した (OV-shp53)。OV-shp53 では HNF-1 $\beta$ 及び ARID1A のタンパク発現が増加し、p53 標的因子である MDM2 や p21<sup>waf1</sup> の発現は減少していた。

OV-shp53 の細胞形態は mock と比較して著しく線維芽細胞様形態へ変化し、上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition : EMT) マーカーである Snail 発現が増加し、上皮マーカーの E-cadherin 発現は減少していた。*Snail* mRNA 発現は、OV-shp53 で若干増加していたものの有意ではなかった。Reporter assay より、p53wt 及び p53 mutant (R248Q) (p53mt) を CCCa 細胞に遺伝子導入し *Snail* 遺伝子の promoter 活性を検索した。p53wt と比べ p53mt では転写活性が抑制されておらず、p53 機能消失により *Snail* 遺伝子の promoter 活性を抑制する機能が低下していることが示唆された。これらの結果から、p53 機能消失により起こる影響として HNF-1 $\beta$  及び ARID1A の発現が増加し、Snail 発現の翻訳後制御を介して EMT を誘導している可能性が示唆された。

OV-shp53 の細胞増殖能を検討した結果、mock に比して低下していた。PI 染色によるフローサイトメトリーの結果では細胞周期 G2/M 期の細胞が多くみられ、さらに p27<sup>kip1</sup> 発現が著明に増加し Cyclin B1 発現が減少していたことから、OV-shp53 は G2/M arrest が起きていることが示唆された。Cisplatin (CDDP) 処理後では、OV-shp53 は mock よりもアポトーシス小体が減少しており、アポトーシス関連マーカーである cleaved-caspase 3、bax、bcl-2 発現は著明に減少し、CDDP 耐性の傾向にあった。また OV-shp53 と移動能の関連では、Migration assay 及び Wound healing assay より OV-shp53 は有意に移動能が亢進していた。これらの結果から、p53 機能消失が生じることで細胞増殖能の低下、薬剤耐性能の獲得及び細胞移動能の亢進が示唆された。

### 3. 新規予後因子表現型腫瘍における主要因子の特定

予後不良表現型を有する OECa の特性を解明する上で、p53 発現抑制後の分子機構の主要となる因子を網羅的に検索するために次世代シーケンス法を用いた。mock 及び OV-shp53 より抽出した total RNA よりシーケンシングを行い、その発現パターンから OV-shp53 で過剰発現していた *Fibronectin1* (*FN1*) 遺伝子に着目した。OV-shp53 において、*FN1* mRNA 発現及び FN タンパク発現は著明に増加して

おり、Reporter assay では、p53 機能消失により *FN1* 遺伝子の promoter 活性が抑制されていなかった。さらに FN の機能解析を行うため、OVISE 細胞に FN 20  $\mu$ g/ml 処理をして検討を行った。FN 処理後の細胞形態及びアポトーシス関連の発現に変化が認められなかった一方で、細胞移動能は有意に亢進し、細胞増殖能は低下していた。これらの結果から、卵巣癌では p53 機能消失が生じると FN の転写抑制機能も劣り、FN の発現が亢進され、さらに FN は細胞移動能及び細胞増殖能に関連して細胞内機能の重要な因子である可能性が示唆された。

次に、臨床病理検体を用いて FN 及び p53 の免疫組織化学的検討を行った。FN は細胞質、p53 は核に発現し、FN 発現は HGSeCa より CCCa で有意に高く、p53 発現は HGSeCa で高かった。IPGs 間で FN×p53 IHC score の平均値を比較した結果、HNF-1 $\beta$ + / p53+ / ARID1A+ 表現型を示す VII 群で有意に発現が高かった。臨床病理学的因子と FN 発現の相関関係を検討した処、組織型 (FN high score : OCCa) ・腫瘍径 (FN high score :  $\geq 11.2$ cm) ・リンパ節転移の有無 (FN high score : Positive) と有意に関連していた。

Kaplan-Meier 生存曲線では CCCa 及び HGSeCa において FN 及び p53 の発現が高い群で OS・PFS 共に予後不良であった。FN 発現と p53 発現をそれぞれ組み合わせて予後解析を行なった結果、FN 高発現×p53 高発現の群が OS・PFS 共に予後不良であり、一方で両者共に低発現の群は最も予後良好であった。さらに、多変量解析を行うと FN 発現・FIGO stage・遠隔転移が独立した予後不良因子ということが分かった。

## 【考察】

OECa を組織型に依存せずタンパク発現のみで分類したことにより、HNF-1 $\beta$ + / p53+ / ARID1A+ 表現型腫瘍である VII 群が最も予後不良であることを示した。VII 群は他群と比較して有意に *TP53* 点突然変異が起きていることから、VII 群では変異型 p53 によりタンパク質発現が蓄積されていると考えられる。故に、本研究では予後不良表現型腫瘍の分子機構を解明する上で、p53 を中心としたシグナル伝達経路の変化が重要であると仮説を立て、内在性 HNF-1 $\beta$  及び ARID1A が発現、p53wt である OVISE 細胞で、shRNA ベクターを用いて p53 発現を抑制し、p53 機能消失を再現した。

その結果、細胞形態の変化、細胞増殖能の低下、薬剤耐性能の獲得、細胞移動能の亢進と腫瘍悪性化に繋がる現象を確認した。さらに、予後不良表現型腫瘍の特性を検

索するために行った次世代シーケンス解析の結果より、OV-shp53 で FN 発現が顕著に増加することを見出した。FN は細胞増殖能並びに細胞移動能に関与しており、また、FN 発現増加と p53 機能消失によるシグナルの変化は相互作用することで細胞移動能の亢進がさらに増強されていることが示唆された。

実際に、FN、p53 両者共に高発現であった患者は生存率が低く、再発頻度が高頻度であった。さらに、FN 高発現とリンパ節転移を有する症例は有意に相関していた。臨床検体の結果も考慮すると、予後不良表現型腫瘍の特性は、細胞形態の変化や FN 発現増加によって増強された細胞移動能が、転移や腫瘍進展に影響し、また、薬剤耐性能の獲得により再発につながると考えられ、卵巣癌における予後不良表現型腫瘍の分子機構の一部が解明された。

## 【結語】

卵巣癌における IPGs 分類は、予後判定の補助診断ツールとして極めて有用であることが示唆された。その中でも、HNF-1 $\beta$  + / p53+ / ARID1A+ の表現型を示す卵巣癌は予後不良であり、その背景の分子機構の 1 つに p53 / FN 系の改変が関与することが示唆された。

## 目次

1. 序論 .....	1
2. 材料・方法 .....	
2-1. 臨床材料 .....	2
2-2. 抗体及び試薬 .....	2
2-3. 免疫組織化学染色 .....	2
2-4. 階層的クラスター解析 .....	3
2-5. 遺伝子変異解析 .....	3
2-6. プラスミド作製と細胞株 .....	3
2-7. 遺伝子導入 .....	4
2-8. Reverse transcription (RT) -PCR .....	4
2-9. Western blotting .....	4
2-10. フローサイトメトリー .....	5
2-11. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 解析 .....	5
2-12. Apoptotic index .....	5
2-13. Wound healing assay .....	5
2-14. Migration assay .....	5
2-15. 次世代シーケンス解析 .....	5
2-16. 統計学的評価 .....	6
3. 結果 .....	
3-1. immunoprofile による新規予後因子の同定 .....	
3-1-1. 12種のマーカーを用いた免疫組織化学的検討 .....	7
3-1-2. IPGs と遺伝子変異の関連 .....	8
3-1-3. IPGs と予後の関連 .....	8
3-2. 同定した新規予後因子表現型腫瘍の特徴 .....	
3-2-1. 新規予後因子表現モデルの作製と細胞形態の変化 .....	9
3-2-2. 新規予後因子表現モデルの機能解析 .....	9
3-3. 新規予後因子表現型腫瘍における主要因子の特定 .....	



3-3-1. 次世代シーケンス法を用いた網羅的遺伝子発現解析 .....	10
3-3-2. FN の機能解析 .....	10
3-3-3. FN の臨床応用 .....	11
4. 考察 .....	12
5. 結論 .....	14
6. 引用文献 .....	15
謝辞 .....	19

## 図表

図 1. HE 及び 12 種のマーカーの典型的な染色パターン .....	20
図 2. タンパク発現による OECa の分類 .....	21
図 3. IPGs へ分類する Flowchart 及び遺伝子変異解析 .....	22
図 4. 進行期 OECa における Kaplan-Meier 生存曲線 .....	23
図 5. VII 群に属する症例における p53、HNF-1 $\beta$ 及び ARID1A の IHC 染色結果の一例 .....	24
図 6. 新規予後因子表現型モデルの作製 .....	25
図 7. OV-shp53 における細胞形態の変化 .....	26
図 8. OV-shp53 における細胞増殖能の検討 .....	27
図 9. OV-shp53 における薬剤耐性能の検討 .....	28
図 10. OV-shp53 における細胞移動能の検討 .....	29
図 11. 次世代シーケンス法を用いた網羅的解析 .....	30
図 12. OV-shp53 主要因子 FN の検討 .....	31
図 13. OWISE 細胞における FN 処理後の 細胞形態及び薬剤耐性能の変化 .....	32
図 14. OWISE 細胞における FN 処理後の	



	細胞移動能及び細胞増殖能の変化 .....	33
図 15.	FN の免疫組織化学的検討 .....	34
図 16.	発現レベルの差における Kaplan-Meier 生存曲線 .....	35
図 17.	HNF-1 $\beta$ + / p53+ / ARID1A+ 表現型腫瘍における 予後不良分子機構一部の模式図 .....	36
表 1.	IPGs における組織型割合 .....	37
表 2.	OECa 組織型別及び IPGs 別における遺伝子変異頻度 .....	38
表 3.	新規予後不良因子における単変量解析及び多変量解析 .....	39
表 4.	FN 及び p53 発現と臨床病理学的因子の関連性 .....	40
表 5.	FN 及び p53 を含めた単変量解析及び多変量解析 .....	41

# 1. 序論

上皮性卵巣癌 (ovarian epithelial carcinoma: OECa) は漿液癌 (serous carcinoma: SeCa)、類内膜癌 (endometrioid carcinoma: EmCa)、明細胞癌 (clear cell carcinoma: CCCa)、粘液癌 (mucinous carcinoma: MuCa) と 4 つの組織型に分類されており、日本における婦人科腫瘍の中でも死亡率が高く、最も予後不良な腫瘍である[1]。予後不良となる要因は、卵巣が腹腔内臓器ということもあり、腫瘍発生の初期段階で自覚症状が乏しく、発見時には既に進行していることがほとんどである。実際に、患者の 75%以上が腹腔内臓器への転移・播種が特徴である進行期と診断されている[1-4]。

OECa の標準的な治療は、外科的手術により可及的に腫瘍を取り除き、術後化学療法を行う。化学療法の感受性には組織型が大きく寄与するため、病理診断時の正確な組織型判定が求められるが、病理医間の組織型診断一致率は 56%~68% ( $\kappa$  値: 0.46~0.55) と再現性は半数であることが報告されており [5-7]、また一部の OECa では、複数の組織型の混在や特定の組織構造を示さない低分化癌の様相など多彩な組織像を呈する。一方で、免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry: IHC) による補助診断は病理診断の再現性を向上させることができ[8, 9]、p53、Hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  (HNF-1 $\beta$ )、Vimentin、Wilms tumor protein 1 (WT1)、p16、Ki-67 などの IHC マーカーは、OECa における夫々の組織型と関連することが報告されており[10]、実臨床において IHC マーカーの有用性が高いことが示されている。しかしながら、補助診断である IHC を用いても、タンパク発現のパターンが同一症例内で複数種類みられる場合があり、OECa の病理診断は難渋する。

この背景から、OECa を組織型に依存しない分類で確立するため、OECa と関連性の高い 12 種類の IHC マーカー (p53、HNF-1 $\beta$ 、AT-rich interactive domain-containing protein 1A (ARID1A)、estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ )、progesterone receptor (PR)、Vimentin、Phosphatase and tensin homolog (PTEN)、Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform (PIK3CA)、WT1、left-right determination factor (LEFTY)、 $\beta$ -catenin、Ki-67) の発現パターン[11-14]から、階層的クラスター解析を用いて OECa をタンパク発現プロファイルの観点から簡易的な分類システムを構築することを目的とした。さらに、この分類から予後予測を可能とするために予後不良表現型を特定し、予後不良となる詳細な分子機構を解明する。

## 2. 材料・方法

### 2-1. 臨床材料

2006 年から 2017 年までに北里大学病院にて外科的に切除された OECa 組織のホルマリン固定パラフィン切片 (FFPE) 材料病理検体 282 症例 (SeCa 82 症例 (内、高悪性度漿液癌 high-grade serous carcinoma (HGSeCa) 69 症例/低悪性度漿液癌 low-grade serous carcinoma (LGSeCa) 13 症例) /EmCa 47 症例/CCCa 85 症例/MuCa 41 症例/分類不能癌 high-grade carcinoma (HGCa) 27 症例) を用いて、患者記録より 2014 年 WHO 分類に沿って症例を選択した[15]。全ての患者は子宮摘出術の有無に関わらず、卵巣摘出術を行ったものである。術前に化学療法や他の術前治療を受けた患者はおらず、一方で、ほとんどの患者は術後に Paclitaxel/Carboplatin 療法 (TC 療法) を受けている。

この研究は北里大学医学部・病院倫理委員会によって承認されている (B16-10)。

### 2-2. 抗体及び試薬

抗 $\beta$ -catenin 抗体、抗 HNF-1 $\beta$ 抗体、抗 GSK-3 $\beta$ 抗体、抗 Rb 抗体、抗 p27<sup>kip1</sup> 抗体、抗 XIAP 抗体及び抗 bax 抗体は BD Biosciences (San Jose, CA, USA) 社製、抗 PIK3CA 抗体、抗 Snail 抗体、抗 Akt 抗体、抗 phospho (p) Akt Serine473 抗体、抗 p-GSK-3 $\beta$  Serine9 抗体、抗 pRb Serine807/811 抗体及び抗 cleaved caspase-3 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 社製、抗 ARID1A 抗体、抗 CyclinB1 抗体及び抗 MDM2 抗体は Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 社製、抗 WT1 抗体、抗 Vimentin 抗体、抗 p53 抗体、抗 Ki-67 抗体、抗 p21<sup>waf1</sup> 抗体、抗 CyclinD1 抗体及び抗 bcl-2 抗体は Dako (Copenhagen, Denmark) 社製、抗 ER $\alpha$  抗体、抗 PR 抗体及び抗 Cyclin A2 抗体は Novocastra (Newcastle, UK) 社製、抗 LEFTY 抗体及び抗 Fibronectin (FN) 抗体は Abcam (Cambridge, MA, USA) 社製、抗 $\beta$ -actin 抗体、抗 PTEN 抗体及び抗 E-cadherin 抗体はそれぞれ Sigma-Aldrich Chemicals (St Louis, MO, USA) 社製、Millipore (Temecula, CA, USA) 社製、Takara (Shiga, Japan) 社製を用いた。FN 及び Cisplatin (CDDP) は Sigma-Aldrich Chemicals (St Louis, MO, USA) 社製を用いた。

### 2-3. 免疫組織化学染色 (IHC)

IHC はマイクロウェーブ加温による賦活化とポリマー免疫複合法を組み合わせて行った。厚さ 4  $\mu$ m の FFPE 材料切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼを 0.3%過酸化水素水で 30 分間処理しブロックした。マイクロウェーブ加温は 10 mM citrate buffer (pH 6.0) または Tris buffer (pH 9.0) のいずれかで 5 分加熱を 3 cycle 行ったのち、ポリマー免疫複合法を用いて染色を実行した[16-18]。

評価方法は p53・HNF-1 $\beta$ ・ARID1A・ER $\alpha$ ・PR・WT1 は核、Vimentin・PTEN・PIK3CA・



LEFTY・FN は細胞質の免疫反応性から染色強度と陽性細胞率を検索した。染色強度は 4 段階に分類（0：陰性、1：弱陽性、2：陽性、3：強陽性）し、陽性細胞率は 5 段階に分類（0：陽性率 0%、1：陽性率 1%~10%、2：陽性率 11%~30%、3：陽性率 31%~50%、4：陽性率 51%以上）し、染色強度と陽性細胞率を乗じて IHC score として算出した。同一標本内で染色の強弱が異なる場合は、広範囲の染色性を採用した。また、FN×p53 score は 2 つのスコアの値を乗じて算出した。核陽性β-catenin（N-β-catenin）と Ki-67 は、ランダムに 5 視野を選択し、1 視野あたり少なくとも 1000 個の細胞をカウントした。そして、核陽性細胞数／1 視野細胞数（400 倍率）で算出し Labeling indices（LIs）とした[11, 19]。また、IHC マーカーの発現による予後的有意性を評価するため、IHC score または LIs は各 Score の平均値を cut off 値として 2 つのカテゴリー（high/low）に分けて検討を行った。

p53 に関して、2 種類の発現パターン（陽性細胞率 0%並びに 60-100%）の 94%が *TP53* 遺伝子変異と関連していたことから[20]、p53 発現が完全に陰性である症例は p53 High score グループ（IHC score=12）に分類した。

## 2-4. 階層的クラスター解析

R version 3.3.1 software（R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）より、最も頻用されている Ward 法を用いて解析した。各タンパクの発現レベルに基づいて赤、オレンジ、緑と色付けし、それぞれ high（IHC score or LIs > means + SDs）、neutral（means ± SDs）、low（< means - SDs）発現とした。

## 2-5. 遺伝子変異解析

OECa 55 症例（HGSeCa16 例／EmCa10 例／CCCa14 例／MuCa7 例／HGCa8 例）の FFPE 材料 10μm 切片を用いて、顕微鏡下において腫瘍細胞が豊富な領域を選び、間質細胞を避けて採取した。genome DNA は QIAamp DNA FFPE Tissue kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用いて抽出した。*CTNNB* 遺伝子の exon 3、*TP53* 遺伝子の exons 5-9、*K-ras* 遺伝子の exon 1、*PIK3CA* 遺伝子の exons 9 および 20 をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅した。続いて、BigDye terminator version 3.1 cycle sequencing 試薬（Applied Biosystems）を PCR 産物に添加し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）で解析した[11, 19, 21, 22]。

## 2-6. プラスミド作製と細胞株

p53-specific short hairpin RNA（shRNA）は、以前の記載通り設計した[11]。製造元の説明書に沿って、一本鎖 p53 オリゴヌクレオチドをアニーリングし、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ vector（Takara, Shiga, Japan）の BamH1-EcoRV サイトにクローニングした。p53

mutant (R248Q) は、pCMV-p53wt construct を用いた PCR ベースの方法で作製した。human Fibronectin 1 promoter (UCSC genome browser) における-2028 から-23 の間 (+1 は転写開始部位を表す) を PCR で増幅し、pGL3B vector (Promega, Madison, WI, USA) にクローニングした。pCMV-p53wt、pGL3B- (-1109/+ 36) Snail luc、pGL3B- (-899/+ 47) HNF-1 $\beta$  luc、及び pGL3B- (-140/+ 216) HNF-1 $\beta$  luc も既報通り使用した[16-18]。

CCCa 細胞株である OVISE、ES2、OVTOKO、TOV-21G は以前記載した通りで[18, 21, 23]、また HGSeCa 細胞株である OVSAHO、OVCAR-3 はそれぞれ the National Institute of Biomedical Innovation (Osaka, Japan) 及び American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から用いた。

p53-shRNA 細胞は野生型 p53 遺伝子をもち、内在性 HNF-1 $\beta$  及び ARID1A の発現をもつ OVISE 細胞を用いて樹立した (OV-shp53) [11, 23]。また紡錘形の細胞の定義において、以前記載したように[23]、狭く細長い形態を示し、細胞間接着が弱いもしくは接していないものとした。

## 2-7. 遺伝子導入

以前の記載通り、LipofectAMINE PLUS (*In vitro*gen, Carlsbad, CA, USA) で各種プラスミドを遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性の解析を行った[16-18]。

## 2-8. Reverse transcription (RT) -PCR

2 $\mu$ g の total RNA から cDNA を合成した。RT-PCR によって指数関数的に増幅され、特定のプライマーを用いて合成された cDNA を比較した。以前の記載通り、*HNF-1 $\beta$* , *Snail*, *GAPDH* 遺伝子のプライマーも適用した[16-18]。シグナル強度は、image J software version 1.41 (NIH, Bethesda, MD, USA) で解析した。

定量分析では、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて real-time RT-PCR を行った。蛍光シグナルは、ABI 7500 Real-time PCR System SDS Software (Applied Biosystems) を使用して検出した。

## 2-9. Western blotting

RIPA buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.2) , 1%Nonidet P-40, 0.5%デオキシコール酸ナトリウム, 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム]を用いて、細胞タンパク質の全量を分離した。タンパク質の一部を SDS-PAGE で分離し、メンブレンへ転写、一次抗体でプローブ、そして ECL 検出システム (Amersham Pharmacia Biotechnology, Tokyo, Japan) により目的タンパク質の検出を行った。



## 2-10. フローサイトメトリー

細胞周期の解析を行うため、細胞を 70%アルコールで固定させ、ヨウ化プロピジウム (PI) (Sigma) を用いて染色した。調製した細胞を BD FACS Calibur (BD Biosciences) 及び CellQuest Pro software version 3.3 (BD Bioscience) を用いて細胞の解析を行った。

## 2-11. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 解析

製造元の説明書に沿って、CDDP 処理後の生細胞数の定量を、Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Lab, Kumamoto, Japan) を用いて解析を行った。

## 2-12. Apoptotic index

Kerr らの基準に沿って[24]、アポトーシス小体は HE 染色切片より計測した。合計 10 視野をランダムに選択し、高倍率視野 (HPF) あたりのアポトーシス小体数を計測し、その平均値を Apoptotic index とした。

## 2-13. Wound healing assay

細胞を 24 ウェル組織培養プレートに播種し、ほぼ完全な集密に達するまで増殖させた。細胞単層が形成された後、200 $\mu$ l 滅菌チップで直線状に傷をつけてから 0 時間、6 時間後、9 時間後、12 時間後の創傷領域を Image J software version 1.41 (NIH) で計測した。細胞移動パラメーターは、創傷閉鎖としてピクセル単位で計算した。

## 2-14. Migration assay

孔径 8 $\mu$ m の 24-well Transwell chambers (Corning, NY, USA) を使用した。下部チャンバーは 10%血清を含む培地で満たし、細胞は無血清培地に懸濁して上部チャンバーに移した。24 時間後、ポリカーボネート膜底面のヘマトキシリン・エオジン (HE) で染色された細胞の数を、光学顕微鏡を用いてカウントした。

## 2-15. 次世代シーケンス解析

NucleoSpin RNA system (Takara) を用いて、OV-shp53 および mock 細胞から total RNA を抽出した。RNA の濃度と品質は、それぞれ Quantus Fluorometer (Promega) 及び Agilent 2100 Bioanalyzer で確認した。全てのサンプルで 9 を超える RIN 値を示した。total RNA (500ng) を Quant Seq 3' mRNA-seq library preparation kit FWD (Lexogen, Vienna, Austria) を用いて、12 サイクル PCR 増幅し、RNA ライブラリーを作製した。ライブラリーのシーケンシング (75-bp single-end) は NextSeq500 system (Illumina) で行い、全てのデータ分析は Stand NGS (v3.2, Agilent Technologies) を使用した。アダプター配列は未

加工のリードから削除し、塩基のトリミングは各リードの 3'末端から実行され、品質 Q10 未満かつ最小長さが 25 bp までの塩基は削除した。各読み取りは、参照ヒトゲノム配列 hg38 に照会した。転写物の発現パターンは、既知設定を使用して DESeq [25] の正規化後に比較した。

## 2-16. 統計学的評価

連続変数は Mann-Whitney U 検定を使用し、臨床病理学的因子の比較は  $\chi^2$  検定を利用した。生存解析は Kaplan-Meier 法を用いて行い、統計的比較は log rank 検定を使用した。全生存期間 (Overall survival : OS) は手術日から死亡までの時間もしくは最終診察日とし、無増悪生存期間 (Progression-free survival : PFS) は手術日から再発や腫瘍増悪ないし死亡、もしくは最終診察日までとした。

単変量解析及び多変量解析は Cox 比例ハザード回帰分析を用い、目的変量を再発、死亡もしくは最終診察日までの期間とし、説明変量として組織型、年齢、FIGO stage、腫瘍径、リンパ節転移、遠隔転移及び術後残存腫瘍の有無の臨床病理学的因子の他に、HNF-1 $\beta$ /p53/ARID1A、p53、Fibronectin を加えた。

いずれの検定においても、統計学的有意性の基準は p 値 < 0.05 と設定した。以上の統計解析は、Stat View (version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて実施した。

### 3. 結果

#### 3-1. immunoprofile による新規予後因子の同定

##### 3-1-1. 12 種のマーカーを用いた免疫組織化学的検討

OECa の FFPE 検体 282 症例において、日常病理診断で用いられている、もしくは卵巣癌において有用性が高いとされている 12 種のマーカー (p53、HNF-1 $\beta$ 、ARID1A、ER $\alpha$ 、PR、Vimentin、PTEN、PIK3CA、WT1、LEFTY、 $\beta$ -catenin、Ki67) を用いて免疫組織化学的検討を行った。代表的な染色所見を図 1 に示す。各組織型のタンパク発現の特徴として、HGSeCa 及び LGSeCa では p53、WT1 が発現しており、EmCa では N- $\beta$ -catenin、ER $\alpha$ 、PR、Vimentin が他の組織型と比較して発現が高かった。CCCa では HNF-1 $\beta$  及び LEFTY の発現が高く、対照的に ARID1A、ER $\alpha$ 、PR は著しく低下していた。MuCa では、p53 及び HNF-1 $\beta$  が比較的高く、PTEN の発現は低下していた。また、PIK3CA 及び Ki-67 は OECa 間での特徴的な差はみられなかった。

OECa のタンパク表現型のみで分類が可能であるか示すため、各標本の IHC score を基に階層的クラスター解析を行った。この解析により OECa は 7 つのグループに分類され、Immunoprofile groups (IPGs) とした (図 2A)。各群における HGSeCa、LGSeCa、EmCa、CCCa、MuCa、HGCa の分布を表 1 に示した。I 群及び III 群の構成は HGSeCa 主体であり、V 群及び VI 群では CCCa 主体、IV 群は EmCa 主体、VII 群は MuCa 主体で構成されていた。また、II 群は比較的混在しており、HGSeCa、EmCa、MuCa が同等の割合で構成されていた。

IPGs 間で各マーカーの IHC score を比較した結果、特に明確な差であった HNF-1 $\beta$  では V 群～VII 群で有意に発現が高く、I 群～IV 群は低発現の群であった。さらに前者において、V 群は ARID1A 発現が低く、VI 群及び VII 群は ARID1A 発現が高い一方で、p53 発現に差がみられた。後者では、p53 発現並びに WT1 発現に差がみられた (図 2B)。これらの所見から、OECa を分類するにあたって最も相関性の高い 4 IHC マーカー「HNF-1 $\beta$ 」「p53」「ARID1A」「WT1」を用いたフローチャートを考案した (図 3A)。

I 群 : HNF-1 $\beta$ －／p53－／WT1＋

II 群 : HNF-1 $\beta$ －／p53＋／WT1－

III 群 : HNF-1 $\beta$ －／p53＋／WT1＋

IV 群 : HNF-1 $\beta$ －／p53－／WT1－

V 群 : HNF-1 $\beta$ ＋／ARID1A－

VI 群 : HNF-1 $\beta$ ＋／ARID1A＋／p53－

VII 群 : HNF-1 $\beta$ ＋／ARID1A＋／p53＋

「＋」は高発現、「－」は低発現および発現無しとする。



### 3-1-2. IPGs と遺伝子変異の関連

IPGs と遺伝子変異状態の関連を調べるため、各群からランダムに選択した OECa 55 症例を、*TP53*、*CTNNB*、*PIK3CA*、*K-ras* 遺伝子の点突然変異を解析した。*CTNNB*、*TP53*、*PIK3CA* において、点突然変異の有無と IHC score の相関性について検討した結果、*PIK3CA* では有意な差は得られなかったが、*CTNNB* 及び *TP53* は点突然変異と IHC score は正の相関 ( $p<0.0001$ ) が認められた (図 3B)。また、IPGs 別で点突然変異頻度を比較したところ、*CTNNB* 遺伝子では IV 群 (7.3%) で高頻度に変異が起きており、*TP53* 遺伝子では II 群 (9.1%)、III 群 (5.5%) 及び VII 群 (9.1%) で変異が多く、*PIK3CA* 遺伝子は V 群 (9.1%) で高率に変異が検出された。一方で、*K-ras* 遺伝子は IPGs 間の関連は認められなかった。(表 2)

### 3-1-3. IPGs と予後の関連

考案した IPGs は予後予測に有用であるか検討するため、Kaplan-Meier 生存曲線より、OS 及び PFS を解析した。OECa 組織型別に比較したところ、MuCa の患者は他の OECa 組織型の診断を受けた患者と比較して、OS、PFS 共に最も予後不良であった (図 4A)。続いて IPGs 別で比較したところ、進行期 (FIGO stage II-IV 期) において、MuCa (57.7%)、HGSeCa (23.1%)、CCCa (19.2%) で構成される VII 群の患者は、他の群の患者と比較して OS 及び PFS において有意に予後不良であった (図 4B)。また、VII 群の組織型構成のほとんどが MuCa 症例であったことから、VII 群をさらに MuCa を除いた群 (non-MuCa) として他群と比較検討を行った (図 4C)。その結果、HGSeCa 6 例及び CCCa 4 例で構成された VII 群 : non-MuCa は OS 及び PFS は予後不良であり、組織型の構成関係なく HNF-1 $\beta$ + / p53+ / ARID1A+ 表現型を示す症例は最も予後不良であることが示唆された (図 5)。

また単変量解析を行うと、FIGO stage、リンパ節転移、遠隔転移並びに HNF-1 $\beta$ + / p53+ / ARID1A+ 表現型腫瘍は進行期 OECa において OS 及び PFS 共に重要な予後因子であることが示された (表 3)。さらに、多変量解析においても、FIGO stage、遠隔転移並びに HNF-1 $\beta$ + / p53+ / ARID1A+ 表現型腫瘍は OS 及び PFS 共に有意かつ独立した予後不良因子であることが明らかとなった。

以上の結果から、OECa を日常病理診断時で使用している 4 マーカー (HNF-1 $\beta$  / p53 / ARID1A / WT1) のみで 7 つの群に分類が可能であり、特に VII 群 : HNF-1 $\beta$  + / p53+ / ARID1A+ を示す腫瘍は予後不良であることが明らかとなった。また、考案した IPGs は遺伝子変異と相関し、高精度な分類法であることが示唆された。

## 3-2. 同定した新規予後因子表現型腫瘍の特徴

### 3-2-1. 新規予後因子表現モデルの作製と細胞形態の変化

HNF-1 $\beta$ +／p53+／ARID1A+表現型腫瘍の分子機構を解明するため、内在性 HNF-1 $\beta$ 及び ARID1A が発現し、p53wt である OVISE (OV) 細胞を用いて (図 6A)、shRNA ベクターにより p53 発現を抑制した細胞株 (OV-shp53) を作製した (OV-shp53#2, OV-shp53#8)。OV-shp53 は、HNF-1 $\beta$ 及び ARID1A の発現が増加し、p53 標的遺伝子である MDM2 や p21<sup>waf1</sup> の発現は減少していた (図 6B)。

OV-shp53 の細胞形態は mock と比較して、線維芽細胞様形態を示す細胞が著しく増加していた (図 7A)。Western blotting よりタンパク発現の変化を確認したところ、上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition : EMT) マーカーである Snail 発現が増加し、上皮マーカーの E-cadherin 発現は減少していた。また、p53/Snail 系に関連している p-Akt 及び p-GSK-3 $\beta$ 発現の増加も認められた (図 7B)。一方で、*Snail*mRNA 発現は、OV-shp53 で若干増加していたものの有意な差ではなかった (図 7C)。さらに Reporter assay により、p53 wild type (p53wt) 及び p53 mutant (R248Q) (p53mt) を CCCa 細胞 TOV21G に遺伝子導入し *Snail* 遺伝子の promoter 活性を検索した。p53wt では p53 濃度依存的に *Snail* 遺伝子の転写活性が抑制されていたが、p53mt では転写活性が抑制されていなかった (図 7D)。この結果から、p53 機能消失により起こる影響として *Snail* 遺伝子の promoter 活性を抑制する機能が低下し、Snail 発現が亢進し EMT が誘導されることが示唆された。

### 3-2-2. 新規予後因子表現モデルの機能解析

p53 発現抑制後の変化を検討するため、細胞増殖能、薬剤耐性能、細胞移動能について解析を行った。まず、OV-shp53 における細胞増殖能について解析した。mock 及び OV-shp53 を低密度で同量に播き (P0)、3 日後 (P3)、6 日後 (P6)、8 日後 (P8) と細胞数を計測した。その結果、mock と比較して OV-shp53 では有意に細胞増殖能が低下していた (図 8A)。さらに、細胞周期関連のタンパク発現の変化を検討するため、mock 及び OV-shp53 を血清飢餓状態にし、その後血清刺激から 6 時間後、12 時間後、24 時間後の発現の変化を Western blotting で確認した。その結果、mock と比較して OV-shp53 では p27<sup>kip1</sup> 発現が著明に増加しており、一方で Cyclin B1 発現が低下していた (図 8B)。細胞周期解析として PI 染色による Flow cytometry を行ったところ、細胞周期 G2/M 期の細胞量が OV-shp53 で増加しており、G2/M arrest の状態が起きていることが明らかとなった (図 8C)。

次に、卵巣癌の治療薬である CDDP を用いて薬剤耐性能について解析した。mock 及び OV-shp53 を同量に撒き、10  $\mu$  M CDDP 処理後に HE 染色をし、アポトーシス小体の数を計測した。その結果、mock では CDDP 処理後にアポトーシス小体の数が有意に増加していた一方で、OV-shp53 では CDDP 未処理 (0  $\mu$  M) との差はみられなかった (図 9A)。また、



mock 及び OV-shp53 に 10  $\mu$  M CDDP を 24 時間、48 時間処理をし、トリパンブルー染色で死細胞の数を計測した。mock では時間経過依存的に死細胞であるトリパンブルー陽性細胞が増加しており、対して OV-shp53 では mock 程の著しい増加はみられなかった (図 9B : 上部)。さらに、CCK-8 解析を用いて CDDP 処理後の細胞生存率を計測した結果、OV-shp53 は CDDP 処理 24 時間後において mock と比較して 20% 近く細胞生存率に差があり、薬剤耐性の傾向にあることが示された (図 9B : 下部)。CDDP 処理後においてアポトーシス関連のタンパク発現を Western blotting で確認したところ、アポトーシス化の指標である cleaved caspase 3 やアポトーシス誘導体である bax の低下、並びに p-Akt の増加が認められた (図 9C)。

次に、OV-shp53 における細胞移動能について解析した。Migration assay より、mock と比較して OV-shp53 では孔を通過する細胞数が有意に増加していた (図 10A)。また Wound healing assay では、mock と比較して、12 時間後には有意に傷の幅が狭まっており、OV-shp53 は細胞移動能が亢進していることが分かった (図 10B)。これらの結果から p53 機能消失が生じることで、G2/M arrest の状態による細胞増殖能の低下、薬剤耐性能の獲得及び細胞移動能の亢進が示唆された。

### 3-3. 新規予後因子表現型腫瘍における主要因子の特定

#### 3-3-1. 次世代シーケンス法を用いた網羅的遺伝子発現解析

予後不良表現型を有する OECa の特性を解明する上で、p53 発現抑制後の分子機構の主要となる因子を網羅的に検索するため、mock 及び OV-shp53 より抽出した total RNA を用いて次世代シーケンス解析を行った。mock と比較して、5-fold 以上の差があった遺伝子は 140 であった (発現亢進 : 57、発現抑制 : 83)。140 遺伝子の階層的クラスター解析を行った結果では 11 グループに分類され、この内の OV-shp53 で過剰発現している IX 群の *Fibronectin1* (*FN1*) 遺伝子に着目した (図 11)。Western blotting で確認した結果、OV-shp53 において FN タンパク発現は著明に増加しており (図 12A)、*FN1* mRNA 発現もまた増加していた (図 12B)。また p53wt 及び p53mt を TOV21G 細胞に遺伝子導入し *FN1* 遺伝子の promoter 活性を検索したところ、p53wt では p53 濃度依存的に *FN1* 遺伝子の転写活性が抑制されていたが、p53mt では転写活性が抑制されていなかった (図 12C)。

#### 3-3-2. FN の機能解析

OECa における FN の機能を検討するため、OVISE 細胞の FN 20  $\mu$ g/ml 処理後の変化を調査した。FN 処理後の細胞形態 (図 13A) 及び EMT 関連マーカー (図 13B)、並びにアポトーシス関連マーカーに変化は認められなかった (図 13C)。一方で、Migration assay では、FN 未処理 (FN 0  $\mu$ g/ml) と比較して FN 20  $\mu$ g/ml 処理細胞では孔を通過する細胞数が有意

に増加しており（図 14A）、Wound healing assay においても、FN 20 $\mu$ g/ml 処理細胞では 12 時間後には有意に創傷領域が狭まっていた（図 14B）。また、細胞増殖能においても、FN 20 $\mu$ g/ml 処理した細胞で低下傾向であった。（図 14C）。これらの結果から、卵巣癌では p53 機能消失が生じると FN の転写抑制機能が劣ることにより、FN の発現が亢進し、さらに FN を起因として細胞移動能及び細胞増殖能へ影響を及ぼす可能性が示唆された。

### 3-3-3. FN の臨床応用

臨床病理検体を用いて FN 及び p53 の免疫組織化学的検討を行った。FN は細胞質、p53 は核に発現していた（図 15A）。IPGs 間で FN score と p53 score を乗じた値（FN $\times$ p53 score）の平均値を比較した結果、HNF-1 $\beta$  + / p53 + / ARID1A + 表現型を示す VII 群で有意に発現が高かった（図 15B）。また、臨床病理学的因子と FN 発現の相関関係を検討したところ、組織型（FN high score : CCCa）、腫瘍径（FN high score :  $\geq 11.2$ cm）、リンパ節転移の有無（FN high score : Positive）と有意に関連していた（表 4）。

また、CCCa 及び HGSeCa において Kaplan-Meier 生存曲線で検討した結果、FN 並びに p53 の発現が高い群で OS 及び PFS 共に予後不良であった（図 16A,B）。さらに、FN 発現並びに p53 発現をそれぞれ組み合わせて予後解析をした結果、FN 高発現  $\times$  p53 高発現の群が OS 及び PFS 共に予後不良であり、一方で両者共に低発現の群は最も予後良好であった（図 16C）。

さらに加えて、CCCa 及び HGSeCa において単変量解析を行ったところ、組織型、FIGO stage、リンパ節転移、遠隔転移、残存腫瘍の有無並びに FN 発現、p53 発現で OS 及び PFS 共に重要な予後因子であることが示され、多変量解析では FN は独立した予後不良因子ということが明らかとなった（表 5）。

## 4. 考察

本研究では、OECa と関連がある 12 種類の IHC マーカーを用いて、組織型に依存せずタンパク発現のみで OECa を分類したことにより予後予測に役立つことを実証した。また、各 IPGs の immunophenotype は *TP53* 遺伝子、*CTNNB* 遺伝子、*PIK3CA* 遺伝子の点突然変異と関連していることが示された。しかしながら、12 種類の IHC マーカーの中でも抗体によっては多量に利用することができず、全てを実臨床の検査へ導入することは非現実的である。将来的に日常病理診断で利用する事を視野に入れると、本研究で明らかとなった最も有用性の高い 4 つの IHC マーカー (HNF-1 $\beta$ 、p53、ARID1A、WT1) のみで OECa 症例を IPGs へ分類する簡易的なシステムを開発することが可能となった。

IPGs の I 群及び III 群の組織型構成は HGSeCa が主体という面から、病理組織学的表現型では類似しているが、一方で p53 発現が 2 群間で有意に異なることを示した。同様の所見が IPGs の V 群及び VI 群へ分類された CCCa の ARID1A 発現でも認められた。EmCa 及び MuCa に関しては、それぞれ主に IV 群及び VII 群に分類されたことから、HGSeCa 並びに CCCa は、EmCa、MuCa と比較して複数の表現型を持つ可能性が示唆された。

本研究で重要な点の 1 つとして、進行期 OECa において HGSeCa、CCCa、MuCa で構成されている VII 群の患者は他群の患者と比較して OS 及び PFS 共に有意に予後不良であった。さらに VII 群の non-MuCa (HGSeCa、CCCa) の症例は、III 群の HGSeCa や V 群及び VI 群の CCCa 症例と比較して予後不良であった。このことから、HNF-1 $\beta$  +/p53+/ARID1A+表現型を示す VII 群において、HGSeCa 及び CCCa の生物学的性格は MuCa に類似していると考えられ、化学療法耐性が増している可能性があることを示している。

また、VII 群は他群と比較して有意に *TP53* 点突然変異が起きていることから、VII 群では変異型 p53 によりタンパク質発現が蓄積されていると考えられる。変異型 p53 に関して、p53 機能獲得についての研究が多く報告されている[26, 27]。p53 機能獲得の研究のほとんどは *in vitro* であり、*in vivo* の報告では変異型 p53 の主な作用は p53 機能消失と示されている[28-31]。故に、本研究では予後不良表現型腫瘍の分子機構を解明する上で、p53 を中心としたシグナル伝達経路の変化が重要であると仮説を立て、内在性 HNF-1 $\beta$ 及び ARID1A が発現し p53wt である OVICE 細胞で、shRNA ベクターを用いて p53 発現を抑制することにより p53 機能消失を再現した。

p53 発現を抑制したことにより、細胞形態に劇的な変化がみられ線維芽細胞様形態を呈していた。この変化には、E-cadherin 抑制因子である Snail、p-Akt、p-GSK-3 $\beta$ の発現増加並びに E-cadherin 発現の減少が伴っていた。*Snail* 遺伝子の promoter 活性は p53wt によって抑制されていたが、*Snail*mRNA 発現の増加は認められなかった。一般的に、Snail は GSK-3 $\beta$ の活性によって抑制されているとされ[32]、GSK-3 $\beta$ の活性は p-Akt によって抑制される[33]。また、p53 と Akt のネットワークは相反しているという報告を考慮すると[34-36]、p53



機能消失は Akt/GSK-3 $\beta$  axis を介して Snail の翻訳後制御に関連して EMT を誘導することが示唆された。加えて、p53wt は MDM2 を介して Snail を分解するという報告もあり [37]、本研究でも OV-shp53 において MDM2 の発現が低下していたことから Snail の発現が亢進したと考えられる。

OV-shp53 では p27<sup>kip1</sup> の増加及び Cyclin B1 の低下が認められ、G2/M arrest が増し、細胞増殖能の低下、移動能の亢進、薬剤耐性能の獲得の所見がみられたことから、これまでに報告されてきた研究と矛盾しない結果である。p27<sup>kip1</sup> は KIP/CIP ファミリーの 1 つであり、細胞周期を抑制する機能を担っており [38]、放射線照射後に応答して G2/M チェックポイントを活性化させる重要な因子であると報告されている [39]。Cyclin B1 は通常 S 期後半に合成され G2/M 期に活性化し、G1 期には分解される [40]。このことから、p27<sup>kip1</sup> 発現の増加、Cyclin B1 発現の低下が G2/M arrest 状態の指標であると考えられる。さらに、造血細胞における報告では、p53wt では細胞周期 G1 期及び G2 期で停止していたが、p53null あるいは、p53mt かつ p53 過剰発現している場合であると G2 期のみで停止していた [41]。別の報告では、p53 機能消失させた正常なヒト線維芽細胞において、パクリタキセル処理後の G2/M arrest の増加と p53 発現低下の相関が認められている [42]。細胞増殖能と細胞移動能の関係性の報告として、腫瘍中心部の細胞と比較して、腫瘍辺縁部の移動性の高い細胞では増殖能は低く、増殖能と移動能は相反するということが示されている [43-45]。加えて、OV-shp53 では CDDP 処理後のアポトーシス誘導が有意に抑制されており、これは p53 によって誘導される bax の低下、並びにアポトーシス誘導因子である bad や caspase-9 を阻害する p-Akt の増加によりアポトーシスが抑制される報告と一致している [46-48]。

本研究でもう 1 つの重要な点は、予後不良表現型腫瘍の特性を検索するために行った次世代シーケンス解析の結果より、OV-shp53 で FN 発現が顕著に増加しており、一方で、FN1 遺伝子の promoter 活性は p53wt によって抑制されていた。さらに、CCCa 細胞を FN 処理した結果、細胞移動能が増し、細胞増殖能が低下していた。対して、細胞形態や EMT 関連分子の発現、薬剤耐性能について FN による影響は認められなかったことから、p53 機能消失による FN 発現の増加は、細胞移動能の増強に密接に関連し、EMT 誘導や抗アポトーシスの関連がないことが示唆された。また、これまで実証した p53 機能消失によるシグナルの変化と FN 発現の増加は相互作用することで細胞移動能の亢進がさらに増強されていることが示唆された (図 17)。実際に、FN、p53 両者共に高発現であった患者は生存率が低く、再発頻度が高頻度であった。さらに、FN 高発現とリンパ節転移を有する症例は有意に相関していた。臨床検体の検討結果も考慮すると、予後不良表現型腫瘍の特性は、細胞形態の変化や FN 発現の増加によって増強された細胞移動能が、転移や腫瘍進展に影響し、また、薬剤耐性能の獲得により再発につながると考えられる。本研究の結果より、卵巣癌における予後不良表現型腫瘍の分子機構の一部が解明された。

## 5. 結論

卵巣癌における IPGs 分類は、予後判定の補助診断ツールとして極めて有用であることが示唆された。その中でも、HNF-1 $\beta$ +／p53+／ARID1A+の表現型を示す卵巣癌は予後不良であり、その背景の分子機構の 1 つに p53／FN 系の改変が関与することが示唆された。



## 6. 参考文献

- [1] Ushijima K. Current status of gynecologic cancer in Japan. *J Gynecol Oncol* 2009;20:67-71.
- [2] Salani R, Backes FJ, FungMF, Holschneider CH, Bristow LP, Goff BA. Posttreatment surveillance and diagnosis of recurrence in women with gynecologic malignancies: Society of Gynecologic Oncologists recommendations. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:466-78.
- [3] Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med* 2008; 5:e232.
- [4] Kobel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD, et al. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29:203-11.
- [5] Cramer SF, Roth LM, Ulbright TM, Mazur MT, Nunez CA, Gersell DJ et al. Evaluation of the reproducibility of theWorld Health Organization classification of common ovarian cancers. With emphasis on methodology. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:819-29.
- [6] Hernandez E, Bhagavan BS, Parmley TH, Rosenshein NB. Interobserver variability in the interpretation of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1984;17:117-23.
- [7] Lund B, Thomsen HK, Olsen J. Reproducibility of histopathological evaluation in epithelial ovarian carcinomas. Clinical implication. *APMIS* 1991;99:353-8.
- [8] Kobel M, Bak J, Bertelsen BI, Carpen O, Grove A, Hansen ES et al. Ovarian carcinoma histotype determination is highly reproducible, and is improved through the use of immunohistochemistry. *Histopathology* 2014;64:1004-13.
- [9] Kobel M, Kalloger SE, Carrick J, Huntsman D, Asad H, Oliva E, et al. A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *Am J Surg Pathol* 2009;33:14-21.
- [10]Kobel M, Kalloger SE, Baker PM, Ewanowich CA, Arseneau J, Zhrebetskiy V, et al. Diagnosis of ovarian carcinoma cell type is highly reproducible: a transcanadian study. *Am J Surg Pathol* 2010;34:984-93.
- [11]Akiya M, Yamazaki M, Matsumoto T, Kawashima Y, Oguri Y, Saegusa M, et al. Identification of LEFTY as a molecular marker for ovarian clear cell carcinoma. *Oncotarget* 2017;8: 63646-64.
- [12]Goff BA, Ries JA, Els LP, Coltrera MD, Grown AM. Immunophenotype of ovarian

- cancer as predictor of clinical outcome: evaluation at primary surgery and second-look procedure. *Gynecol Oncol* 1998;70:378-85.
- [13] Kallonger SE, Kobel M, Leung S, Mehl E, Gao D, Marcon KM, et al. Calculator for ovarian carcinoma subtype prediction. *Mod Pathol* 2011;24:512-21.
- [14] Kspar HG, Crum CP. The utility of immunohistochemistry in the differential diagnosis of gynecologic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2015;139:39-54.
- [15] Longacre TA, Wells M, Bell DA, Malpica A, Prat J, Ronnet BM. Tumours of the tumours of the ovary. In: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Lyon: IARC 2014;11-86.
- [16] Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Hamano M, Okayasu I.  $\beta$ -catenin simultaneously indices activation of the p53-p21WAF1 pathway and overexpression of cyclin D1 during squamous differentiation of endometrial carcinoma cells. *Am J Pathol* 2004;164:1739-49.
- [17] Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Hamano M, Okayasu I. Crosstalk between NF- $\kappa$ B/p65 and  $\beta$ -catenin/TCF4/p300 signalling pathways through alterations in GSK-3 $\beta$  expression during trans-differentiation of endometrial carcinoma cells. *J Pathol* 2007;213:35-45.
- [18] Suzuki E, Kajita S, Takahashi H, Matsumoto T, Tsuruta T, Saegusa M. Transcriptional upregulation of HNF-1  $\beta$  by NF- $\kappa$ B in ovarian clear cell carcinoma modulates susceptibility to apoptosis through alteration in bcl-2 expression. *Lab Invest* 2015;95:962-72.
- [19] Fei W, Kijima D, Hashimoto M, Hashimura M, Oguri Y, Saegusa M, et al. Afunctional role of LEFTY during progesterone therapy for endometrial carcinoma. *Cell Commun Signal* 2017;15:56.
- [20] Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih le M, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinomas: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol* 2011;24:1248-53.
- [21] Matsumoto T, Yamazaki M, Takahashi H, Kajita S, Suzuki E, Saegusa M, et al. Distinct  $\beta$ -catenin and PIK3CA mutation profiles in endometriosis-associated ovarian endometrioid and clear cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2015;144:452-63.
- [22] Yamashita K, Yoshida T, Shinoda H, Okayasu I. Novel method for simultaneous analysis of p53 and K-ras mutations and p53 protein expression in single histologic

- sections. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:347-52.
- [23] Matsumoto T, Yokoi A, Hashimura M, Oguri Y, Akiya M, Saegusa M. TGF- $\beta$ - mediated LEFTY / Akt / GSK-3 $\beta$  / snail axis modulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in ovarian clear cell carcinomas. *Mol Carcinog* 2018;57:957-67.
- [24] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-26.
- [25] Aders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 2010;11:R106.
- [26] Stein Y, Rotter V, Aloni-Grinstein R. Gain-of-Function Mutant p53: All the Roads Lead to Tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2019; 20 (24) :6197.
- [27] Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J Mol Biol* 2017; 429 (11) :1595-1606.
- [28] Jiang D, Dumur CI, Massey HD, Ramakrishnan V, Subler MA, Windle JJ. Comparison of effect of p53 null and gain-of-function mutations on salivary tumors in MMTV-Hras transgenic mice. *PLoS One* 2015;10:e0118029.
- [29] Jackson EL, Olive KP, Tuveson DA, Bronson R, Crowley D, Brown M, et al. The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:10280-8.
- [30] Wijnhoven SW, Zwart E, Speksnijder EN, Beems RB, Olive KP, Tuveson DA, et al. Mice expressing a mammary gland-specific R270H mutation in the p53 tumor suppressor gene mimic human breast cancer development. *Cancer Res* 2005;65:8166-73.
- [31] Liu G, McDonnell TJ, Montes de Oca Luna R, Kapoor M, Mims B, El-Naggar AK, et al. High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4174-9.
- [32] Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, et al. Dual regulation of snail by GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation in control of epithelial mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004;6:931-40.
- [33] Lin JX, Xie XS, Weng XF, Qiu SL, Xie JW, Wang JB, et al. Overexpression of IC53d promotes the proliferation of gastric cancer cells by activating the AKT / GSK-3 $\beta$  / cyclin D1 signaling pathway. *Oncol Rep* 2019;41:2739-52.
- [34] Wee KB, Aguda BD. Akt versus p53 in a network of oncogenes and tumor suppressor genes regulating cell survival and death. *Biophys J* 2006;91:857-65.

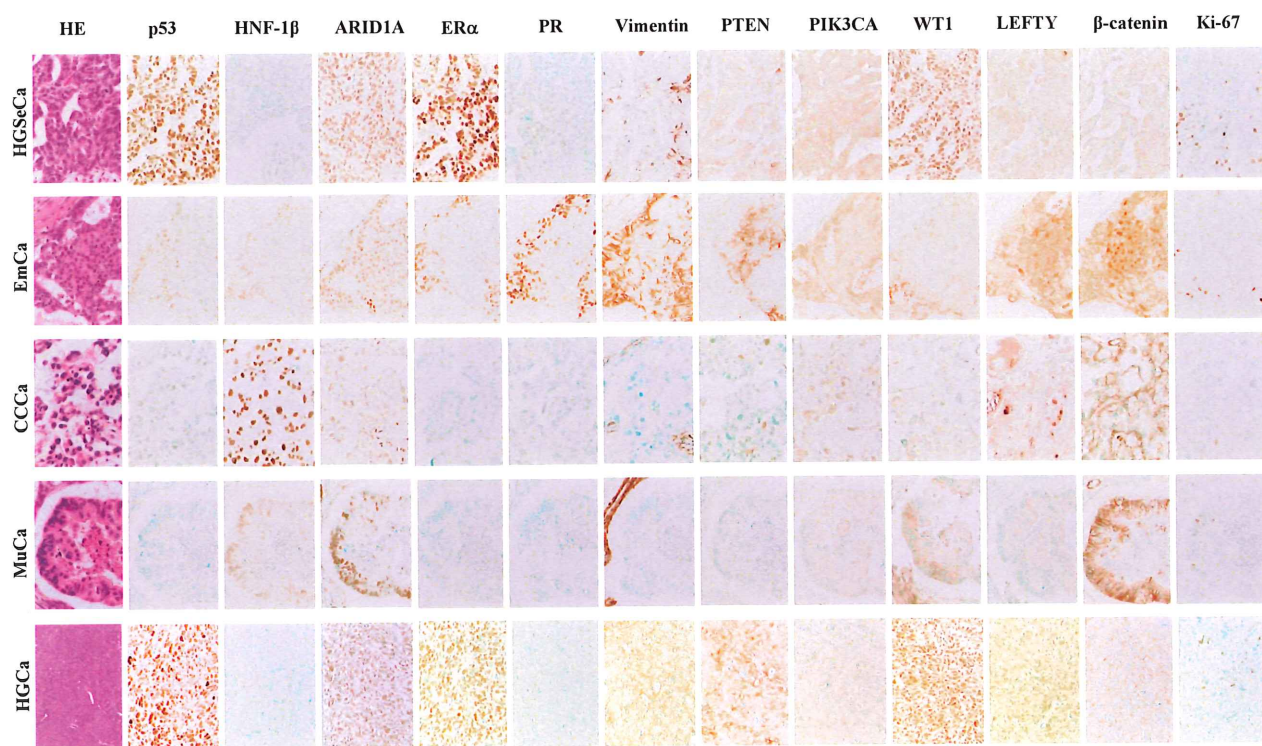


- [35]Wee KB, Surana U, Aguda BD. Oscillations of the p53-Akt network: implications on cell survival and death. PLoS One 2009;4:e4407.
- [36]Gottlieb TM, Leal JFM, Seger R, Taya Y, Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. Oncogene 2002;21:1299–303.
- [37]Lim S-O, Kim H, Jung G. p53 inhibits tumor cell invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma. FEBS Lett 2010;584:2231–6.
- [38]Bencivenga D, Caldarelli I, Stampone E, Mancini FP, Balestrieri ML, Ragione FD, et al., p27 Kip1 and human cancers: A reappraisal of a still enigmatic protein. Cancer Lett 2017;403:354-365.
- [39]Payne SR, Zhang S, Tsuchiya K, Moser R, Gurley KE, Longton G, et al. p27kip1 deficiency impairs G2/M arrest in response to DNA damage leading to an increase in genetic instability. Mol Cell Biol 2008;28:258–68.
- [40]Nakayama Y, Yamaguchi N. Role of cyclin B1 levels in DNA damage and DNA damage-induced senescence. Int Rev Cell Mol Biol 2013;305:303-37.
- [41]Kastan MB, Onvekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 1991;51:6304-11.
- [42]Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FYF, Foster SA, Demers GW, et al. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. Nat Med 1996;2:72–9.
- [43]Giese A, Loo MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME. Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. Int J Cancer 1996;67:275–82.
- [44]Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant glioma and implications for treatment. J Clin Oncol 2003;21:1624–36.
- [45]Merzak A, McCrea S, Koocheckpour S, Pilkington GJ. Control of human glioma cell growth, migration and invasion *in vitro* by transforming growth factor beta 1. Br J Cancer 1994;70:199–203.
- [46]Pawloaski J, Kraft AS. Bax-induced apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:529–31.
- [47]Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. J Cell Biol 2000; 151: 483–494
- [48]Wu W, Lee WL, Wu YY, et al. Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. J Biol Chem 2000; 275:40113–40119



## 謝辞

稿を終えるにあたり、北里大学大学院医療系研究科分子病理学研究室の三枝 信 教授には本研究を遂行するにあたり熱心なご指導を賜りました。ここに、深謝の意を表します。また、実験の技術に関して、直接ご指導ご助言を戴きました 松本俊英 講師、橋村美紀 技術員、小栗康子 技術員、並びに同研究室の皆様に深謝致します。



**図 1： HE 及び 12 種の IHC マーカの典型的な染色パターン**

OECa 組織型（HGSeCa, EmCa, CCCa, MuCa, HGCa）における HE 染色及び 12 種の IHC マーカ（ p53, HNF-1β, ARID1A, ERα, PR , Vimentin, PTEN, PIK3CA, LEFTY, β-catenin, Ki-67）による免疫組織化学染色。（×400）

発現局在はそれぞれ p53, HNF-1β, ARID1A, ERα, PR, WT1, Ki-67 は核局在、Vimentin は細胞膜局在、PTEN, PIK3CA は細胞質局在、LEFTY は核及び細胞質局在、β-catenin は核局在として評価した。

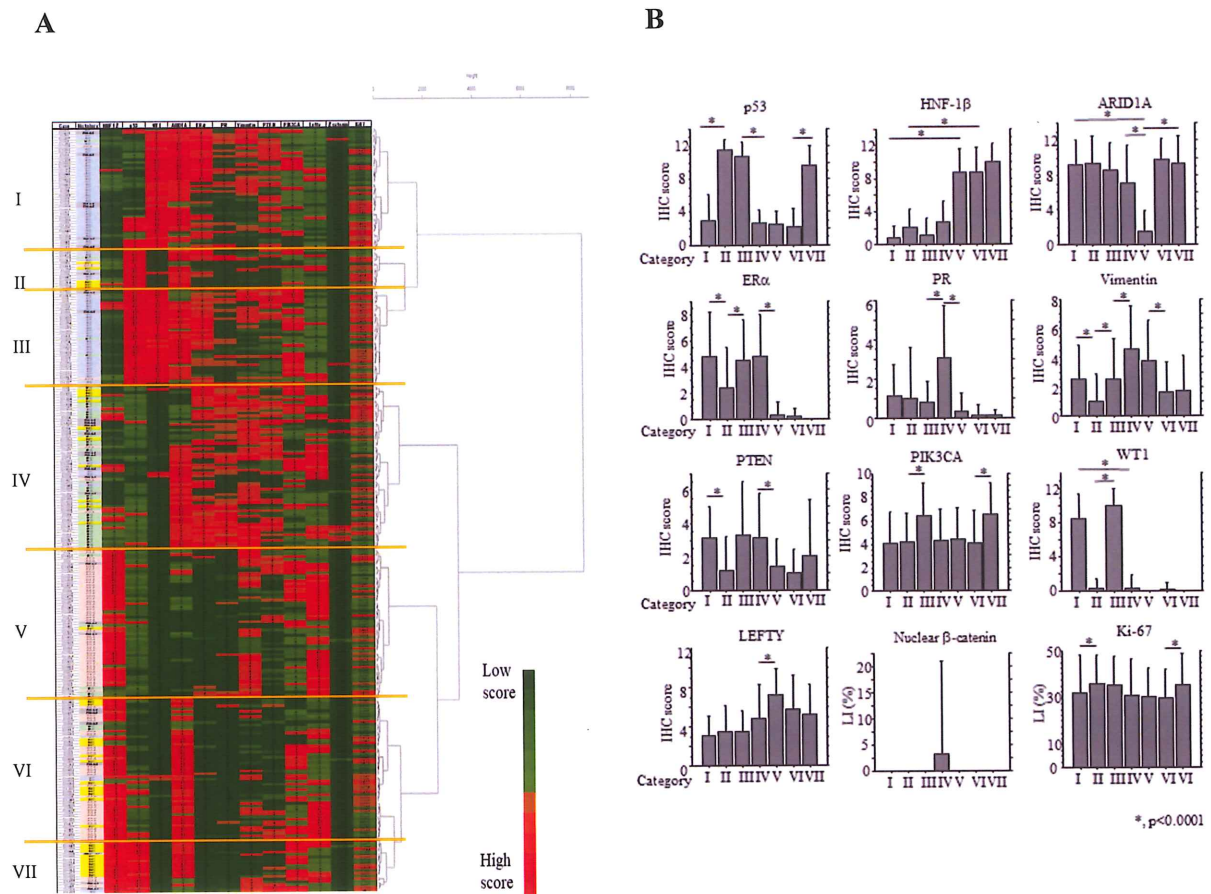
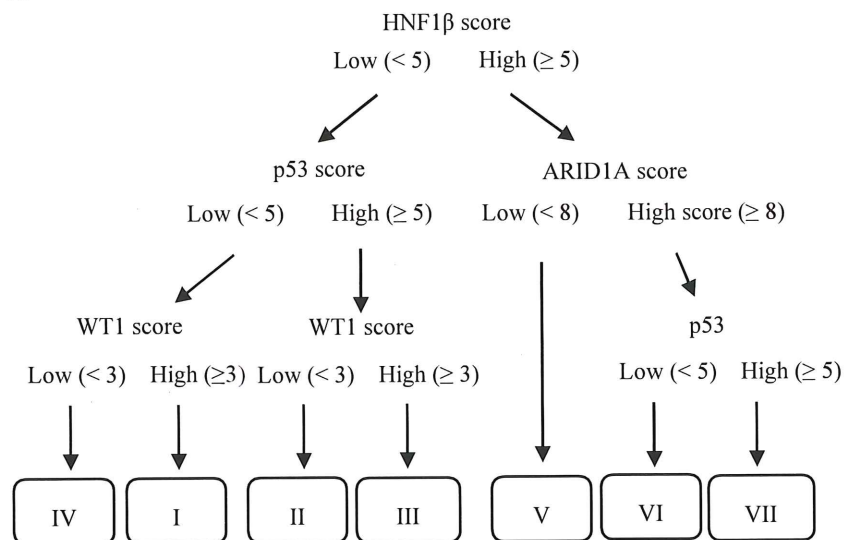


図 2 : タンパク発現による OECa の分類

- A) 階層的クラスター解析及びタンパク発現パネル  
 B) 各 IHC マーカーにおける IPGs 間の IHC score 比較検討

A



B

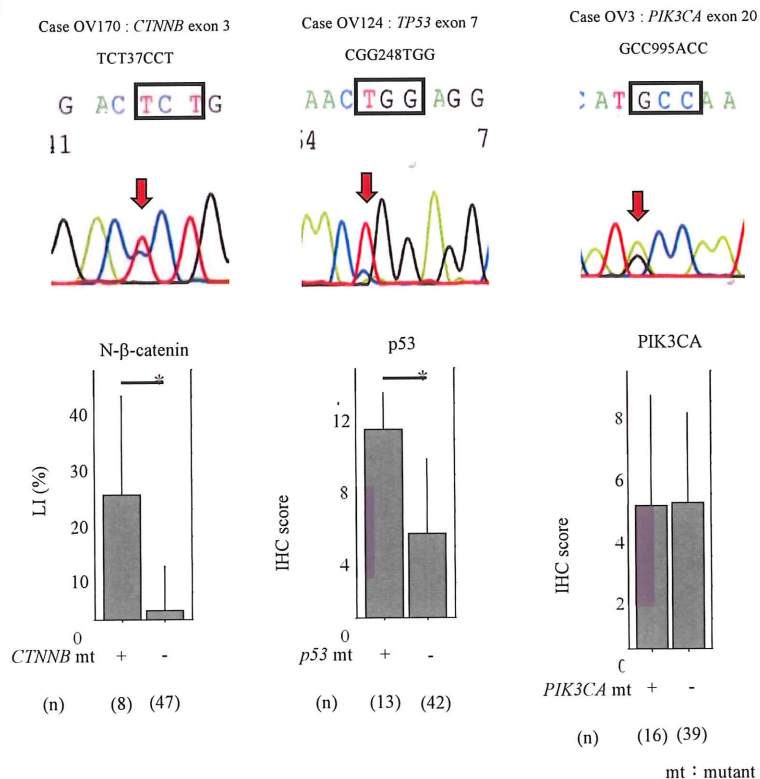


図 3 : IPGs へ分類する Flowchart 及び遺伝子変異解析

A) 有用性の高い 4IHC マーカーによる簡易的な Flowchart

B) *CTNNB*, *TP53*, *PIK3CA* の遺伝子変異 (上部) と IHC score (下部) の関連



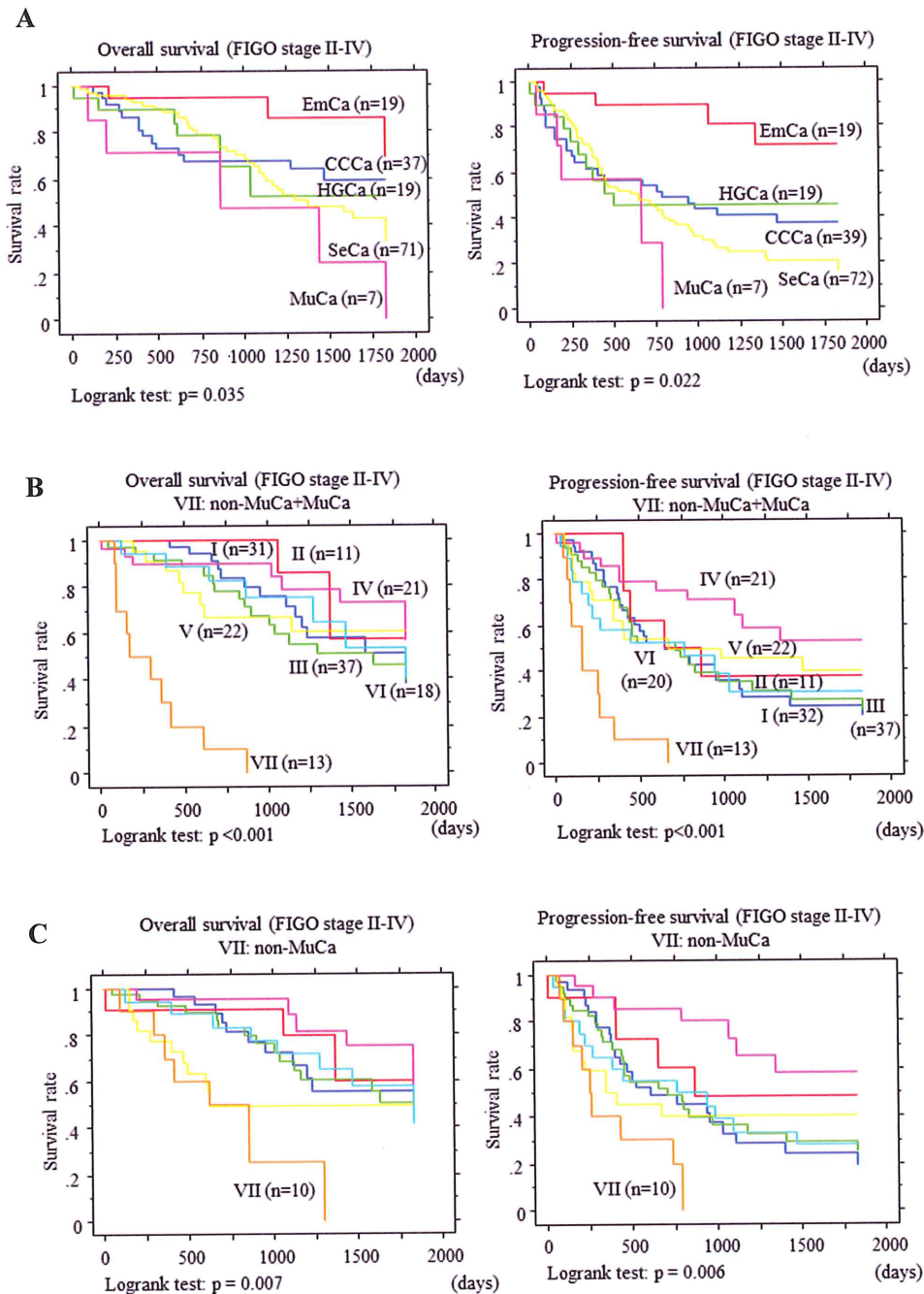


図 4 : 進行期 OECa における Kaplan-Meier 生存曲線

A) OECa 組織型別

B) IPGs 別

C) VII 群の MuCa を除いた IPGs 別

左 : Overall survival 右 : Progression-free survival

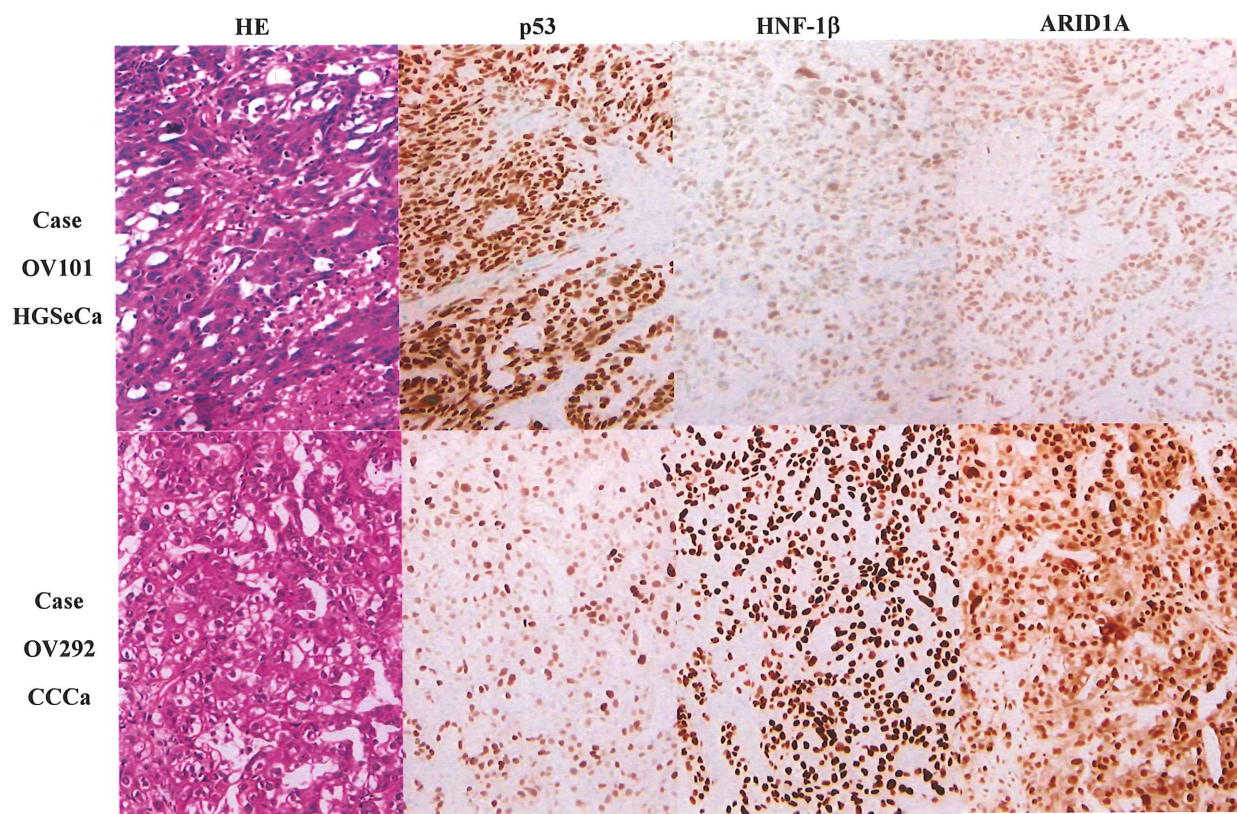


図 5 : VII 群に属する症例における p53、HNF-1 $\beta$  及び ARID1A の IHC 染色結果の一例

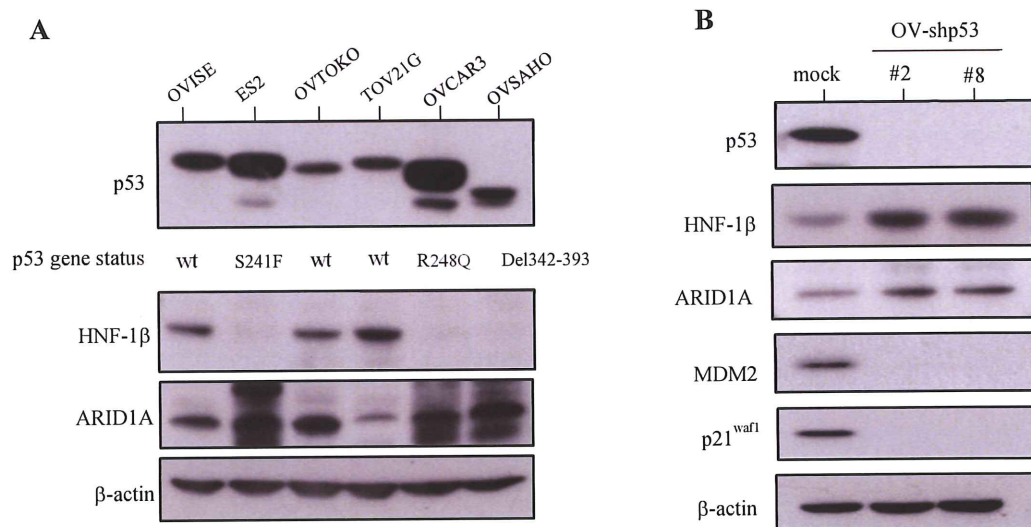


図 6：新規予後因子表現型モデルの作製

- A) CCCa 細胞株並びに HGSeCa 細胞株における  
新規予後因子表現型モデル作製細胞株の選出
- B) OVISE 細胞における p53 発現抑制後のタンパク発現の変化

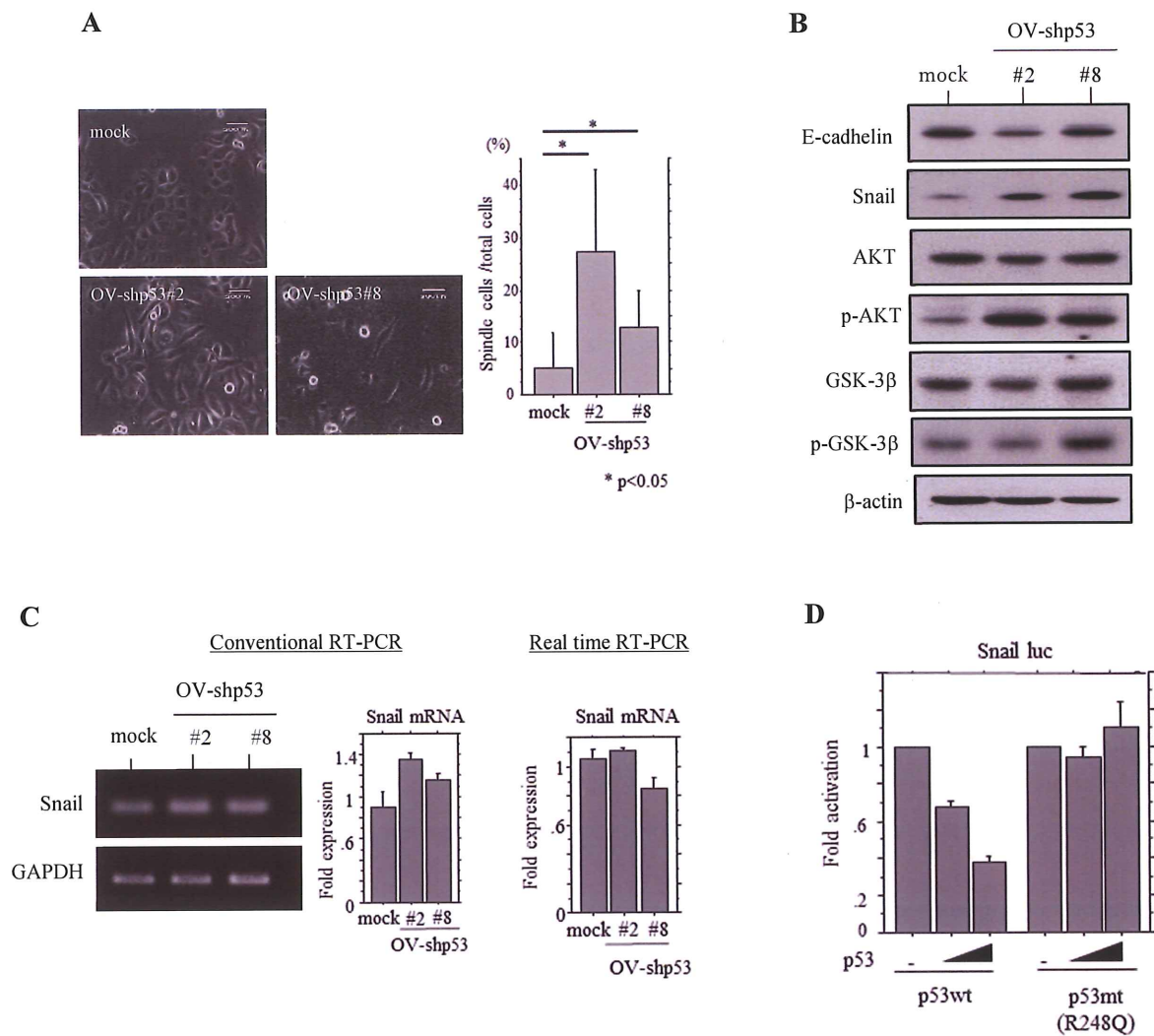


図 7 : OV-shp53 における細胞形態の変化

- A) OV-shp53 の細胞形態の変化
- B) OV-shp53 における EMT 関連マーカーの発現
- C) *Snail* mRNA 発現の検討
- D) p53 発現ベクターを用いた *Snail* 遺伝子の promoter 活性の検討



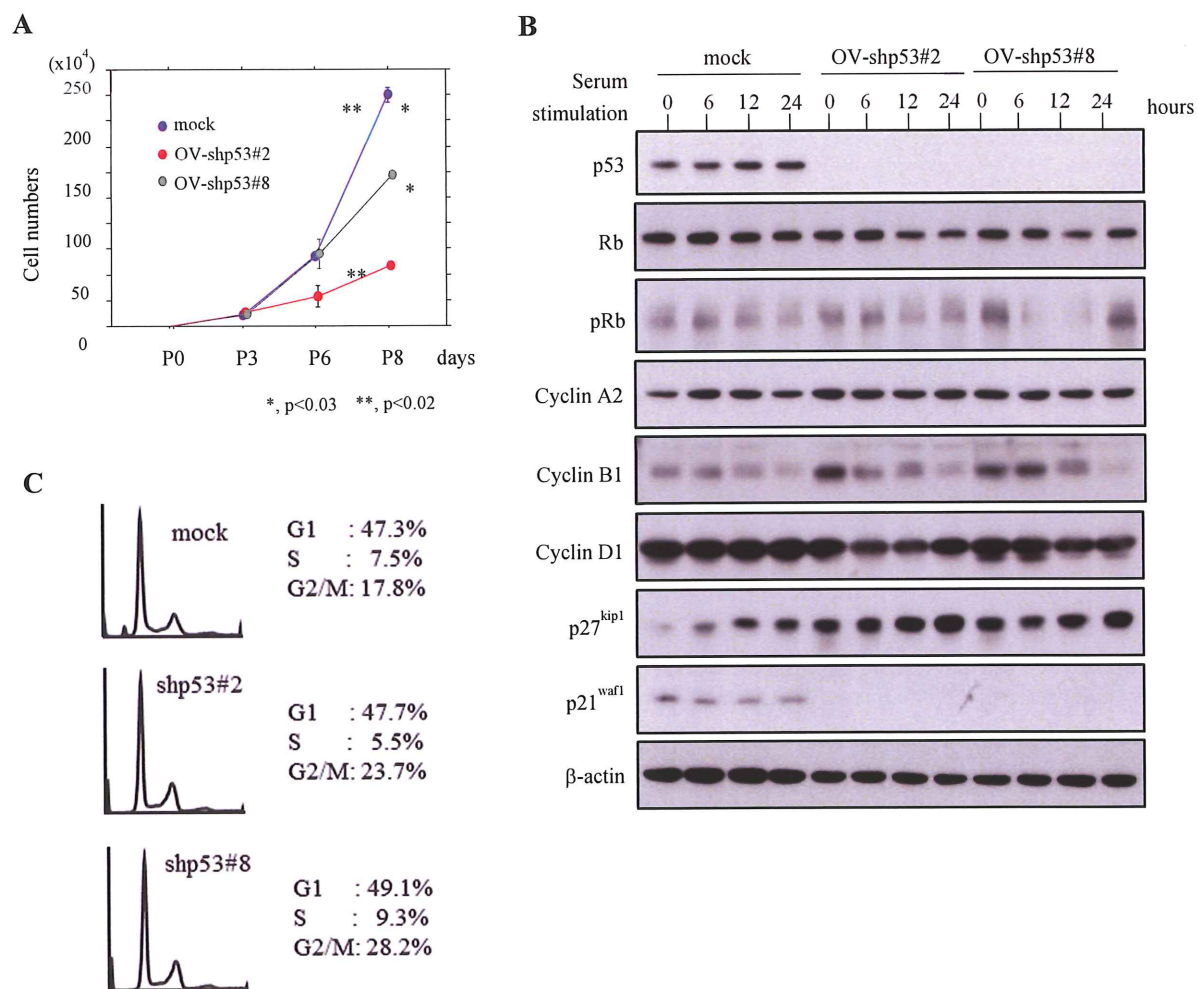
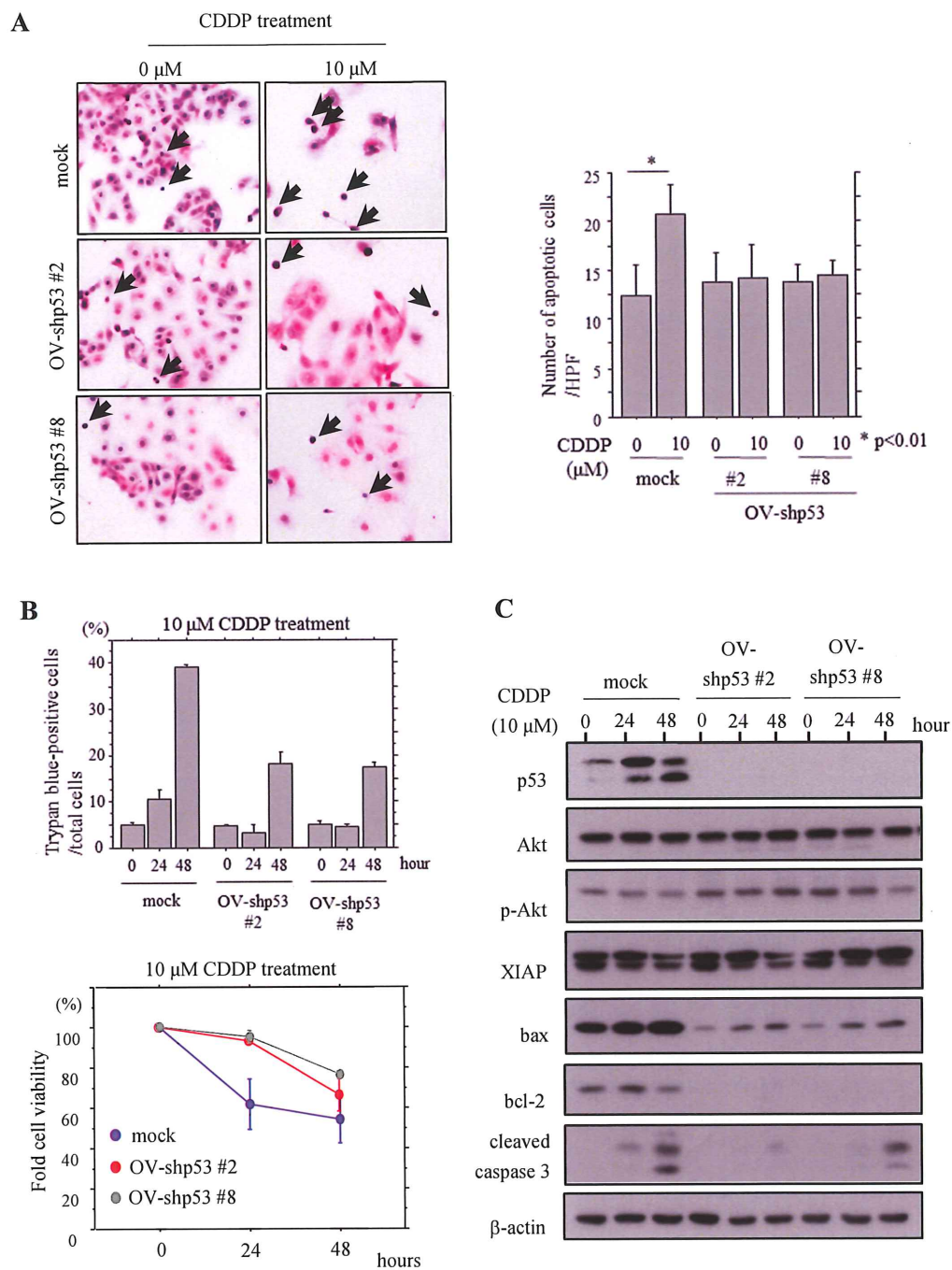


図 8 : OV-shp53 における細胞増殖能の検討

- A) 細胞増殖曲線
- B) 血清刺激による細胞周期関連マーカーの発現検討
- C) PI 染色による細胞周期解析



**図 9 : OV-shp53 における薬剤耐性能の検討**

- A) CDDP 処理後 HE 染色によるアポトーシス小体の計測結果
- B) 上部 : CDDP 処理後トリパンプルー染色による死細胞の計測結果  
下部 : CCK-8 解析を用いた細胞生存率曲線
- C) アポトーシス関連マーカーの発現検討

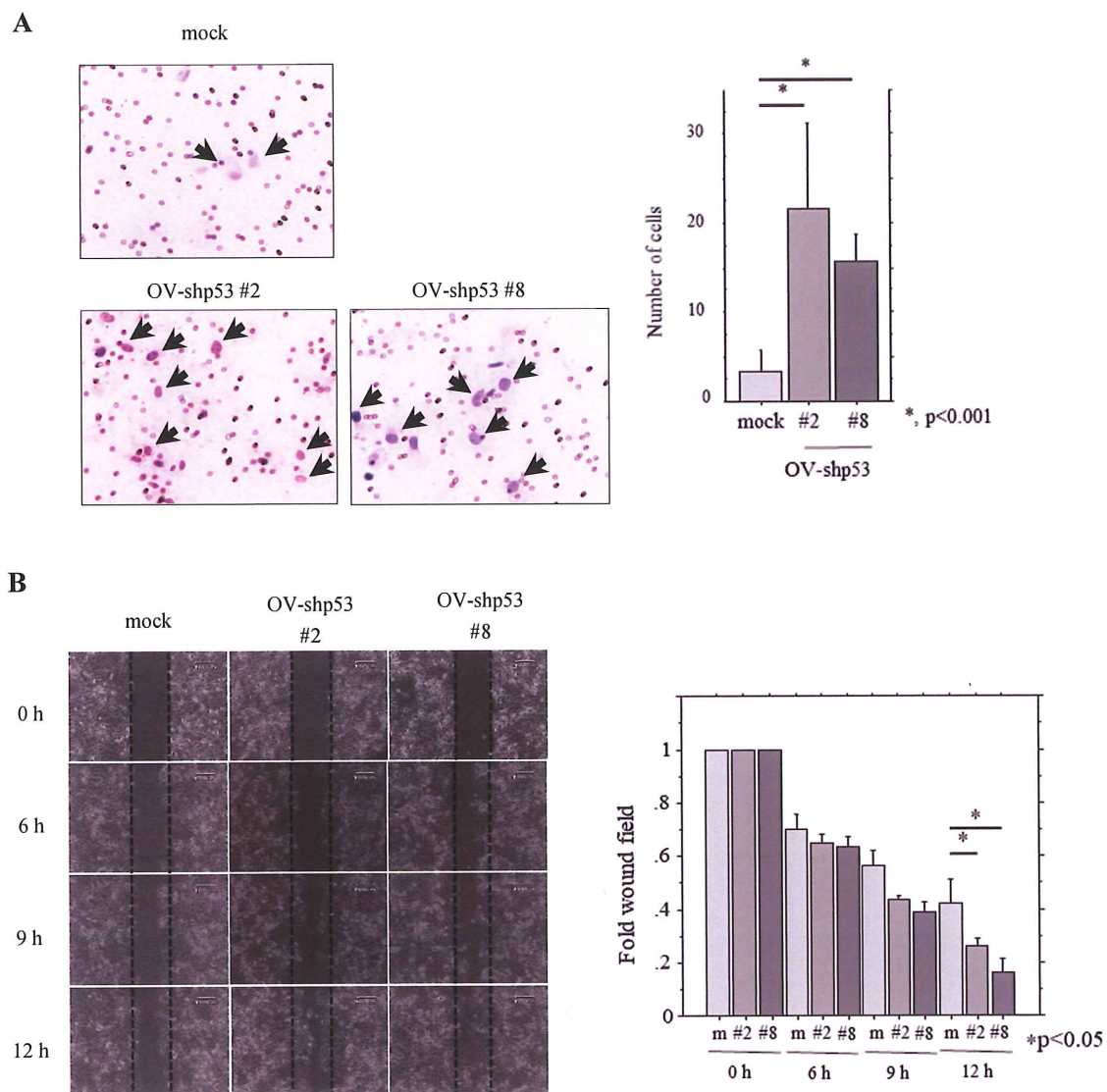


図 10 : OV-shp53 における細胞移動能の検討

- A) Migration assay
- B) Wound healing assay



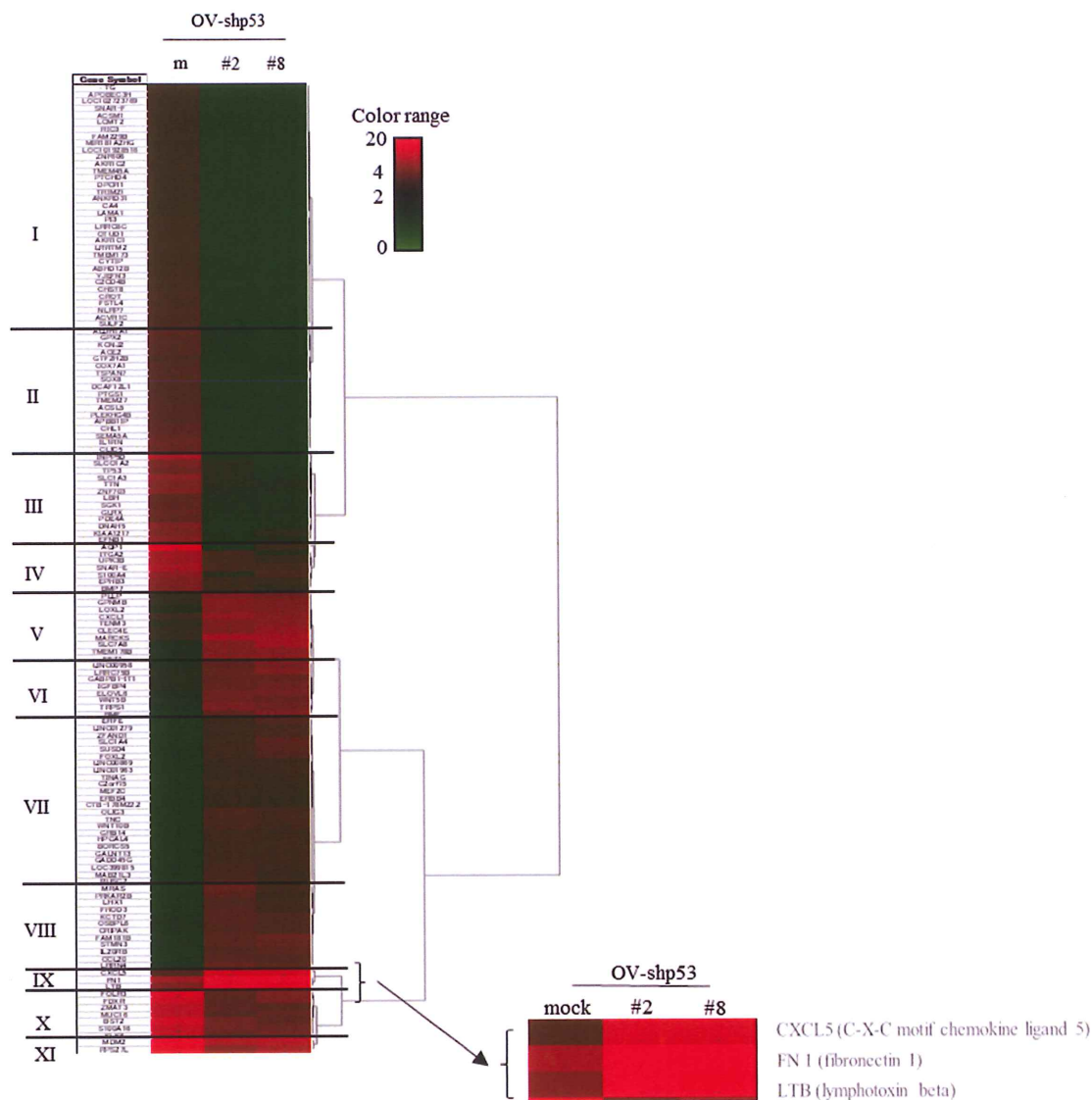


図 11: 次世代シーケンス法を用いた網羅的解析

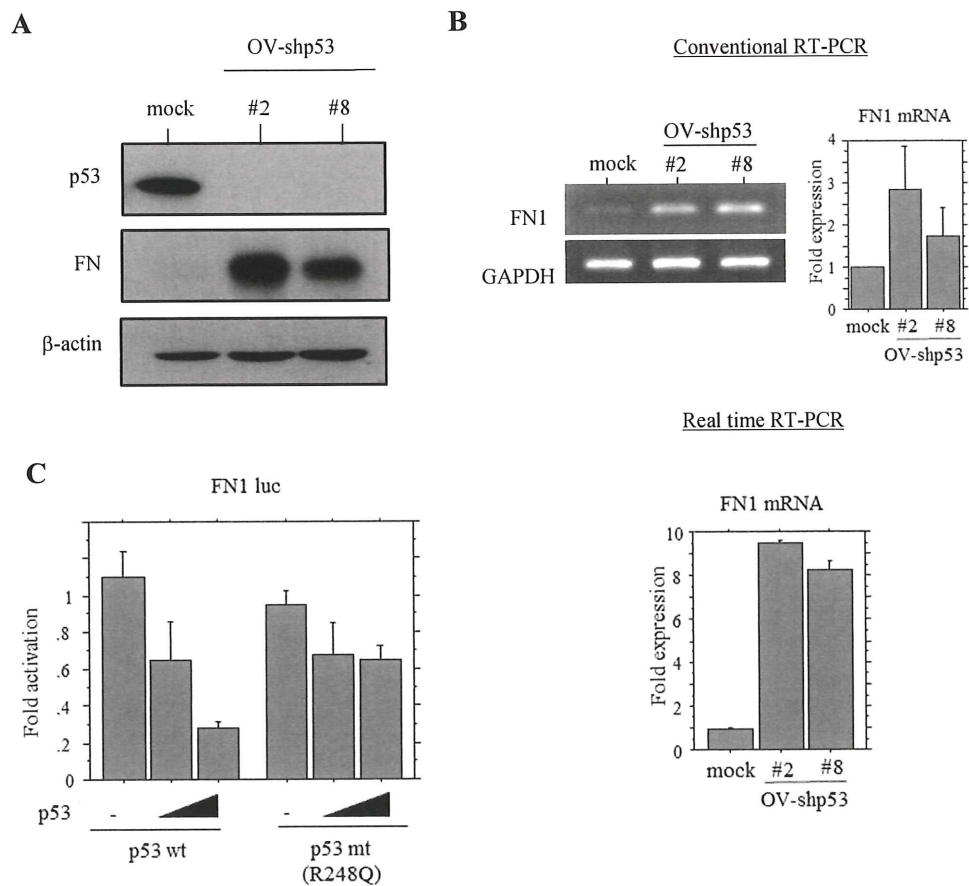


図 12 : OV-shp53 主要因子 FN の検討

- A) OV-shp53 における FN タンパク発現の確認
- B) *FN1* mRNA 発現の検討
- C) p53 発現ベクターを用いた *FN1* 遺伝子の promoter 活性の検討

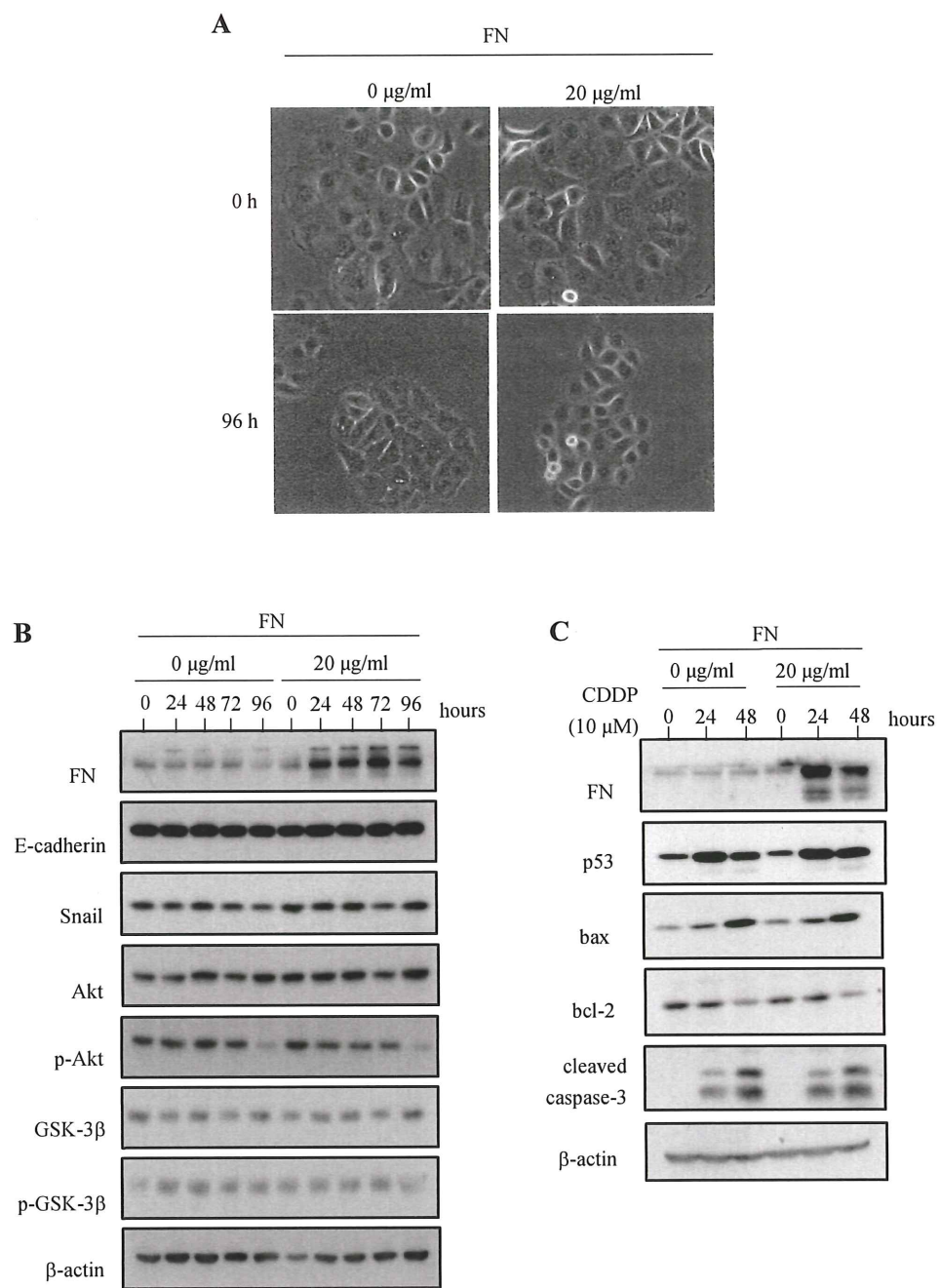


図 13 : OVISE 細胞における FN 処理後の  
細胞形態及び薬剤耐性能の変化

- A) 細胞形態
- B) EMT 関連マーカーの発現検討
- C) アポトーシス関連マーカーの発現検討

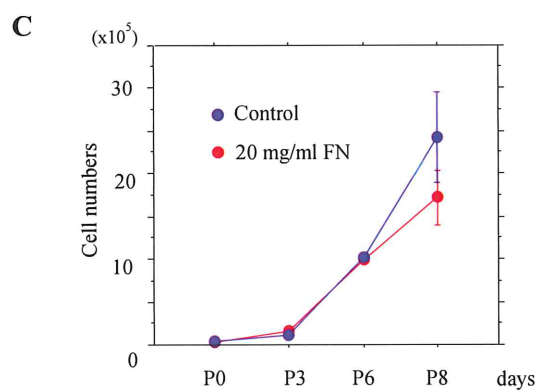
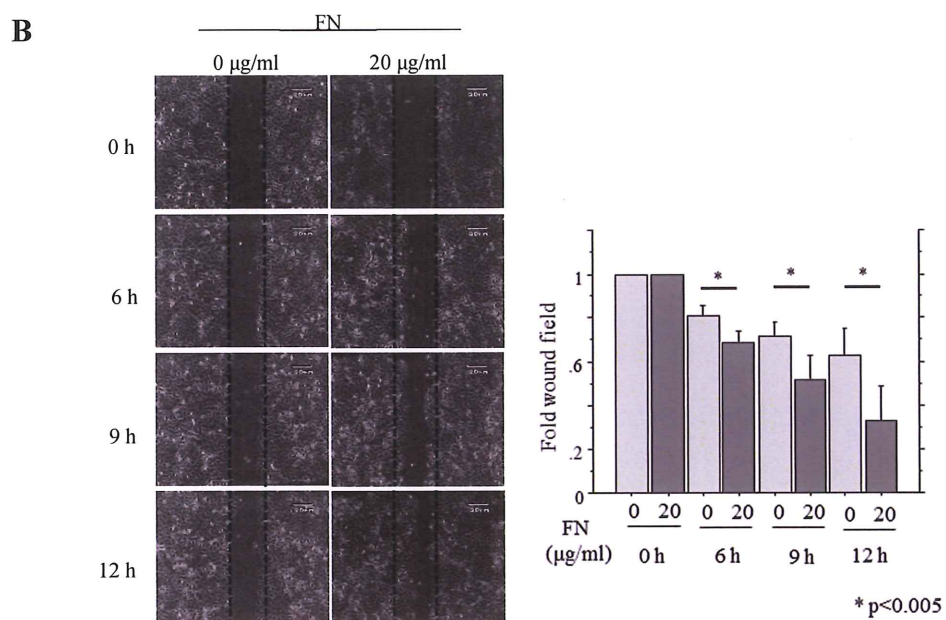
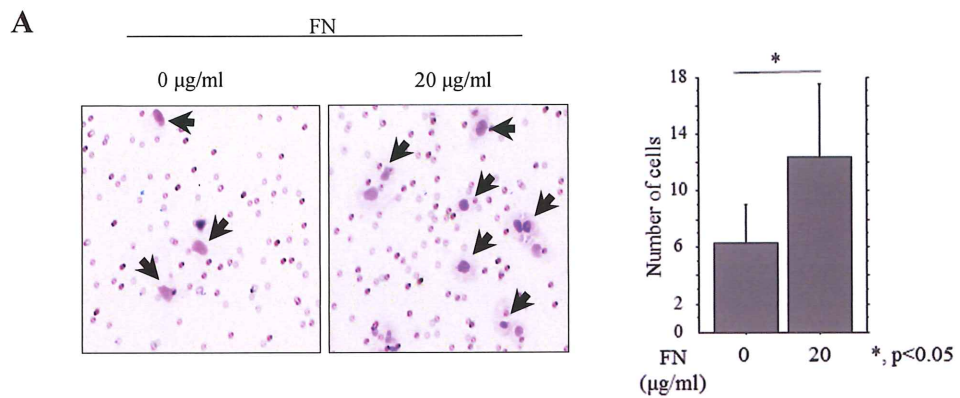
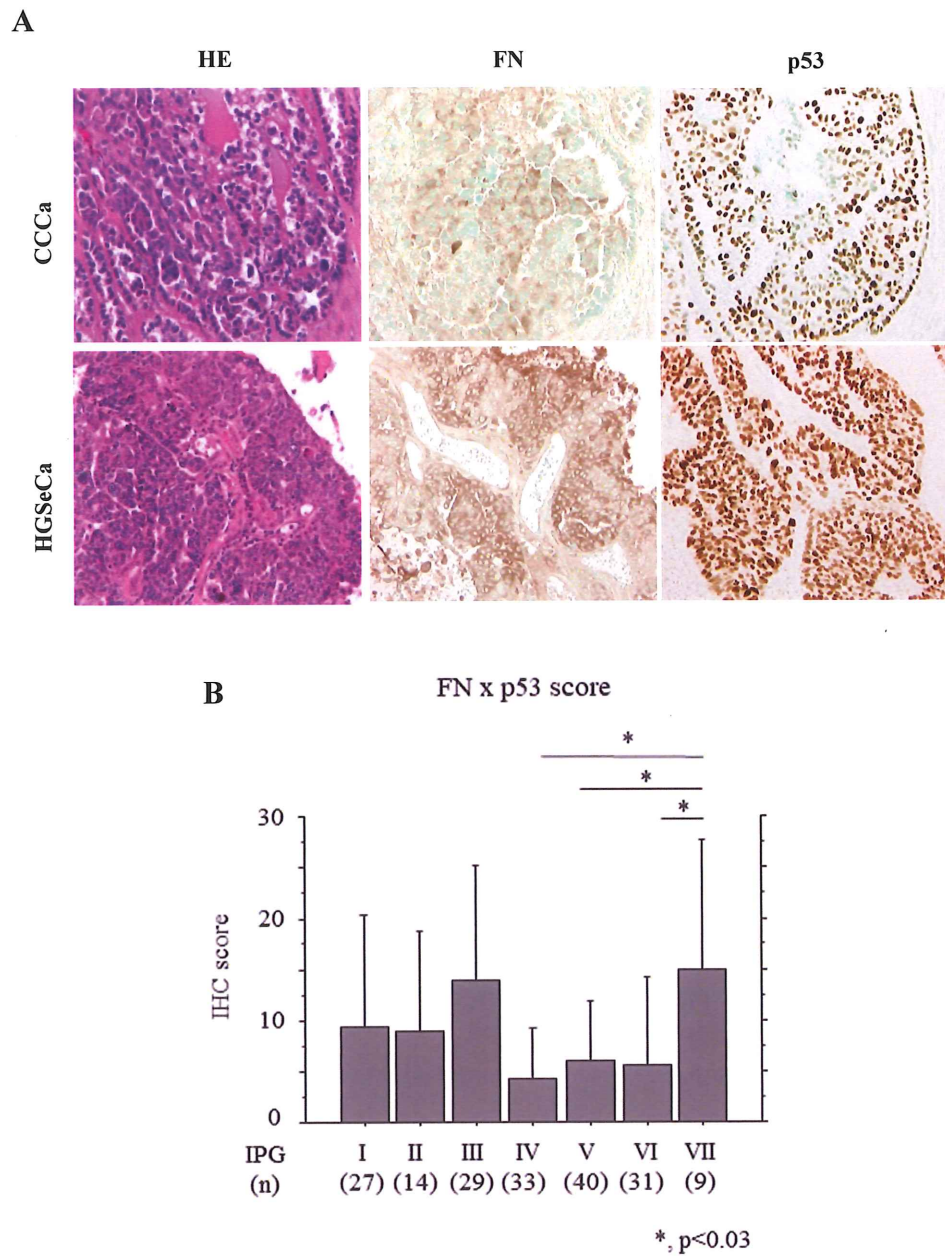


図 14: OVISE 細胞における FN 処理後の細胞移動能及び細胞増殖能の変化

- A) Migration assay
- B) Wound healing assay
- C) 細胞増殖曲線





**図 15 : FN の免疫組織化学的検討**

- A) 臨床病理検体を用いた FN 及び p53 の免疫組織化学的検討。  
 FN は細胞質、p53 は核に局在 (×400)
- B) IPGs 間における FN×p53 IHC score の比較検討

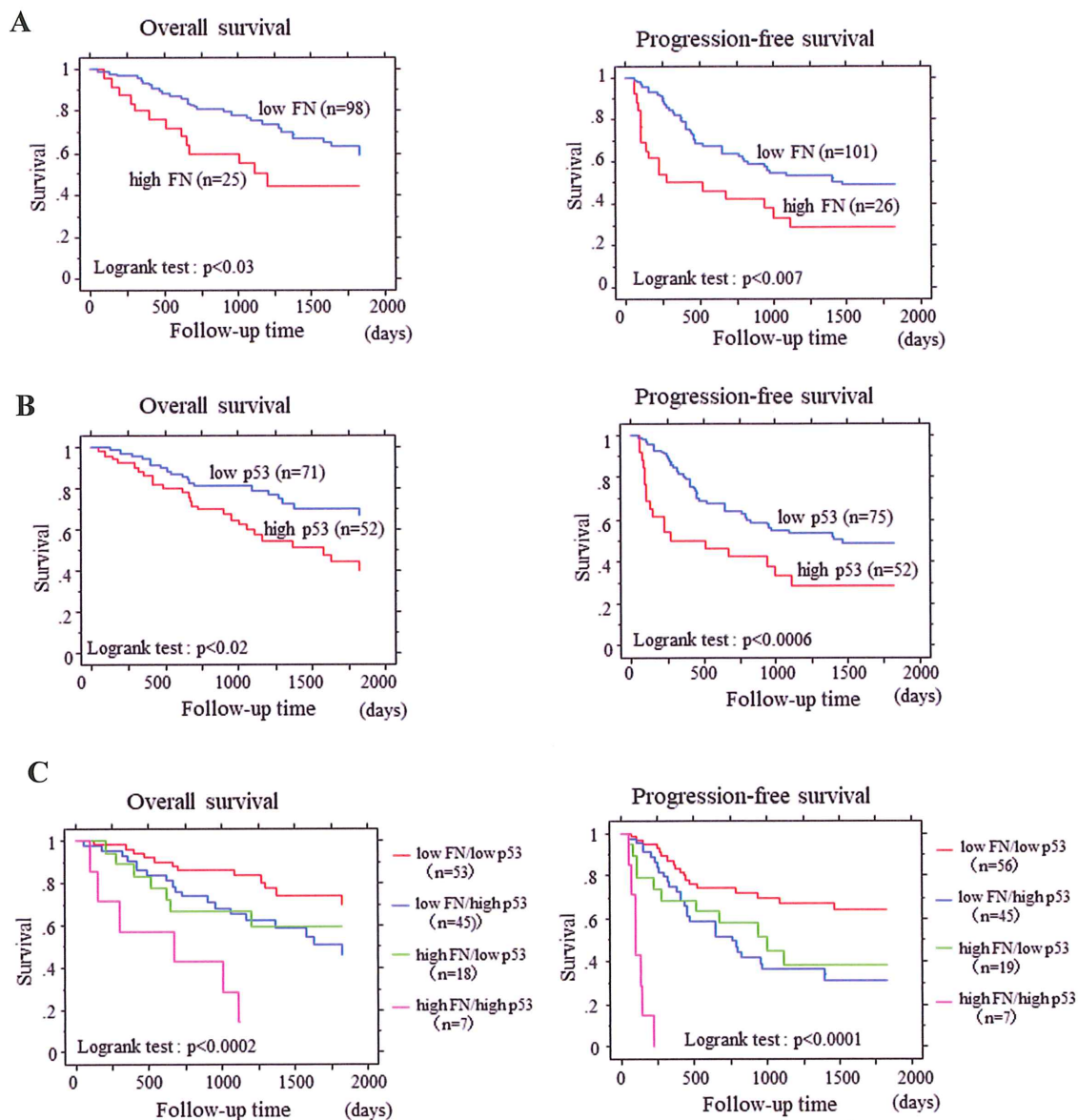


図 16 : 発現レベルの差における Kaplan-Meier 生存曲線

A) FN 高発現／低発現

B) p53 高発現／低発現

C) FN 高発現／低発現及び p53 高発現／低発現の組み合わせ

左 : Overall survival 右 : Progression-free survival

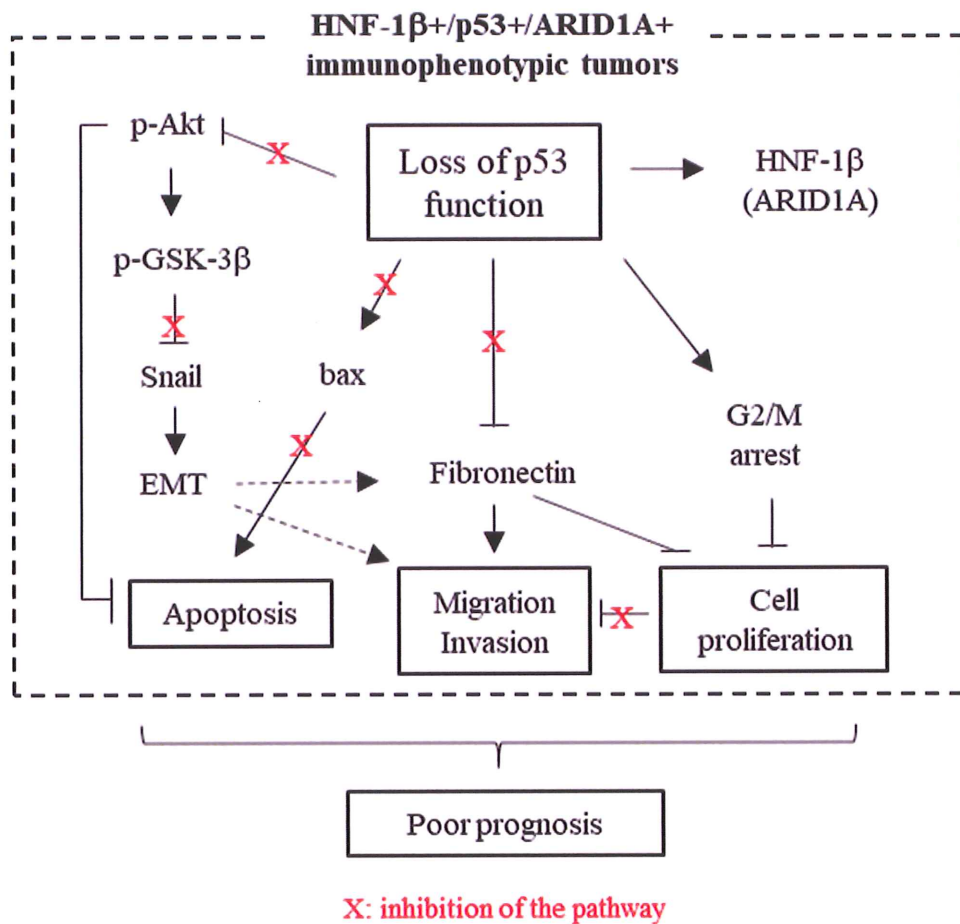


図 17 : HNF-1 $\beta$ + / p53+ / ARID1A+ 表現型腫瘍における  
予後不良分子機構一部の模式図

表 1 : IPGs における組織型割合

Immunoprofile group	n	Histotype					
		HGSeCa	LGSeCa	EmCa	CCCa	MuCa	HGCa
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
I	38	18 (47.4)	11 (28.9)	2 (5.3)	1 (2.3)	1 (2.6)	5 (13.2)
II	18	6 (33.3)	1 (5.6)	4 (22.2)	1 (6.7)	5 (33.3)	1 (6.7)
III	42	32 (76.2)	1 (2.4)	3 (8.6)	1 (2.9)	0 (0)	5 (11.9)
IV	54	2 (3.7)	0 (0)	31 (57.4)	6 (11.1)	9 (16.7)	6 (11.1)
V	57	2 (3.5)	0 (0)	2 (3.5)	44 (77.2)	2 (3.5)	7 (12.3)
VI	47	3 (5.7)	0 (0)	5 (10.6)	27 (57.4)	9 (19.1)	6 (6.4)
VII	26	6 (23.1)	0 (0)	0 (0)	5 (19.2)	15 (57.7)	0 (0)

n, number of cases; HGSeCa, high grade serous carcinoma; LGSeCa, low grade serous carcinoma;  
EmCa, endometrioid carcinoma; CCCa, clear cell carcinoma; MuCa, mucinous carcinoma;  
HGCa, high grade carcinoma



表 2 : OECa 組織型別及び IPGs 別における遺伝子変異頻度

Category	Type	n	Gene mutations							
			<i>CTNNB</i>		<i>p53</i>		<i>PIK3CA</i>		<i>K-ras</i>	
			n (%)	p-value	n (%)	p-value	n (%)	p-value	n (%)	p-value
Histotype	HGSeCa	16	1 (1.8)	0.006	6 (10.9)	0.06	5 (9.1)	0.3	1 (1.8)	0.6
	EmCa	10	5 (9.1)		1 (1.8)		3 (5.5)		2 (3.6)	
	CCCa	14	0 (0)		1 (1.8)		6 (10.9)		1 (1.8)	
	MuCa	7	0 (0)		3 (5.5)		0 (0)		1 (1.8)	
	HGCa	8	2 (3.6)		2 (3.6)		2 (3.6)		1 (1.8)	
Immunoprofile group	I	10	1 (1.8)	0.001	0 (0)	0.007	3 (5.5)	0.02	0 (0)	0.07
	II	10	2 (3.6)		5 (9.1)		0 (0)		1 (1.8)	
	III	5	1 (1.8)		3 (5.5)		3 (5.5)		0 (0)	
	IV	5	4 (7.3)		0 (0)		2 (3.6)		2 (3.6)	
	V	7	0 (0)		0 (0)		5 (9.1)		0 (0)	
	VI	5	0 (0)		0 (0)		0 (0)		2 (3.6)	
	VII	13	0 (0)		5 (9.1)		3 (5.5)		1 (1.8)	

n, number of cases; HGSeCa, high grade serous carcinoma; EmCa, endometrioid carcinoma; CCCa, clear cell carcinoma  
MuCa, mucinous carcinoma; HGCa, high grade carcinoma

表 3：新規予後不良因子における単変量解析（左）及び多変量解析（右）

Univariate analysis					Multivariate analysis				
Variables	Cutt-off	Log rank c2	p-value	unfavorble factor	Variable	Cut-off	Hazard Ratio	95% CI	p-value
Overall survival					Overall survival				
HNF-1 $\beta$ /p53/ARID1A +++/others		17.6	<0.0001	+++	HNF-1 $\beta$ /p53/ARID1A +++/others		3.64	1.75 - 7.54	0.0005
Age	57/58	1.76	0.18		FIGO stage	II/III $\cdot$ V	0.16	0.07 - 0.37	<0.0001
FIGO stage	II/III $\cdot$ V	25.66	<0.0001	III $\cdot$ IV					
Progression-free survival					Progression-free survival				
HNF-1 $\beta$ /p53/ARID1A +++/others		10.5	0.0012	+++	HNF-1 $\beta$ /p53/ARID1A +++/others		0.15	0.08 - 0.29	<0.0001
Age	57/58	0.81	0.36		FIGO stage	II/III $\cdot$ V	2.82	1.48 - 5.37	0.0016
FIGO stage	II/III $\cdot$ V	42.91	<0.0001	III $\cdot$ IV					

+++; all immunopositive for HNF-1 $\beta$ , p53, and ARID1A

表 4 : FN 及び p53 発現と臨床病理学的因子の関連性

		n	Fibronectin IHCscore		p-value	p53 IHCscore		p-value
			High ( $\geq 3$ )	Low ( $3<$ )		High ( $\geq 6$ )	Low ( $6<$ )	
			n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Age (years)	$< 58$	61	14 (23.0)	47 (77.0)	0.7	23 (37.7)	38 (62.3)	0.6
	$\geq 58$	66	12 (18.2)	54 (81.8)		29 (44.0)	37 (56.0)	
Clinical stage	I	40	7 (17.5)	33 (82.5)	0.7	4 (10.0)	36 (90.0)	$<0.0001$
	II / III / IV	87	19 (21.8)	68 (78.2)		48 (55.2)	39 (44.8)	
Histology	OCCCa	69	20 (29.0)	49 (71.0)	0.01	6 (8.7)	63 (91.3)	$<0.0001$
	OHGSeCa	58	6 (10.3)	52 (89.7)		46 (79.3)	12 (20.7)	
Tumor size (cm)	$< 11.2$	82	11 (13.4)	71 (86.6)	0.01	41 (50.0)	41 (50.0)	0.008
	$\geq 11.2$	45	15 (33.3)	30 (66.7)		11 (24.4)	34 (75.6)	
LN metastasis	Positive	27	11 (40.7)	16 (59.3)	0.008	15 (55.6)	12 (44.4)	0.1
	Negative	100	15 (15.0)	85 (85.0)		37 (37.0)	63 (63.0)	
Distant metastasis	Positive	12	4 (33.3)	8 (66.7)	0.4	10 (83.3)	2 (16.7)	0.004
	Negative	115	22 (19.1)	93 (66.7)		42 (36.5)	73 (63.5)	

LN, lymph node; n, number of cases

表 5 : FN 及び p53 を含めた単変量解析 (左) 及び多変量解析 (右)

Univariate analysis					Multivariate analysis				
Variables	Cutt-off	Log rank c2	p-value	unfavorble factor	Variable	Cut-off	Hazard Ratio	95% CI	p-value
Overall survival					Overall survival				
Fibronectin	2/3	4.9	0.02	High score	Fibronectin	2/3	2.6	1.2 - 5.4	0.01
p53	5/6	6.4	0.01	High score	p53	5/6	0.9	0.4 - 2.0	0.8
Histological type	OCCCa/OHGSeCa	11.2	0.0008	OHGSeCa	Histological type	OCCCa/OHGSeCa	0.4	0.2 - 1.1	0.07
Age	57/58	0.4	0.52		FIGO stage	I/II • III • V	0.2	0.06 - 0.7	0.01
FIGO stage	I/II • III • V	16.1	<0.0001	II • III • IV	LN metastasis	-/+	0.8	0.4 - 1.5	0.5
Tumor size	11.1/11.2	1.1	0.3		Distant metastasis	-/+	0.7	0.3 - 1.6	0.4
LN metastasis	-/+	7.8	0.005	+	Residual tumor	Present/absent	0.6	0.3 - 1.2	0.2
Distant metastasis	-/+	8.9	0.002	+	after surgery				
Residual tumor after surgery	Present/absent	8.1	0.004	Present					
Progression-free survival					Progression-free survival				
Fibronectin	2/3	7.6	0.006	High score	Fibronectin	2/3	3.3	1.7 - 6.4	0.0005
p53	5/6	12.2	0.0005	High score	p53	5/6	1.3	0.6 - 2.8	0.6
Histological type	OCCCa/OHGSeCa	16.6	<0.0001	OHSeGCa	Histological type	OCCCa/OHGSeCa	0.6	0.3 - 1.3	0.2
Age	57/58	3.9	0.04	58 ≤	Age	57/58	0.8	0.4 - 1.3	0.3
FIGO stage	I/II • III • V	32.7	<0.0001	II • III • IV	FIGO stage	I/II • III • V	0.2	0.06 - 0.5	0.001
Tumor size	11.1/11.2	0.7	0.3		LN metastasis	-/+	0.7	0.4 - 1.2	0.2
LN metastasis	-/+	14.5	0.0001	+	Distant metastasis	-/+	0.5	0.2 - 0.9	0.03
Distant metastasis	-/+	22.1	<0.0001	+	Residual tumor	Present/absent	0.7	0.4 - 1.3	0.3
Residual tumors after surgery	Present/absent	10	0.001	Present	after surgery				

LN, lymph node; n, number of cases