

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 横井 愛香



論 文 題 目

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)

指 導 教 授 承 認 印

三 枝 信



# 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)

横井 愛香

### 【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。卵巣は腹腔内臓器の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診断が難渋する。

この背景から、OECa の組織型判定をより客観的に行うための手法の一つとして OECa をタンパク発現及び遺伝子異常のプロファイルの観点から解析した。その結果、4 つの免疫組織化学マーカー (HNF-1 $\beta$ , p53, ARID1A, WT1) のみによる immunoprofiling 分類システムを構築し、HNF-1 $\beta$ +/p53+/ARID1A+ (+: High expression) を示す腫瘍は予後不良で新規予後因子であることを明らかにした。上記表現型を有する OECa の特性を解明する上で、p53 シグナル伝達経路の変化が重要となる可能性があるとの仮説を立て、そのメカニズムの主たる分子を次世代シーケンス法より網羅的に検索し、p53 機能消失に関連する分子 Fibronectin (FN) を特定した。故に、FN の機能解析及び臨床病理学的な関連を検証し、p53/FN axis の重要性を検討した。

### 【材料・方法】

臨床検体は、2006 年～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ן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 種の分子マーカー (ER $\alpha$ , PR, p53, HNF-1 $\beta$ , Vimentin, ARID1A, PTEN, PIK3CA, WT1, LEFTY,  $\beta$ -catenin, Ki67) 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 TP53 knockdown 細胞株を作製し、タンパク発現 (Western blotting)、mRNA 発現 (RT-PCR, real time RT-PCR)、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)、移動能検討 (Wound healing assay, Migration assay) を行った。さらに、TP53 knockdown 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 種の分子マーカーで免疫組織化学染色後 Score 化し、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。(- : Low expression, + : High expression) また、IPGs と遺伝子異常の関連をみるため、*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、高精度な分類であることが示唆された。

## 2. 同定した新規予後因子の機能解析

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、内因性 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 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 の 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 OCCCa 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 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ところ mock に比して低下していた。PI 染色による Flow cytometry 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。シスプラチン (CDDP) 処理後では、OV-shp53 は mock よりも apoptosis cell が減少しており、apoptosis 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、Wound healing assay 及び Migration 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 機能消失を起因として増殖能の低下、CDDP 耐性及び移動能の亢進が引き起こされていることが示唆された。

予後不良表現型を有する OECa の特性を解明する上で、そのメカニズムの主たる分子を網羅的に検索するため次世代シーケンシング法を用いた。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 活性を抑制する機能が低下していることが示唆された。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 apoptosis 関連の発現に変化がみられなかった一方で、移動能は有意に亢進し、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 の発現が亢進していることが明らかとなり、さらに FN は移動能及び増殖能に関連し細胞内機能の重要な因子である可能性が示唆された。

### 3. 同定した新規予後因子の臨床応用

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、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-1β+/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ところ、組織型 (FN high score : OCCCa)・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 高発現/低発現と p53 高発現/低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×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-1β+/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 が蓄積されていると考えられる。故に、*in vitro* で予後不良表現型腫瘍の分子メカニズムを解明するにあたり、内因性 HNF-1β及び ARID1A が発現、p53wt である OVISE 細胞で、shRNA 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、増殖能の低下、CDDP 耐性能の獲得、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 RNA seq 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と示唆された。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、CDDP 耐性能の獲得により再発につながると考えられ、卵巢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】

HNF-1β+/p53+/ARID1A+の表現型を示す卵巢癌は予後不良で、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。