

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659725

研究課題名(和文) 婦人科悪性腫瘍におけるケラタン硫酸発現の検討

研究課題名(英文) Study of the expression of keratan sulfate in gynecological malignancies

研究代表者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA, Tanri)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：20235493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：抗ケラタン硫酸モノクローナル抗体 5D4 による免疫染色により、非腫瘍性女性生殖管上皮(子宮頸管腺、卵管、卵巣封入嚢胞、正所性もしくは異所性子宮内膜)は 96.2% (25/26 例) で陽性であり、消化器上皮(1/47 例、2.3%陽性)や尿路上皮(0/6 例、0%陽性)との判別に有用と考えられた。癌組織においても、女性生殖管由来の癌(子宮内膜癌、卵巣癌、卵管癌)では 90.6% にケラタン硫酸陽性を示したが、消化管由来、肝臓、腎尿路系の癌では発現を認めず、これらの癌との鑑別に有用なマーカーと考えられた。一方、肺癌や乳癌、甲状腺癌、膵臓癌、悪性中皮腫ではケラタン硫酸陽性例が存在した。

研究成果の概要(英文)：The immunohistochemical staining using monoclonal antibody for keratan sulfate (KS) revealed that the expression of KS was observed in 96.2% (25/26 cases) of non-neoplastic epithelia in female genital tract including fallopian tube, ovarian inclusion cyst, endocervical gland, eutopic and ectopic endometrium. In contrast, the expression of KS was negligible in digestive organ (1/47 cases, 2.3%) and urinary tract (0/6 cases, 0%). In addition, the expression of KS was observed in 90.6% (29/32 cases) of carcinomas in female genital tract (endometrial, tubal and ovarian carcinoma), whereas observed in 0% (0/33 cases) of other carcinomas in abdominal cavity (digestive tract, liver, kidney and urinary tract). These findings suggest that the immunostaining for KS is useful to discriminate epithelia and carcinomas of female genital tract in abdominal cavity. On the other hand, KS-positive cases were present in breast, lung, thyroid, pancreatic cancer and malignant mesothelioma.

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ケラタン硫酸 婦人科悪性腫瘍 子宮内膜症 鑑別診断

## 1. 研究開始当初の背景

腹腔内に広汎に播種した癌や、肝臓や肺、リンパ節などの転移性癌において、その原発部位を診断することは、肉眼的所見はもとより HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色による病理組織学的検査であっても困難な場合が多い。一方、特定の抗癌剤への感受性など、癌の生物学的特性は原発部位の性質に依存するため、原発部位を診断する意義は大きい。そのため、これまでに CK7、CK20、CA125、CDX-2、ER など、多数の診断補助マーカーが開発され (Cancer 1999;85:p171、Cancer Res 2005;11:p3766、Cancer 2004;100:p1776)、病理組織学的に診断精度を向上させているが、各々のマーカーの診断精度は十分とは言えず、より精度の高い診断補助マーカーの開発が望まれている。

一方、我々の研究グループはこれまでに、軟骨基質や角膜の重要な構成要素であるグリコサミノグリカンのケラタン硫酸が (Essentials of Glycobiology, 2nd ed.2009;p229)、正所性および異所性子宮内臓腺上皮に発現することを見出した (Gynecol Obstet Invest 1991;32:p239)。さらにこのケラタン硫酸は子宮内膜癌、卵管癌、卵巣癌、原発性腹膜癌といった婦人科悪性腫瘍で高頻度に発現を認める一方、大腸癌、胃癌、肝臓癌等では発現が確認できず、婦人科悪性腫瘍に特異性の高い診断補助マーカーとして有用である可能性を見出した。また、婦人科癌でケラタン硫酸を血清中や尿中に見出した報告はないが、関節疾患やムコ多糖症 IVA では血清、尿中のマーカーとしての有用性が示されており (Pediatr Res 2004;55:p592)、また同じく糖鎖関連抗原である CA125 は血清診断マーカーとしての有用性も確立していることから (卵巣がん治療ガイドライン、2010年、78頁)、ケラタン硫酸が婦人科癌の血清診断マーカーとして有用である可能性も考えられる。

また、子宮内膜においてケラタン硫酸は細胞表面の接着分子を覆い隠すことにより、受精卵着床を抑制する働きが報告されているが (Glycobiology 1998;8:p269)、婦人科癌における発現の意義は不明である。その特異的な発現から治療ターゲットとなる可能性も考えられ、癌細胞におけるケラタン硫酸の機能を検討することは有意義であると考えられる。

## 2. 研究の目的

腹腔内に広汎に播種した癌や、転移性癌において、その原発部位を診断することは困難な場合が多い。一方、癌の生物学的特性は原発部位の性質に依存するため、原発部位を診断する意義は大きい。そのため、これまで多くの診断補助マーカーが開発されてきた。我々は、軟骨基質を形成するグリコサミノグリカンのうちケラタン硫酸が、子宮内臓腺上皮を始め婦人科臓器の上皮に特異的に発現

することを見出した。本研究では、ケラタン硫酸の婦人科悪性腫瘍における病理組織診断における診断補助マーカーとしての有用性を検討することを目的とする。さらに血清診断マーカーとしての有用性も検討する。また、婦人科癌におけるケラタン硫酸発現の意義を検討する。

## 3. 研究の方法

研究は大学の倫理委員会の承認を得て行った。

### (1) 組織サンプル

#### (ア) 正常上皮、非腫瘍性上皮

女性生殖管上皮として、卵管 3 例、子宮内膜 11 例、子宮頸管 3 例、さらに卵巣 2 例 (封入嚢胞、卵胞、表層上皮) 異所性子宮内膜 7 例を検討に用いた。

また他臓器上皮としては、消化器 47 例 (食道 6 例、胃 6 例、小腸 7 例、大腸 9 例、肝臓 7 例、胆嚢 3 例、胆管 3 例、膵臓 6 例)、尿路系 6 例 (腎臓 2 例、膀胱 4 例)、肺 10 例、乳腺 9 例、甲状腺 4 例で検討した。

#### (イ) 悪性腫瘍組織

女性生殖管由来の悪性腫瘍として子宮内膜癌 17 例 (類内膜腺癌 12 例、漿液性腺癌 2 例、明細胞腺癌 2 例、未分化癌 1 例)、子宮頸癌 7 例 (腺癌 5 例、扁平上皮癌 2 例)、卵巣癌 10 例 (類内膜腺癌 2 例、漿液性腺癌 4 例、明細胞腺癌 2 例、粘液性腺癌 2 例)、卵管・腹膜癌 5 例を検討に用いた。

他臓器由来の悪性腫瘍としては尿路系 11 例 (腎癌 5 例、膀胱癌 6 例)、消化管 17 例 (食道癌 5 例、胃癌 5 例、小腸/大腸癌 7 例)、肝臓癌 5 例、膵臓癌 9 例、肺癌 9 例、乳腺 10 例、甲状腺癌 5 例、悪性中皮腫 5 例を検討に用いた。

### (2) 免疫染色

各サンプルのホルマリン固定組織切片を作成し、ケラタン硫酸発現を、抗ケラタン硫酸マウスモノクローナル抗体 (5D4) (Seikagaku Biobusiness, Tokyo, Japan) を一次抗体として、間接的酵素抗体法による免疫染色を行った。

### (3) 免疫染色の評価

各上皮組織における染色陽性細胞の割合により評価を行った。陽性細胞を全く認めない場合には「陰性」、陽性細胞の割合が 5% 未満であれば「弱陽性」、5% 以上であれば「陽性」と判定した。

### (4) 診断に苦慮する腹腔内病変例での検討

直腸粘膜下腫瘍を形成する直腸子宮内膜症例、腹腔内原発不明癌例、重複癌 (子宮内膜癌、大腸癌) での肝転移例等の実臨床で診断に苦慮する例において、ケラタン硫酸免疫染色が診断に有用であるか検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 正常上皮、非腫瘍性上皮におけるケラタン硫酸発現

#### (ア) 女性生殖管上皮

ケラタン硫酸発現陽性例は卵管上皮(3/3例)、子宮内膜腺上皮(10/11例)子宮頸管腺上皮(3/3例)で高率に陽性であったが、子宮頸部扁平上皮では1/3例に弱陽性を認めるのみであり、卵巣表層上皮や卵胞上皮は全例陰性であった。また卵巣の封入嚢胞、異所性子宮内膜腺では全例で陽性であった。卵管上皮、子宮内膜腺上皮、子宮頸部扁平上皮、卵巣の封入嚢胞、異所性子宮内膜腺でまとめると96.2%(25/26例)でケラタン硫酸陽性であった。

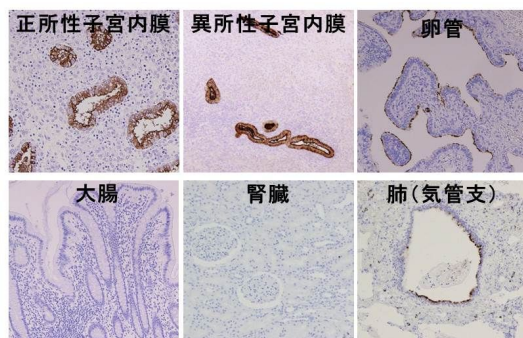


図1．正常上皮、非腫瘍性上皮におけるケラタン硫酸免疫染色結果

#### (イ) 他臓器上皮

他臓器におけるケラタン硫酸発現では、食道の扁平上皮に1例陽性例を認めたと、消化器上皮(1/47例、2.3%陽性・弱陽性)、尿路上皮(0/6例、0%陽性・弱陽性)では殆ど陽性・弱陽性例を認めなかった。

一方、肺の気管支(7/10例、70%陽性)気管支腺(10/10例、100%陽性)乳腺(2/9例、22%陽性)甲状腺(2/4例、50%陽性)では、ケラタン硫酸発現を認めた。

#### (2) 悪性腫瘍でのケラタン硫酸発現

##### (ア) 女性生殖器由来

女性生殖器癌でのケラタン硫酸発現陽性率は子宮内膜癌(16/17例、94%陽性)卵巣癌(9/10例、90%陽性)卵管・腹膜癌(4/5例、80%陽性)で高率であり、子宮内膜癌の陰性例は未分化癌であった。これらの癌全体での陽性率は90.6%(29/32例)であった。

これに対し子宮頸癌では類内膜腺癌例の1例のみ陽性であり、ケラタン硫酸発現は子宮体部より上部の生殖管由来癌で、特徴的と考えられた。

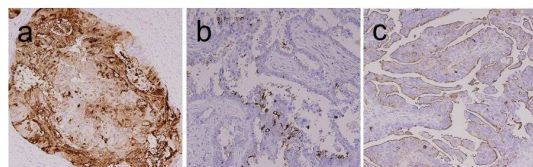


図2．女性生殖器癌でのケラタン硫酸免疫染色結果 a:子宮内膜癌(類内膜腺癌) b:子宮内膜癌(明細胞腺癌) c:卵巣癌(漿液性腺癌)

##### (イ) 他臓器悪性腫瘍

他臓器癌におけるケラタン硫酸発現では、尿路系(0/11例、0%陽性・弱陽性)消化管(0/17例、0%陽性・弱陽性)肝臓(0/5例、0%陽性・弱陽性)ではいずれも陽性・弱陽性例を認めなかった。一方、膵臓癌(2/9例、22%陽性)肺癌(2/9例、22%陽性)乳癌(2/10例、20%陽性)甲状腺癌(5/5例、100%陽性)悪性中皮腫(1/5例、20%陽性)ではケラタン硫酸陽性例を認めた。

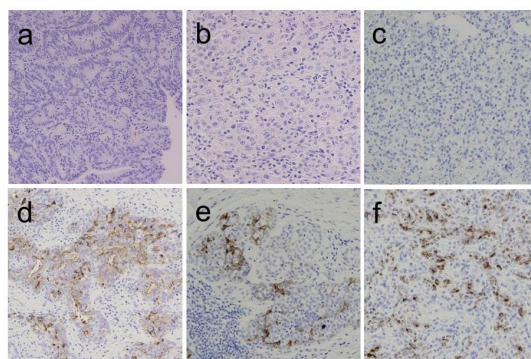


図3．他臓器癌でのケラタン硫酸免疫染色結果 a:胃癌、b:大腸癌、c:腎癌、d:肺癌、e:乳癌、f:悪性中皮腫

##### (3) 診断に苦慮する腹腔内病変例での検討

診断に苦慮する腹腔内病変例での検討を行った。直腸粘膜下腫瘍を形成する直腸子宮内膜症例、腹腔内原発不明癌例、重複癌(子宮内膜癌、大腸癌)での肝転移例では、ケラタン硫酸免疫染色が診断に有用であると考えられた。

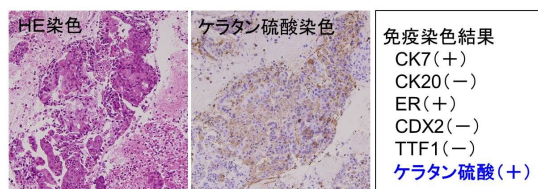


図4．原発不明横行結腸間膜腫瘍の経胃針生研組織 ケラタン硫酸染色陽性であり、女性生殖管由来と考えられた。他の免疫染色結果も女性生殖管由来で矛盾しない。

以上の検討から、ケラタン硫酸発現は特に腹腔内病変において、女性生殖管由来か、消化器由来や尿路系由来かを鑑別するのに特に有用と考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計9件)

1. Miyamoto T, Tachibana R, Kobara H, Takano T, Kato H, Shimizu A, Ohya A, Uehara T, Shiozawa T. Recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma with intracaval and intracardiac tumor thrombus: diagnosis, treatment,

- and surgical management. International Cancer Conference Journal 2014; 3: Issue 1, pp 1-7 (査読あり)
2. Ohira S, Ookubo N, Tanaka K, Takatsu A, Kobara H, Kikuchi N, Ohya A, Kanai M, Shiozawa T. Placental mesenchymal dysplasia: chronological observation of placental images during gestation and review of the literature. Gynecol Obstet Invest. 2013; 75: 217-23. (査読あり)
  3. Kobara H, Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kikuchi N, Ohira S, Shiozawa T. Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia. Placenta. 2013; 34: 1036-43. (査読あり)
  4. Takatsu A, Miyamoto T, Fuseya C, Suzuki A, Kashima H, Horiuchi A, Ishii K, Shiozawa T. Clonality analysis suggests that STK11 gene mutations are involved in progression of lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH) to minimal deviation adenocarcinoma (MDA). Virchows Arch. 2013; 462: 645-51. (査読あり)
  5. Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Nakayama J, Shiozawa T. Immunohistochemical expression of core 2 1,6-N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1) in endometrioid-type endometrial carcinoma: a novel potential prognostic factor. Histopathology. 2013; 62: 986-93. (査読あり)
  6. Ohira S, Kikuchi N, Kobara H, Osada R, Ashida T, Kanai M, Shiozawa T. Predicting the route of delivery in women with low-lying placenta using transvaginal ultrasonography: significance of placental migration and marginal sinus. Gynecol Obstet Invest. 2012; 73: 217-22. (査読あり)
  7. 高津亜希子、塩沢丹里 LEGH(lobular endocervical glandular hyperplasia)は悪性腺腫の前駆病変か? 産婦人科の実際 61巻, 1539-1543頁, 2012年(査読なし)
  8. Fuseya C, Horiuchi A, Hayashi A, Suzuki A, Miyamoto T, Hayashi T, Shiozawa T. Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair abnormalities and microsatellite instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis. Hum Pathol. 2012; 43: 1964-72. (査読あり)
  9. Mitsuhashi Y, Horiuchi A, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Shiozawa T. Prognostic significance of Notch signalling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells. Histopathology. 2012; 60: 826-37. (査読あり)
- 〔学会発表〕(計 17 件)
1. 安藤大史、宮本 強、山田 靖、鈴木昭久、浅香亮一、石川香織、小原久典、塩沢丹里 : 卵巣明細胞癌発生に關与する新規候補遺伝子の機能的スクリーニング. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3 日~5 日 横浜
  2. 塩沢丹里 : 1. 子宮頸部嚢胞性病変の取り扱い 2. 子宮内膜癌の発生とエストロゲン. 第 21 回鴨和腫瘍カンファレンス 2013 年 6 月 1 日 京都
  3. Shiozawa T, Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R: Identification of novel genes involved in clear cell carcinogenesis of the ovary using retrovirus-based cDNA expression library. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013 2013 年 4 月 7 日 ワシントン D.C (アメリカ)
  4. 塩沢丹里 : 1. 子宮頸部と嚢胞性病変の取り扱い 2. 子宮内膜癌の発生とエストロゲン. 平成 24 年度山口県産婦人科医会研修会 2012 年 11 月 11 日 山口
  5. Asaka R, Miyamoto T, Suzuki A, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Shiozawa T : Sirtuin1(SIRT1), a longevity gene, is over-expressed in endometrial carcinoma. 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012 年 10 月 13 日~16 日 バンクーバー
  6. Yamada Y, Miyamoto T, Asaka R, Ishikawa K, Kobara H, Suzuki A, Shiozawa T : The expression of lipocalin2 in ovarian carcinoma and endometriosis. 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012 年 10 月 13 日~16 日 バンクーバー
  7. Shiozawa T : Preoperative Differential Diagnosis of Minimal Deviation Adenocarcinoma (MDA) and Lobular Endocervical Glandular Hyperplasia (LEGH) of the Uterine Cervix by Clininopathology and Magnetic Resonance Imaging (MRI) Findings. Asian Society of Gynecologic Oncology 2nd International Workshop in Gynecologic Oncology (ASGO) 2012 年 9 月 28 日 京都
  8. 塩沢丹里 : 子宮頸部嚢胞性病変の取扱. 第 13 回 JSAWI 2012 年 9 月 21~22 日 淡路
  9. 林 琢磨、堀内晶子、塩沢丹里、利根川進、小西郁生 : 子宮平滑筋肉腫の腫瘍細胞浸潤と

血行性転移における、LMP2 の生物学的重要性の関与 . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日 札幌

10. 浅香亮一、宮本 強、石川香織、山田 靖、小原久典、鈴木昭久、塩沢丹里 : 正常内膜および子宮内膜癌における Sirtuin1(SIRT1) の発現と機能の検討 . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日 札幌

11. 石川香織、宮本 強、鈴木昭久、山田 靖、浅香亮一、塩沢丹里 : 子宮内膜癌におけるポリコム遺伝子 mRNA 発現と臨床病理学的意義の検討 . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日 札幌

12 山田 靖、宮本 強、浅香亮一、石川香織、小原久典、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : Lipocalin2 は子宮内膜症から発生する卵巣癌で高発現している . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日 札幌

13 鈴木昭久、宮本 強、小原久典、山田 靖、石川香織、浅香亮一、塩沢丹里 : 卵巣明細胞腺癌におけるレトロウイルス cDNA ライブラリーを用いた機能的スクリーニングの試み . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日 札幌

14 宮本 強、浅香亮一、山田 靖、石川香織、小原久典、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : Lipocalin2 はヌードマウスでの子宮内膜癌細胞の腫瘍増大を促進する . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 ~ 21 日 札幌

15 塩沢丹里 : 子宮頸部嚢胞性病変の診断と治療 . 高水三郡産婦人科医会学術講演会 2012 年 9 月 6 日 中野

16 浅香亮一、宮本 強、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : 正常子宮内膜および子宮内膜癌における sirtuin1 発現の検討 . 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 13 日 ~ 15 日 神戸

17. 宮本 強、浅香亮一、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : Lipocalin2 は紫外線照射後およびシスプラチン処理後の子宮内膜癌細胞の生存を促進する . 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 2012 年 4 月 13 日 ~ 15 日 神戸

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

塩沢 丹里 ( SHIOZAWA, Tanri )

信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 20235493

### (2)研究分担者

宮本 強 ( MIYAMOTO, Tsutomu )

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 70418721

### (3)研究分担者

鹿島 大靖 ( KASHIMA, Hiroyasu )

信州大学・医学部・助教

研究者番号 : 70464089