

## 子宮内膜症性嚢胞由来卵巣癌における PTEN 遺伝子の loss of heterozygosity (LOH), 癌関連遺伝子変異, およびタンパク発現

- 1) 京都府立医科大学大学院女性生涯医科学
- 2) 同・人体病理学
- 3) 京都第一赤十字病院産婦人科

徐 冰<sup>1)</sup>, 北脇 城<sup>1)</sup>, 石原 広章<sup>1)</sup>, 濱田 新七<sup>2)</sup>, 楠木 泉<sup>3)</sup>  
伊藤 良治<sup>3)</sup>, 中田 好則<sup>3)</sup>, 本庄 英雄<sup>1)</sup>

### 緒 言

子宮内膜症は卵巣癌の3.6~28%と比較的高率に合併するのに対して, 子宮内膜症性嚢胞はその0.7~1.6%が悪性転化する[1-3]. しかし, 悪性転化に伴う分子化学的变化はほとんど知られていない. 悪性転化の証明には厳格な基準を満たす必要があるため, 多くの症例数が得られないことも研究を妨げる一因となっている. よって, 研究はほとんど内膜症合併の卵巣癌を用いて行われてきた. しかし, これらの所見は必ずしもそのまま悪性転化に適応することはできない. そこで今回, 悪性転化を証明しえた子宮内膜症性嚢胞由来卵巣癌の同一切片内の良性と悪性の各組織において, 癌関連遺伝子の変異や LOH およびタンパク発現の変化を解析した.

### 対象および方法

症例は卵巣癌5例で, すべて卵巣癌発生前に子宮内膜症性嚢胞の病歴が明らかであり, 病理組織学的に Sampson [4] と Scott [5] による子宮内膜症の悪性転化の診断基準を満たしていた. すなわち, (1) 同側の卵巣に癌組織と子宮内膜症組織が存在すること, (2) 内膜基質に囲まれた腺上皮類似の構造をもつこと, (3) 癌組織が内膜症組織から起こり, 他の癌組織からの浸潤でないこと, そして (4) 顕微鏡的に子宮内膜症組織が癌組織と連続することである.

同一切片内で, 内膜症, 移行部および癌の各組織をマイクロダイセクションにより切り出し

た. 抽出した DNA より目的の遺伝子を nested PCR により増幅し, 塩基配列を解析した. 蛍光ラベルしたマイクロサテライト・マーカーを用いてキャピラリー電気泳動により LOH を解析した. 免疫組織染色はストレプトアビジン—ビオチン法によった. 研究は倫理委員会の承認を得て行った.

### 成 績

#### 1 突然変異

癌関連遺伝子 PTEN, TP53 と K-ras の突然変異を分析した. PTEN 遺伝子のエクソン 2-8 のうち, 1 例の癌病変のみにおいてエクソン 2 のセンス変異が検出された. しかし, 内膜症と移行部には検出されなかった. また, 全例において TP53 (エクソン 5-11) と K-ras (エクソン 2, 3) の変異が認められなかった.

#### 2 LOH

13種類のマイクロサテライト・マーカーを用いて LOH を分析したところ, 2種類の LOH パターンが検出された. パターン I は, 癌においてのみ LOH が検出され, 子宮内膜症や移行部では認められなかった. パターン II は, 同じ LOH が癌, 移行部, 子宮内膜症, 間質組織のいずれにおいても検出された. 9, 10 と 13 番染色体に対するマーカーを用いて, 11 の LOH イベントが確認された. PTEN 遺伝子近傍の 4 種のマーカーのうち, 2 例にパターン I の LOH が認められた. 1 例にパターン II の LOH が認

められた。p16遺伝子近傍の4種のマーカーのうち2種類のマーカーで、3例にLOHが認められた。13番染色体のマーカーで、3例でLOHが認められた。しかし、LOHは、5, 6, 17番染色体には認められなかった。

### 3 タンパク発現

アロマターゼは3例において内膜症で強く、移行部でやや弱く、癌では弱いか欠如した。しかし、1例では逆に癌でもっとも強かった。一方、ステロイド・レセプターであるER $\alpha$ , ER $\beta$ , PgR, アポトーシス関連のFas, Fas-ligand, Bax, Bcl-2, そして癌関連のPTEN, p53, p16, hMLH1の染色性は、全例で内膜症、移行部、癌の間に差がなかった。

### 考 察

今回使用した5症例は、病歴が明らかで、病理組織学的にSampson [4] とScott [5] の診断基準を満たしていることより、卵巣チョコレート嚢胞より悪性転化した卵巣癌と考えられた。われわれは、子宮内膜症の悪性転化の過程における機能的変化を検討するために、まず癌抑制遺伝子の変異を検討した。PTEN, TP53とK-rasの変異がさまざまなヒト癌で同定されており、これらの遺伝子の不活が卵巣癌の発生や進行に関与することが示されている。これらの遺伝子の突然変異に関する総合的な情報を得るために、われわれはそれらの既報告のホットスポットだけではなく、TP53のエクソン5-11, PTENのエクソン2-8とK-rasのエクソン2-3を調べた。しかし、1例の癌組織で、PTEN遺伝子の2カ所の点変異が検出され、内膜症と移行部には検出されなかった。全例においてTP53とK-rasの変異は認められなかった。これらのことから、これらの遺伝子の突然変異が子宮内膜症の悪性転化において、重要な役割を担ってはいない可能性を示唆された。

次に、われわれは13種類のマイクロサテライト・マーカーを用いてLOHを分析した。これらのマーカーがPTEN, p16やp53遺伝子の近傍に位置して、未知の遺伝子の近傍に位置する可能性があるため、われわれはこれらのマーカー

を選択し、パターンIとIIの2種類のLOHの発現パターンを検出した。PTEN遺伝子の近傍に位置しているマーカーで、5つのLOHイベントを検出した。これは、卵巣癌において10q23領域で27.3~43%のLOHイベントが検出されたことを支持している [6, 7]。また、われわれはp16遺伝子の近傍に位置しているマーカーで、3つのLOHイベントを検出した。この領域のLOHが重要なことも示されている [8, 9]。

次に、悪性転化に伴うタンパクの発現変化を免疫組織化学的に評価した。興味深いことに、アロマターゼだけは内膜症と癌の間で異なる染色性を示した。これはわれわれの以前の研究と一致している [10]。免疫染色パターンと臨床病理学的因子との関係はみられなかった。この現象は悪性転化に伴う細胞の分化の変化に起因するものと推測される。一方、他のタンパクの染色性は全例で組織間に差がなかった。しかし、このことは必ずしもこれらの遺伝子の発現変化が関与が少ないことを意味するものではない。

結論として、今回子宮内膜症性嚢胞由来卵巣癌において、遺伝子変異, LOHおよびタンパク発現に対する最初の系統的な解析を行った。その結果、比較的高い頻度でLOHイベントが存在することが判明した。このことが悪性転化の過程で、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後症例数を追加することにより、その機序に関するさらなる理解が得られることと期待される。

### 文 献

- [1] Seidman JD. Prognostic importance of hyperplasia and atypia in endometriosis. *Int J Gynecol Pathol* 1996; 15: 1-9
- [2] Nishida M et al. Malignant transformation of ovarian endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50(Suppl 1): 18-25
- [3] Kobayashi H et al. Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 37-43
- [4] Sampson JA. Endometrial carcinoma of the ovary, arising in endometrial tissue in that organ. *Arch Surg* 1925; 10: 1-72

- [5] Scott RB. Malignant changes in endometriosis .  
Obstet Gynecol 1953 ; 2 : 283-289
- [6] Sato N et al. Loss of heterozygosity on 10q23.3  
and mutation of the tumor suppressor gene  
PTEN in benign endometrial cyst of the ovary :  
possible sequence progression from benign en-  
dometrial cyst to endometrioid carcinoma and  
clear cell carcinoma of the ovary. Cancer Res  
2000 ; 60 : 7052-7056
- [7] Obata K et al. Common genetic changes be-  
tween endometriosis and ovarian cancer. Gynecol  
Obstet Invest 2000 ; 50 Suppl 1 : 39-43
- [8] Jiang X et al. Microsatellite analysis of en-  
dometriosis reveals loss of heterozygosity at can-  
didate ovarian tumor suppressor gene loci. Can-  
cer Res 1996 ; 56 : 3534-3539
- [9] Jiang X et al. Allelotyping of endometriosis with  
adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a  
common lineage. Cancer Res 1998 ; 58 : 1707-  
1712
- [10] Kusuki I et al. Immunohistochemical localization  
of aromatase and apoptosis-associated proteins in  
ovarian serous cystadenocarcinoma arising from  
ovarian endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Re-  
prod Biol 2001 ; 98 : 114-118