

本研究の化学療法に対する反応性評価に、CA125 を含む腫瘍マーカーの血清レベルは用いなかった。

進行期間は、初回手術日から癌が再発・進行した日までの期間、と定義した。生存期間は、初回手術日から死亡または最後に診察した日までの期間、と定義した。患者の生存率の算出には、 Kaplan-Meier法を用いた。各集団の生存率の意義については、一般的なウィルコクソン検定と log-rank 検定を用いて確認した。統計学的分析には、データ評価の為に χ^2 検定とシュートメントの t 検定を使用した。p 値 < 0.05 は、統計学的に有意であると判断した。データ分析には、The Stat View software ver.5.0(SAS Institution Inc., Cary, NC, USA) が用いられた。

C 研究結果

CPT-P 療法を用いた 46 例と TP 療法を用いた 126 例を、今回のコホート調査に使用した。TP 群は、パクリタキセルとカルボプラチンで治療された 118 例と、パクリタキセルとシスプラチンで治療された 8 例から構成された。CPT-P 群と TP 群の間で、中央値年齢・performance status (PS)・FIGO 病期・腫瘍縮小手術 (残存腫瘍の直径 < 1cm) を受けた患者率・追跡期間に有意差はなかった。全例の中央値年齢は 53 歳 (27 歳~75 歳)。CPT-P 群は、I 期が 24 例 (52%)、II 期は 6 名 (13%)、III 期が 13 例 (28%)、IV 期が 3 例 (6%) で構成された。TP 群は、I 期が 72 例 (56%)、II 期が 15

例 (12%)、III 期が 34 例 (27%)、IV 期が 5 例 (4%) で構成された。腫瘍縮小手術 (残存癌直径 < 1cm) を受けた症例は、CPT-P 群の 83% (39/46)、TP 群の 83% (104/126) であった。腫瘍縮小手術 (残存腫瘍の直径 < 1cm) を受けた症例は、II 期が 6 例、III 期が 7 例、IV 期が 2 例 (CPT-P 群) と、II 期が 14 例、III 期が 16 例、IV 期が 2 例 (TP 群) であった。追跡期間の中央値は、CPT-P 集団で 28 ヶ月、TP 群で 27 ヶ月であった。

また、CPT-P 療法を受けた全症例を副作用の点からも評価した。CPT-P 療法を受けた 46 例のうち、35 例は 50mg/m² シスプラチンと 60mg/m² CPT-11 によって、7 例は 60mg/m² シスプラチンと 60mg/m² CPT-11 によって、4 例は 50mg/m² シスプラチンと 50mg/m² CPT-11 によって、各々治療された。主要な毒性は好中球減少症と下痢であった。グレード 3 と 4 の好中球減少症の発生頻度は、それぞれ 22%・7% であった。グレード 3 の悪心とグレード 3 の下痢は、全症例のそれぞれ 4% と 9% に認められた。CPT-11 は、副作用の影響で、8 日目と 15 日目に 12 名 (26%) で投与中止された。また、10 名 (22%) の症例で、CPT-11 が 20% 減量された。

有効性評価は、腫瘍縮小手術 (残存腫瘍直径 \geq 1cm) を受けた症例 (TP 療法 22 例と CPT-P 療法 7 例) で行われた。TP 療法例は、各々、CR1 例 (5%)、PR6 例 (27%)、SD3 例 (14%) PD12 例 (55%) であり、CPT-P 療法例は、

PR3 例 (43%)、SD2 例 (29%)、PD2 例 (29%) であった。TP22 例中 7 例 (32%) と CPT-P7 例中 3 例 (43%) で反応が見られた。PD 以外の症例の割合は、各々 CPT-P の 71% (7 例中 5 例)、TP の 45% (22 例中 10 例) であった。

I 期癌中の 2 年間無病生存率と全生存率は、CPT-P のそれぞれ 77% と 92%、TP のそれぞれ 78% と 94% であり有意差はなかった。腫瘍縮小手術 (残存腫瘍直径 $\geq 1\text{cm}$) を受けた患者は、CPT-P 集団のうち 7 例と、TP のうち 22 例であった。腫瘍縮小手術 (残存腫瘍直径 $\geq 1\text{cm}$) を受けた患者中の、生存期間中央値は、CPT-P で 10 ヶ月、TP 集団で 12 ヶ月で、無増悪生存と、全期間生存に有意差は見られなかった。II~IV 期の癌の中で、初回腫瘍縮小手術が残存腫瘍直径 $< 1\text{cm}$ であった症例は、CPT-P22 例中 15 例 (68%)、TP の 54 例中 32 例 (59%) であった。腫瘍縮小手術 (残存腫瘍直径 $< 1\text{cm}$) を受けた症例中、CPT-P では、残存腫瘍が全くない例が 10 例 (67%)、残存腫瘍の直径 $< 1\text{cm}$ の例が 5 例 (33%) あり、TP では、残存腫瘍が全くない例が 24 例 (75%)、残存腫瘍の直径 $< 1\text{cm}$ の例が 8 例 (25%) であった。CPT-P と TP の間で、初回腫瘍縮小手術を受けた患者の残存腫瘍直径に有意差はなかった。

腫瘍縮小手術 (残存腫瘍直径 $< 1\text{cm}$) を受けた II~IV 期中の無増悪生存率は、TP よりも CPT-P で有意に高かった ($p=0.03$)。2 年間無増悪生存

率は、CPT-P で 86%、TP で 44% であった。無増悪生存期間の中央値は、TP で 15 ヶ月であった。2 群間で、腫瘍縮小手術 (残存腫瘍直径 $< 1\text{cm}$) を受けた II~IV 期の症例の全生存期間に有意差はなかった。腫瘍縮小手術 (残存腫瘍直径 $< 1\text{cm}$) を受けた II~IV 期腫瘍において、2 つの条件 (残存腫瘍直径 $< 1\text{cm}$ 、パクリタキセル・プラチナ製剤) が、無増悪生存率に対する独立した予後因子であることが多変量分析の結果明らかになった。また、年齢・活動状態・FIGO 病期は有意な予後因子ではなかった。

D 総括

以前の研究で、卵巣癌への CPT-P 療法 (1 日目に $70\text{mg}/\text{m}^2$ シスプラチンを投与、1・8・15 日目に $60\text{mg}/\text{m}^2$ の塩酸イリノテカンを投与) を行った際、グレード 3 以上の副作用は、好中球減少症が 52~70%、下痢が 4~10% でみられた。また、 $60\text{mg}/\text{m}^2$ シスプラチンと $60\text{mg}/\text{m}^2$ 塩酸イリノテカンを用いた、日本の肺癌症例に対する大規模臨床試験では、本研究と比較して、グレード 3~4 の副作用がより多く現れた。グレード 3~4 の副作用の発生頻度が本研究で低いのは、比較的 low 用量 ($50\text{mg}/\text{m}^2$) の塩酸イリノテカン投与症例が大多数を占めていた為であろう。UGTs (UDP-グルクロン酸転移酵素) 中の SNPs (Single nucleotide polymorphisms) 多様性が、塩酸イリノテカンで治療された症例間の副作用発現の原因と推測される。

また、特定の遺伝子中の SNPs の多様性が、疾患特異的な中毒症状の原因と思われる。今回の研究で最も頻発したグレード3～4の副作用は、全症例の28%で報告された好中球減少症であった。しかし、その症状は、全症例で寛解された。また、グレード3以上の下痢は、4例(9%)の症例で報告され、その症状は保存的治療によって回復した。このことから、CPT-P療法は比較的安全でCCC症例への第一選択の化学療法として検討する価値があると示唆された。卵巣の明細胞癌(CCC)は、従来のプラチナ化学療法に感受性がないと思われてきた。TP療法は、現在卵巣上皮癌に対する‘Gold standard’療法として確立されており、この療法は、卵巣癌の全組織型に対して広く使われている。完全な外科的処置を受けたI期CCCとIII・IV期CCCに対するTP療法は、プラチナ製剤による化学療法よりも大きく生存へ寄与すると、幾つかの調査報告があった。しかし、早期・進行期症例で、従来のプラチナ製剤による化学療法と比較して、TP療法の生存率への寄与に有意差は見られなかった事が、完全な外科的処置を受けた254名の症例を対象とした最近の研究の結果明らかになった。今までの所、CCCに対する標準的療法が確立された抗腫瘍薬は存在しない。分子学的側面から、CCCは他の組織型の癌とは全く異なる種類の癌として認識されている。これらの分子学的特徴から、他のアプローチが卵巣CCCの治療に対して必要であ

ると言えるだろう。

当初、プラチナ製剤に抵抗性を示す卵巣癌の治療に導入されたCPT-P療法は、CCCに対する化学療法の第一選択としてまずまずの成果を挙げた。In Vitro研究では、塩酸イリノテカンは、パクリタキセルと同じく、CCCに対する抗腫瘍薬となりうるという事が示唆された。本研究では、CPT-Pの反応率とTPの反応率はほぼ同じという結果であった。腫瘍縮小手術(残存腫瘍直径<1cm)を受けたII～IV期癌の無進行生存率が比較的良好であった事は、“癌を休止させる”結果であるSD症例がCPT-P療法で高頻度となった事から説明できるだろう。多変量分析の結果、CPT-P療法は、無残存腫瘍と同様に有益な予後因子としても確認された。副作用の点からも、CPT-P療法が卵巣CCCに対する治療として十分に有用であるといえる。塩酸イリノテカンは、マイトマイシンCと併用されるアジュバントとして、従来のプラチナ療法よりも高い活性を持っている事が示された。また、塩酸イリノテカンを含む多剤化学療法は、卵巣CCCに対して抗癌作用を持つ可能性があるとし唆された。卵巣CCCは、特有の臨床症状と共に特有の分子学的特徴を持つという事が報告されている。肝細胞核因子-1B(hnf-1B)やATP結合カセット遺伝子スーパーファミリー(ATP-binding cassette)(ABC)の1種であるABCF2のような、CCC特異的な分子マーカーを標的とする治療が、卵巣CCCの

治療に対する新たな戦略となるだろう。CPT-P 療法は、有効性を示す治療候補となるであろうが、これらの結果を立証する為には、大規模前向き調査が必要である。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし

F. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定含）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（臨床研究基盤整備推進研究事業）
分担研究報告書

境界悪性卵巣上皮性腫瘍の再発危険因子の解析

実施チーム a 組 八重樫伸生、徳永英樹、庄子美紀子

研究協力者 高野忠夫、吉永浩介

研究要旨

境界悪性卵巣上皮性腫瘍の長期予後を調査し、再発に対する危険因子を解析した。東北地方の医療施設で 1994～2003 年の間に治療された 121 例の境界悪性卵巣上皮性腫瘍について、臨床進行期・病理組織型・手術術式・術後化学療法・再発の有無・予後などを調査した。追跡期間中央値は 57 ヶ月（1～126 ヶ月）。I 期が 109 例（90.6%）で大多数を占めていた。病理組織型は粘液性 91 例（75.2%）、漿液性 27 例（22.3%）、類内膜性 3 例であった。保存的手術は 53 例（43.8%）、根治的手術が 68 例（56.2%）に対して施行された。術後アジュバント化学療法は 30 例（24.8%）に対して行われた。8 例で再発が認められたが、それが原因で死亡した例は報告されなかった。臨床進行期による無病生存期に有意差は見られなかった。しかし、漿液性と非漿液性（粘液性・類内膜）との比較では、無病生存率に有意差が見られた（ $p < 0.05$ ）。10 年無病生存率は、根治的手術を施行された群では 89.1%、保存的手術を施行された群では 57.4%であり、有意差が見られた（ $p < 0.05$ ）。保存的手術施行群の、再発に対する独立危険因子は、卵巣腫瘍摘出術と漿液性であった。再発の報告はあったが、境界悪性腫瘍の長期予後は良好であった。保存的手術は、良好な予後を期待して、非漿液性で子宮附属器摘出術を容認できる場合に限り選択できる。しかし、漿液性で卵巣腫瘍摘出術を施行された症例では、再発リスクが 2～4 倍に上昇するという点に、特に注意する必要がある。

A 研究目的

Taylor (1929) は、卵巣癌の一種が臨床的に良性と悪性の中間の病態を示す事を発見し、それらを semi-malignant と定義した。FIGO (International Federation of

Gynecology and Obstetrics) は、1971 年にこの概念を ‘carcinoma of low malignant potential’ として、また世界保健機構 (WHO) は ‘borderline tumour’ として、組織学的診断基準が提案された 1973 年に、正式に導入

した。境界悪性卵巣上皮性腫瘍の概念は、臨床的な特徴をもつ癌について組織学的に定義されたものである。境界悪性卵巣上皮性腫瘍の特徴と悪性度に関して蓄積された経験と知識をもとに、再分類と再定義が試みられ (Seidman and Kurman, 1996)、新しい予後因子が提案された (de Nictolis et al, 1992, Gershenson et al, 1999)。現在、予後因子に関しては多くの対立した報告があり、論争中である。症例が比較的若い場合 (Harris et al, 1992)、生殖能力を残す事が有益であるとして、その方針で数多くの治療が試みられてきた。しかし、再発と予後悪化の報告もあり、より明確な予後因子の決定が必要とされている。境界悪性の概念が導入されてから 30 年以上経ており、境界悪性卵巣上皮性腫瘍の現在の病態を正確に把握する事が重要であると思われる。我々は多角的コーホート調査により、境界悪性卵巣癌の全期間臨床分析を行った。我々の最終目標は、境界悪性卵巣上皮性腫瘍の長期予後を調査する事と、再発に対する危険因子を決定する事である。

B 研究方法

1994 年～2003 年まで、東北地方の 8 施設で治療された上皮性境界悪性卵巣腫瘍 124 例の患者情報を、各施設の情報機関 (データベース) から収集した。Central pathological review を行い病理診断を確認した。FIGO 分類 (1987) によって病期決定された。根治的手術は、両側卵管卵巣摘出術を伴

う、子宮摘出術と定義された。保存的手術は子宮と一側、または両側の卵巣を温存する手術と定義された。保存的手術手技として、卵巣腫瘍摘出術か、子宮附属器摘出術が施行された。腹膜細胞診は、両手術手技施行中に計画的に行われた。今回の研究の外科的病期決定 (surgical staging) は、腹膜細胞診、大網切除術・骨盤リンパ節郭清術・腹部大動脈リンパ節生検の有無・によって決定された。アジュバント化学療法の可能性を考慮し、進行癌の全症例・Ic 期の全症例・卵巣腫瘍摘出術後に腫瘍残存の可能性のある全症例は、この研究の初期にプラチナ製剤による治療を受けた。したがって、化学療法は進行癌の可能性のある患者にのみ行われた。

疾患特異的な独立再発因子の評価は、logistic regression 解析、生存率についてはカプラン・マイヤー法を用いて算出された。生存曲線の比較は、ウィルコクソン帰納法を用いて行われた。統計上有意かの判断は、 $p < 0.05$ を基準とした。追跡を行えなくなった患者情報は、検閲して削除された。患者疾患の特徴・治療方法・再発・予後に関する詳細な情報は、医療記録から引用された。我々は、そのコーホートの性質から、この研究に対する施設内倫理委員会承認を請求しなかった。

C 研究結果

患者年齢の中央値は、43 歳 (15～76)。51 例 (42.1%) は 40 歳以下であり、29 例 (24.0%) は 60 歳以上で

あった。追跡期間は 1~126 ヶ月と様々であり、中央値は 57 ヶ月であった。109 例 (90.6%) が I 期癌であり、2 例が II 期、9 例が III 期・IV 期であった。組織型は、粘液性 (91 例;75.2%)・漿液性 (27 例;22.3%) であった。類内膜はわずか 3 例 (2.5%) であった。粘液性境界悪性腫瘍の中で、腸上皮型は 75 例 (82.4%) で、内頸型は 16 例であった。根治的治療は 68 例 (56.2%) に対して行われ、保存的治療は 53 例 (43.8%) に対して行われた。完全な外科的進行期決定は 43 例 (35.5%) に対して行われた。アジュバント化学療法は、30 例 (24.8%) に対して行われた。17 例は追跡を断念した。また、2 例は他の疾患が原因で死亡した。4 例は腹膜偽粘液腫をもつ粘液性腫瘍であり、今回の研究から除外した。最終的に臨床経過と予後因子を評価した 102 例中 8 例で再発が見られたが、それが死因となった例は 1 例もなかった。

再発までの期間中央値は、46 ヶ月 ± 33 ヶ月 (14~107 ヶ月) であった。5・10 年無病生存率は、それぞれ、91.7%・69.2% であった。II~IV 期癌の 5・7 年無病生存率は、それぞれ、100%・67.7% であった。粘液性の 10 年無病生存率は 91.5%、漿液性のそれは 36.0% であった。各臨床病期間で無病生存率に有意差は認められなかったけれども、漿液性と非漿液性 (粘液性・類内膜) では、無病生存率に有意差が認められた。一方、根治的手術を行った群の 10 年無病生存率は 89.1%

で、保存的手術を行った群では 57.4% で、有意差があった。単変量解析によって、漿液性と保存的手術が疾患の再発に影響を与える重要な因子である事が明らかになった。再発頻度と、臨床病期・開腹手術により決定された病期 (staging laparotomy)・術後アジュバント化学療法との間に関連はみられなかった。多変量解析では、保存的手術のみが癌再発に関係する独立した予後決定因子であるという事が明らかになった (ハザード比 2.2, 95% 信頼区間 0.02-0.52)。その次に、保存的手術を行った 43 例で再発の危険因子を評価した。これらの患者のうち 6 例で再発した。卵巣腫瘍摘出術を受けた 8 例中 3 例と、子宮附属器摘出術を受けた 35 例中 3 例に癌の再発がみられた。漿液性腫瘍症例は、非漿液性腫瘍症例よりも高い頻度で再発した。保存的手術集団間の再発頻度と、臨床病期・開腹手術での病期決定・アジュバント化学療法などの間に、相関関係はみられなかった。多変量解析によって、卵巣腫瘍摘出術と漿液性が、保存的手術症例の癌再発危険因子として立証された。漿液性腫瘍をもち卵巣腫瘍摘出術を受けた患者の再発危険指数は、非漿液性腫瘍をもち子宮附属器摘出術を受けた患者よりも 4.33 倍高かった。再発した 8 例のうち、再発癌の進行が原因で死亡した例はなかった。再発した 4 例の漿液性腫瘍のうち 3 例は、腹膜に non-invasive implant があり、その中の 1 例は漿液性腺癌の再発と診断された。この例では、卵巣腫瘍

摘出術後 107 ヶ月で、反対側の卵巣に腺癌が発症した。再発した粘液性腫瘍はすべて腸上皮型であった。初期手術を保存的に行って再発した全患者は、二次手術後再発しなかった。

D 考察

I 期の 5 年生存率は 95~97%であり、II・III期では 65~87%であると示されており、境界悪性卵巣上皮性腫瘍の予後は、癌の卵巣外進展に左右されると示唆されている。加えて、臨床病期・組織型・残存腫瘍が予後因子に含まれているが、手術方法は予後因子とみなされなかった。今回の研究結果は、疾患の病期と病理組織型のどちらも長期予後との関連はないが、保存的手術を行った例で無病生存率が有意に低いというものであった。手術手技は再発に対する独立危険因子となり、その危険は根治的手術によって減少させる事ができると立証された。若い女性ほど、悪性腫瘍より境界悪性腫瘍が高頻度にみられるため、卵巣境界悪性腫瘍に対して保存的手術を実施することが妥当かどうかは、解決すべき重要な問題である。Zanetta ら (2001) は、以下の事を報告した。根治的手術を行った 119 例の I 期癌で、3 例 (2.5%) に再発がみられた。一方、保存的手術を行った 164 例の I 期癌では 20 例 (12.1%) に再発がみられた。そのうち 1 例は再発が原因で死亡した。また、Morice ら (2001) は、II・III期を含む再発例の大多数は 2 次手術によって完全に治療され、死亡し

た症例はほとんどみられなかった、と報告した。さらに、Donnez ら (2003) は、再発は保存的手術で治療された症例 (16 例中 3 例・18.7%) の方が、根治的手術例 (59 例中 0 例・0%) より多くみられるけれども、2 次手術の結果、癌関連で死亡した例はおらず、保存的手術例の 63.6%はその後妊娠したと報告した。保存的手術は、出産を希望する若い年齢の境界悪性卵巣腫瘍の治療にとって選択肢の一つとなりうる事が、この点からも示唆される。しかし、再発の結果死亡した全症例は、保存的手術によって治療された症例であった、という事も報告されており、保存的手術後の再発に対する潜在的危険因子を調査する事は重要である。卵巣腫瘍摘出術と漿液性腫瘍は、保存的手術を受けた患者の再発に対する独立危険因子である。また、卵巣腫瘍摘出術後の再発は、必ずしも同側に発症するわけではないと言われており、卵巣腫瘍摘出術後の残存腫瘍は、再発を単独で招くと考えられる。従って、もし癌の病状が原因で外科的手技が制限されないなら、妊娠を希望する若い女性の選択肢の 1 つとして卵巣腫瘍摘出術が選択される事は合理的であろう。今回の研究は、病理組織の相違が再発リスクに影響を与えるという事を示した。保存的手術の行われた漿液性腫瘍で有意に再発する可能性が高い事が明らかになり、その再発リスクは非漿液性腫瘍を子宮附属器摘出術で治療した場合よりも、およそ 4 倍高かった。

卵巣境界悪性漿液性腫瘍の予後因子として、invasive implant の概念が注目を集めている。卵巣境界悪性漿液性腫瘍の予後を評価する目的で、手術時に診察され腹膜生検されるべきである。臨床病期は、卵巣境界悪性腫瘍の最も重要な予後因子の1つであり、精密な外科的病期決定は、外科手術後の治療を決定する事と同様に、保存的手術後の治療にとっても必須のものである。Winter ら (2002) は、完全な外科的病期決定を行った 48 例と、外科的病期決定を行わなかった 45 例を比較した。外科的病期決定を行った症例の 17% (48 例中 8 例) で、より高い病期が発見された。しかし、両群間で、再発率と生存率に有意差はみられなかった。Camatte ら (2002) は、症例の 19% (42 例中 8 例) でリンパ節転移を発見した。転移のあった全例は、腹膜転移と関連の深い卵巣境界悪性漿液性腫瘍でみられたが、死亡した例は 1 例もなかった。転移のみられなかった症例と比較しても予後に有意差はなかった。腹膜病巣の有無は、重要な予後因子であると同時に、重要な再発危険因子でもある。そして我々は、検査可能例での腹腔の外科的病期決定の重要性を強く主張する。しかし、リンパ節転移の有無は卵巣境界悪性腫瘍の予後と関連しないと、多くの報告で指摘されており、生検を行うかどうか、リンパ節の精密な診察を行うかどうかについては、未だに論争中である。今研究では再発リスクと有意に関連のある因子を明らかにできなかつ

た。今回の研究の限界点は、全例で外科的病期決定が前もって考慮されていた訳ではなかったという点である。外科的病期決定の有用性を立証する為の次の研究としては、保存的手術後の卵巣境界悪性漿液性腫瘍の再発リスクを調査することである。したがって、再発の危険性を十分に説明した後に、本当に必要とする症例にのみ保存的手術を行うという事は重要である。

シスプラチンによる化学療法が肉眼的病変をもつ 23 例の進行期症例のうち 6 例 (26%) で、また、顕微鏡的病変をもつ 25 例のうち 17 例 (68%) で、病巣を完全に消失させた。アジュバント化学療法は、予後延長効果は明確でないけれども、治療の選択肢の 1 つとして考慮できる。一方、施設間で化学療法の使用法や頻度が異なっていたとはいえ、外科手術後のアジュバント化学療法の有無と再発頻度との間に関連は見られなかった。Kaern ら (1993) は、アジュバント化学療法は、残存腫瘍の無い 364 例の無再発生存率も全期間生存率も向上させなかった事を明らかにした。卵巣外進展を伴うⅡ期とⅢ期の卵巣境界悪性漿液性腫瘍 80 例では、アジュバント化学療法を施行しても生存率は向上しなかったという報告もある。そして、死亡例の比較では、癌の種類・性状よりも治療とより深い関連があった。このように、境界悪性卵巣腫瘍に対する化学療法の効果はまだ立証されていない。

E 結論

追跡調査を行った境界悪性卵巣腫瘍102例のうち8例で再発が認められたが、それが原因で死亡した症例はなく、長期予後は良好であった。再発の相対的なリスクは高いが、良好な予後を考慮すると、保存的手術は妊娠可能性を保つ目的で施行する価値がある。保存的手術を検討する場合、卵巣腫瘍摘出術施行時や卵巣境界悪性漿液性腫瘍の時、特別な注意を払う必要がある。今回の研究結果をより効果的にする為に、多施設による大規模前向き臨床研究が計画される事を期待する。

F 健康危険情報

特記すべきことなし

G 研究発表

1. 論文発表
投稿中
2. 学会発表
なし

H 知的財産権の出願・登録状況（予定含）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（臨床研究基盤整備推進研究事業）
分担研究報告書

卵巣癌における ABCF2 蛋白の発現と薬剤感受性に関する研究

実施チーム a 組 八重樫伸生、徳永英樹、庄子美紀子

実施チーム b 組 石岡千加史、坂本康寛、嶺岸明美、大宮恵美

研究協力者 伊藤潔、鴨川由起子

研究要旨

卵巣腺癌の ABCF2 タンパク発現を調べた。さらに、卵巣以外の臓器における、明細胞腺癌中の ABCF2 発現を調べた。この研究には、335 例の卵巣上皮癌・23 例の子宮体部の明細胞腺癌・34 例の腎臓明細胞腺癌が用いられた。ABCF2 タンパク発現は、免疫組織化学によって決定された。その結果、細胞形質の ABCF2 の発現量は、卵巣の明細胞腺癌標本で他の組織型と比べて有意に高かった。核の ABCF2 の発現量と卵巣明細胞腺癌を持つ患者の年齢には密接な関連があった。細胞質中の ABCF2 発現量と、明細胞型との間に関連があるという事が、多変量解析によっても証明された。加えて、腎臓の明細胞腺癌の ABCF2 発現量と比較して、卵巣と子宮体部の明細胞腺癌でかなり高い ABCF2 発現がみられた。これらのデータから、ABCF2 タンパクが卵巣や子宮体部の明細胞腺癌のマーカーとなる可能性があり、ABCF2 タンパクが卵巣や子宮体部の明細胞腺癌の発生にとって重要であるという事が示唆される。ABCF タンパク発現は卵巣漿液性腺癌より明細胞腺癌の方が高値であり、その発現は、明細胞腺癌への化学療法の効果と相関があった。

A 研究目的

化学療法の薬剤耐性は、癌治療に対する主要な障害の1つである。化学療法の感受性は、たとえ同じ組織由来であったとしても、癌の組織型やグレード等の病理学的所見と一般的に関連がある。例えば、卵巣癌は、5つの主要な組織型に分類されるが、その中でも卵巣明細胞腺癌は他の組織型よりも、

全身投与による化学療法に対して抵抗性があり予後は悪い。以前我々は、ABCF2 タンパク発現が漿液型より明細胞型で高値となり、その発現は卵巣明細胞腺癌への化学療法に対する効果と関連がある、という事を報告した。本研究では、卵巣粘液製腺癌・類内膜腺癌・低分化型の ABCF2 タンパク発現について検討し、明細胞腺癌と漿液

性腺癌の発現と比較した。さらに本研究では、ABCF2 タンパク発現差から、卵巣・子宮体部・腎臓の明細胞腺癌を識別できるかについて検討した。

B 研究方法

1) 臨床検体

335 例の卵巣上皮癌と 23 例の子宮体部の明細胞癌と 34 例の腎臓明細胞癌を用いた。卵巣癌患者の年齢中央値は 54 才(22~85 才)。卵巣癌の内訳は、102 例の漿液型腺癌・50 例の粘液型腺癌・76 例の明細胞腺癌・74 例の類内膜腺癌と 33 例の低分化型腺癌であった。子宮体部と腎臓の明細胞腺癌を持つ患者の年齢中央値は、それぞれ 62 才(48~83 才)と 65 才(30~86 才)である。検体を使用にあたり、患者から文書で説明し同意を得た。また本研究を開始するに当たり東北大学病院 I R B の承認を得た。

2) 免疫組織化学

ABCF2 タンパクの免疫学的局在検査は、精製された全長 ABCF2 癒合タンパクをウサギの中に注入する事によって生成された、多クローン性抗 ABCF2 抗体を使って行われた。組織断片(4 μ m)を、ガラススライドに添付し、ワックスを除去し、加水した。その後、内因性過酸化酵素(ペルオキシダーゼ)活性を失活させるために、その断片を、室温で 10 分間、3%過酸化水素で培養した。その断片と ABCF2 抗体(\times 5000)を 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。全タンパクに対するペルオキシダーゼ活性は、0.05%過酸化水素を含むジアミ

ノベンチジン色原体を室温で2~10分間反応させて確認した。その後、その断片はヘマトキシリンによって対比染色された。その結果は、患者の臨床経過を知らされていない2人の独立した病理学者によって判定された。最低1,000個の癌細胞で核内 ABCF2 タンパクが確認されたものを陽性とした。ABCF2 の程度は陽性核染色された細胞の比率を基に計算された。ABCF2 により細胞形質が着色された集団も、陽性と陰性とに分類した。ABCF2 発現が陽性か陰性か確認されている卵巣上皮癌のスライドは、各々陽性・陰性のコントロールとして使用された。

3) 統計・分析

t テストと χ^2 テストを用いて、ABCF2 発現と年齢と臨床経過と組織型との関連を分析した。Ryan 法で、卵巣癌の各組織型集団の細胞質 ABCF2 発現差を分析した。ターキー・クラマーテストによる分散(平方偏差)の 1-way 分析によって、卵巣癌の各組織型集団の核内 ABCF2 発現差を解析した。ある重要な結果が、他の変動する要素(年齢・臨床経過・組織型・組織悪性度)によっても説明できるかを決定する為に、multivariate logistic regression model か、multivariate regression model に従って行った。 t テストと χ^2 テストを用いて、卵巣と子宮内膜と腎臓の明細胞腺癌中の、核と細胞質での ABCF2 発現比較を行った。

C 研究結果

1) 卵巣癌中の ABCF2 発現

卵巣癌の全組織型の中で、核内 ABCF2 発現は若い年齢集団（中央値年齢より若い）ほど低かった。しかし、両集団間で、ABCF2 の細胞質中の発現に有意差はみられなかった。核や細胞質中での ABCF2 発現と、臨床経過と組織型との間で特徴的な関連はなかった。核内の ABCF2 発現の Labeling index は、漿液型・粘液型・類内膜型・低分化型腺癌より、明細胞腺癌の方が高い値を示した。細胞質中の ABCF2 発現の頻度は、86.8%（明細胞腺癌）・52.9%（漿液性腺癌）・46.0%（粘液性腺癌）・58.1%（類内膜癌）・70.6%（未分化癌）であり、明細胞腺癌の方が、漿液性腺癌・粘液腺癌・類内膜腺癌より高かった。通常の卵巣上皮では、染色は弱かった。多変量解析により、明細胞組織と細胞質 ABCF2 発現との間に関連がある事が明らかとなった。また、multivariate regression model により、中央値よりも高年齢の明細胞組織と核内 ABCF2 発現との間に深い関連がある事が示された。

2) 卵巣と子宮体部と腎臓の明細胞腺癌中の ABCF2 発現

卵巣と子宮体部の明細胞腺癌の、核内・細胞質内 ABCF2 発現に有意差はみられなかった。しかし、腎臓と比べて卵巣と子宮体部の明細胞腺癌で、細胞質と核の ABCF2 発現値は有意に高かった。ABCF2 発現と卵巣・子宮体部・腎臓の明細胞腺癌の臨床病期との間には、関連はなかった。

D 考察

本研究では、さらに卵巣上皮癌の 5 つの組織型の ABCF2 タンパク発現を調査した。その結果、明細胞癌の ABCF2 発現は、他の組織型よりも有意に高い水準を示した。特に興味深かったのは、両者（明細胞・類内膜型）とも類内膜症に由来すると思われるにも関わらず、卵巣癌の明細胞腺癌と類内膜癌では ABCF2 の発現程度が異なるという点である。卵巣癌の各組織型はそれぞれ異なる病理学的経路を持っており、ABCF2 は各組織型の卵巣癌でそれぞれ異なる役割を果たしているという仮説を、これらの結果は支持するものである。この研究で、我々は ABCF2 が卵巣明細胞癌の 86.8% で発現していた事を示した。さらに、I 期と II 期の明細胞癌の 89.4% で ABCF2 が発現していた事も示した。これらの結果から、ABCF2 が明細胞癌早期発見の為のマーカーとして有用かもしれないという事が示唆される。OC125 の単クローン抗体によって発見された糖タンパクである CA125 は、現在 80% 以上の卵巣癌でその値の上昇がみられ、卵巣癌の優れたマーカーとなっている。しかし、明細胞癌や早期卵巣癌では、CA125 の上昇値は比較的低い。だから、明細胞型の卵巣癌は一般的に、他の組織型と比べて全身投与の化学療法に抵抗性があり、最も予後が悪い。このため、卵巣明細胞癌の早期診断は特に重要である。また、卵巣明細胞癌に対する新しい腫瘍マーカーを発見することには大きな意味がある。明細胞腺癌は、

卵巣と子宮体部と腎臓から発生する。これらの3種類の明細胞癌は病理学的に識別可能である。卵巣と腎臓の明細胞腺癌は化学療法に抵抗性である事がわかっている。明細胞腺癌を臓器別に識別する事ができる分子マーカーはまだ発見されていない。加えて、腎臓明細胞腺癌が化学療法抵抗性を持つ機序は、卵巣や子宮体癌の機序とは異なると思われる。卵巣と子宮体部の明細胞腺癌がミューラー管由来であり、腎臓の明細胞腺癌がウォルフ管由来である事から、機序の違いが説明できるかもしれない。

E 結論

この研究から、ABCF2 タンパクが、卵巣明細胞癌を早期発見するためのマーカーとして有用と考えられた。またミューラー管由来の明細胞癌の病態形成にとって重要と考えられた。

E 研究発表

なし

F 知的財産権の出願・登録状況（予定含）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV 研究成果の刊行に関する一覧表

A 書籍

なし

B 雑誌

Promoter methylation status of the Cyclin D2 gene is associated with poor prognosis in human epithelial ovarian cancer. Sakuma M, Akahira J, Ito K, Niikura H, Moriya T, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N. Cancer Sci. 2007;98:380-6.

Dose escalation study of docetaxel and nedaplatin in patients with relapsed or refractory squamous cell carcinoma of the esophagus pretreated using cisplatin, 5-fluorouracil, and radiation. Yoshioka T, Sakayori M, Kato S, Chiba N, Miyazaki S, Nemoto K, Shibata H, Shimodaira H, Ohtsuka K, Kakudo Y, Sakata Y, Ishioka C. Int J Clin Oncol. 2006;11:454-60.

Adjuvant chemotherapy with irinotecan hydrochloride and cisplatin for clear cell carcinoma of the ovary. Takano M, Kikuchi Y, Yaegashi N, Suzuki M, Tsuda H, Sagae S, Udagawa Y, Kuzuya K, Kigawa J, Takeuchi S, Tsuda H, Moriya T, Sugiyama T. Oncol Rep. 2006;16:1301-6.

Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. Ohori H, Yamakoshi H, Tomizawa M, Shibuya M, Kakudo Y, Takahashi A, Takahashi S, Kato S, Suzuki T, Ishioka C, Iwabuchi Y, Shibata H. Mol Cancer Ther. 2006;5:2563-71.

Differential expression of ABCF2 protein among different histologic types of epithelial ovarian cancer and in clear cell adenocarcinomas of different organs. Nishimura S, Tsuda H, Ito K, Jobo T, Yaegashi N, Inoue T, Sudo T, Berkowitz RS, Mok SC. Hum Pathol. 2007;38:134-9.

Genetic variation in ABCB1 influences paclitaxel pharmacokinetics in Japanese patients with ovarian cancer. Yamaguchi H, Hishinuma T, Endo N, Tsukamoto H, Kishikawa Y, Sato M, Murai Y, Hiratsuka M, Ito K, Okamura C, Yaegashi N, Suzuki N, Tomioka Y, Goto J. Int J Gynecol Cancer. 2006;16:979-85.

O-[(18)F]fluoromethyl-L-tyrosine is a potential tracer for monitoring tumour response to chemotherapy using PET: an initial comparative in vivo study with deoxyglucose and thymidine. Yamaura G, Yoshioka T, Fukuda H, Yamaguchi K, Suzuki M, Furumoto S, Iwata R, Ishioka C. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006;33:1134-9.

Clinical outcome and risk factors for recurrence in borderline ovarian tumours. Yokoyama Y, Moriya T, Takano T, Shoji T, Takahashi O, Nakahara K, Yamada H, Yaegashi N, Okamura K, Izutsu T, Sugiyama T, Tanaka T, Kurachi H, Sato A, Tase T, Mizunuma H. Br J Cancer. 2006;94:1586-91.

Clear cell carcinoma of the ovary: a retrospective multicentre experience of 254 patients with complete surgical staging. Takano M, Kikuchi Y, Yaegashi N, Kuzuya K, Ueki M, Tsuda H, Suzuki M, Kigawa J, Takeuchi S, Tsuda H, Moriya T, Sugiyama T. Br J Cancer. 2006;94:1369-74.

Paclitaxel-platinum combination chemotherapy for advanced or recurrent ovarian clear cell adenocarcinoma: a multicenter trial. Utsunomiya H, Akahira J, Tanno S, Moriya T, Toyoshima M, Niikura H, Ito K, Morimura Y, Watanabe Y, Yaegashi N. Int J Gynecol Cancer. 2006;16:52-6.

V. 研究成果の刊行物・別冊

Promoter methylation status of the Cyclin D2 gene is associated with poor prognosis in human epithelial ovarian cancer

Michiko Sakuma,^{1,3} Jun-ichi Akahira,² Kiyoshi Ito,¹ Hitoshi Niikura,¹ Takuya Moriya,² Kunihiro Okamura,¹ Hironobu Sasano² and Nobuo Yaegashi¹

Departments of ¹Obstetrics and Gynecology, and ²Pathology Tohoku University, Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku Sendai, 980-8574 Japan

(Received March 18, 2006/Revised July 28, 2006/2nd Revised November 10, 2006/Accepted November 18, 2006/Online publication January 15, 2007)

Gene silencing associated with aberrant DNA methylation of promoter CpG islands is one mechanism through which several genes may be inactivated in human cancers. Cyclin D2, a member of the D-type cyclins, implicated in cell cycle regulation, differentiation and malignant transformation, is inactivated due to aberrant DNA methylation in several human cancers. In the present study, we examined the promoter methylation status and expression of Cyclin D2 in human epithelial ovarian cancer, and then determined the relationship between methylation status and various clinicopathological variables. Twelve ovarian cancer cell lines and 71 surgical specimens were examined by methylation-specific polymerase chain reaction and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate the methylation status and expression of the Cyclin D2 gene. The relationship between methylation status and various clinicopathological variables was evaluated using statistical analysis. Aberrant methylation of Cyclin D2 was present in five of 12 ovarian cancer cell lines and 16 of 71 primary ovarian cancer tissues. In five cell lines with methylation, expression of the Cyclin D2 gene tended to be lower than in cell lines without methylation. In ovarian cancer tissues, methylation bands were detected in 16 of 71 cases. The methylation status of Cyclin D2 was associated with advanced stage and a residual tumor size (>2 cm) ($P = 0.027$ and $P = 0.031$, respectively). Based on univariate analysis, patients with aberrant methylation of the Cyclin D2 promoter had a significantly worse chance of disease-free survival than those without methylation ($P = 0.021$). Our results suggest that aberrant promoter methylation of the Cyclin D2 gene is significantly associated with patient prognosis in epithelial ovarian cancer. (*Cancer Sci* 2007; 98: 380–386)

Epithelial ovarian cancer is the most common and deadliest gynecological malignancy in developed countries. Early stages of ovarian cancer are generally asymptomatic and difficult to detect. By the time clinical diagnosis is made, most patients have widespread tumor dissemination.⁽¹⁾ Despite a high response rate to first-line chemotherapy, the prognosis of these women is poor, with an overall 5-year survival rate of only 10–20%.^(1,2)

Epigenetic alterations, changes that affect gene expression but not the gene sequence itself, are believed to be one mechanism by which tumor suppressor genes are inactivated in human cancers.^(3,4) In particular, hypermethylation of cytosine residues in CpG islands leads to heritable gene silencing via the formation of a repressive chromatin structure.^(5,6) Studies of DNA hypermethylation in human ovarian cancer have identified some key genes as targets for epigenetic downregulation, including some hormone receptors,⁽⁷⁾ cytokines, cell signaling intermediates, adhesion molecules,⁽⁸⁾ DNA damage checkpoint genes,⁽⁹⁾ and regulators of the cell cycle.⁽¹⁰⁾ The cell cycle regulators, notably the cyclins, have the potential to function as oncogenes when regulated inappropriately.

The cyclins are a family of proteins that dictate transitions between phases of the cell cycle by regulating the activity of their downstream effectors, the cyclin-dependant kinases (cdk). The D-type cyclins, D1, D2 and D3, play a critical role in early checkpoint regulation of the G₁ phase of the cell cycle. They activate cdk4 and cdk6, leading to the phosphorylation of the retinoblastoma tumor suppressor protein (Rb). This, in turn, dissociates Rb from the transcription factor E2F, thereby permitting DNA transcription. Given the critical role of the D-type cyclins in cell cycle regulation, their abnormal or untimely expression could disrupt the normal cell cycle, resulting in cell proliferation.⁽¹¹⁾ In fact, Cyclin D1 is considered by some to be a putative protooncogene, as it is overexpressed in a number of tumor types, including breast cancer, thyroid carcinoma, stomach cancer and lymphomas.⁽¹²⁾ Aberrant expression of Cyclin D2 has also been demonstrated in human ovarian granulose cell tumors and testicular germ cell tumor cell lines.⁽¹³⁾

Although well known for their proliferation-promoting activity, the D-type cyclins (notably D2) also have growth-inhibitory effects. Cyclin D2 has been shown to be dramatically upregulated under conditions of growth arrest in human and murine fibroblasts. Furthermore, transient overexpression of Cyclin D2 efficiently inhibits cell cycle progression and DNA synthesis. This suggests that an alternative role for Cyclin D2 may be to promote exiting from the cell cycle and maintenance of a non-proliferative state.⁽¹⁴⁾ The expression of Cyclin D2 is frequently lost in human breast cancers, gastric cancers, lung cancers and ovarian granulose cell tumors. This loss of expression is the result of promoter hypermethylation.^(10,15–18)

In the present study, we examined the promoter methylation status and gene expression of Cyclin D2 in human epithelial ovarian cancer cell lines. We also evaluated the correlation between methylation status of the Cyclin D2 promoter and various clinicopathological parameters in patients with epithelial ovarian cancer.

Materials and Methods

Cell lines. Twelve ovarian carcinoma cell lines were used. OVCAR3, SKOV3 (both adenocarcinomas), Caov3, OV90 (both serous adenocarcinoma), TOV21G, ES2 (both clear cell adenocarcinoma) and TOV112D (endometrioid adenocarcinoma) were purchased from American Type Culture Collection. JHOS2, JHOS3, HTOA (all serous adenocarcinoma), OMC3 (mucinous adenocarcinoma) and JHOC5 (clear cell adenocarcinoma) were purchased from Riken Cell Bank (Tsukuba). Cell lines were maintained in DMEM/F12 medium (Invitrogen), supplemented

³To whom correspondence should be addressed.
E-mail: msakuma@mail.tains.tohoku.ac.jp

with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), and incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Surgical specimens and clinical data. The research protocol was approved by the Ethics Committee of Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan. We examined 71 ovarian cancer specimens obtained from patients treated between 1988 and 2002 at Tohoku University Hospital, Sendai, Japan. All specimens were retrieved from the surgical pathology files at Tohoku University Hospital. Informed consent was obtained from each patient. Specimens were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Patient age, performance status on admission, histology, stage, grade, residual tumor after primary surgery, and overall survival were obtained from a chart review. The median follow-up time for patients was 59 months (range, 4–120 months). Performance status was defined according to the WHO criteria.⁽¹⁹⁾ Histology, stage and grading followed the FIGO criteria.⁽²⁰⁾ Residual tumor was defined as the amount of unresectable tumor left following primary volume reductive surgery. Optimal volume reduction was achieved when the residual tumor was less than 2 cm. Patients with a residual tumor greater than 2 cm were considered to have suboptimal volume reduction. Overall survival was calculated from the time of initial surgery to death or the date of the last contact. Survival times of patients still alive or lost to follow-up were censored as of December 2002.

An ovarian tissue obtained from a 50-year-old woman who had received surgical treatment for benign uterine tumor was used as a normal ovarian tissue for methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Methylation-specific polymerase chain reaction. The methylation status of the samples was assessed using MSP as described previously.⁽²¹⁾ Genomic DNA from ovarian cancer cell lines was extracted using the AquaPure Genomic DNA kit (Bio-Rad). Genomic DNA from ovarian tumor specimens was extracted from paraffin blocks. For each tissue, the presence of carcinoma was confirmed on a H&E stained section. For DNA extraction, three 5- μ m tissue sections from the same block were scraped from the slide and treated with Dextran (Takara). The quality and integrity of the DNA were evaluated in terms of the A_{260/280} ratio. Genomic DNA (1 μ g) was treated with sodium bisulfite using a CpGenome DNA modification kit (Intergen) according to the manufacturer's protocol. Amplification was conducted in a 20- μ L reaction volume containing 2 μ L of 10 \times ExTaq buffer, 1.5 μ L of 2.5 mM MgCl₂, 1 mM of each primer, 1.5 mL of 2.5 mM dNTPs, and 1 unit of Takara ExTaq polymerase (Takara). The reaction was cycled for 40 cycles, each of which consisted of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 56°C for 30 s, and extension at 72°C for 45 s, followed by a 7-min extension at 72°C. The primers used were 5'-AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT-3' and 5'-ACATCCTACCAACCCTCCA-3' (-1431 to -1326, 106-bp) for the unmethylated reaction (U), and 5'-GGCGGATTTTATCGTAGTCG-3' and 5'-CTCCACGCTCGATCCTTCG-3' (-1404 to -1304, 101-bp) for the methylated reaction (M).⁽¹⁸⁾ Universal unmethylated human genomic DNA (Intergen) was used as a positive control for the unmethylated reaction. Universal methylated human male genomic DNA (Intergen) was used as a positive control for the methylated reaction. Reaction products were separated by electrophoresis on 3% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light.

Quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated from cells by phenol-chloroform extraction using Isogen reagent (Nippon Gene). RNA was treated with RNase-free DNase (Roche Diagnostics; 1 μ g/ μ L) for 2 h at 37°C, followed by heat inactivation at 65°C for 10 min. Total RNA (5 μ g) was reverse transcribed using the Superscript II first-strand synthesis system (Invitrogen) with random hexamers according to the

manufacturer's protocol. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was carried out using an iCycler system (Bio-Rad). For the determination of Cyclin D2 cDNA content, a 25- μ L reaction mixture consisting of 23 μ L iQSYBR Green MasterMix, 1 μ L of each primer and 1 μ L of cDNA template was cycled as follows: 2-min denaturation at 90°C, 30-s annealing at either 60°C (for Cyclin D2) or 62°C (for β -actin), and 1.5-min extension at 72°C. Primers for PCR reactions were as follows: Cyclin D2-F, 5'-TACTTCAAGTGCCTGCAGAAGGAC-3' and Cyclin D2-R, 5'-TCCCACACTTCCAGTTGCGATCAT-3';⁽²²⁾ and β -actin-F, 5'-CCAACCGCGAGAAGATGAC-3' and β -actin-R, 5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT-3'.⁽²³⁾ β -Actin primers were utilized as an internal positive control and Cyclin D2 expression level was calculated by dividing the quantity obtained for Cyclin D2 by the quantity obtained for β -actin. Two independent RT-PCR reactions were carried out for each sample.

5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A treatment. To confirm that epigenetic change contributed to loss of Cyclin D2 gene expression, we assessed the effect of 5-aza-2'-deoxycytidine (5azaC) (Sigma), a demethylating agent, and trichostatin A (TSA) (Sigma), a histone deacetylase inhibitor, on Cyclin D2 mRNA expression and cell growth of ovarian cancer cell lines by quantitative RT-PCR and cell count, respectively.

Ovarian cancer cell lines (OMC3, OVCAR3, JHOS2, JHOC5 and SKOV3) were cultured at a point of 70% confluence in 10-cm cell dishes. They were treated with 1.0 μ M 5azaC for 3 or 5 days. They were also treated with 0.5 μ M TSA.^(24,25) We set up TSA treatment times of 4, 8, 16 and 32 h, and the treatments for 8 and 16 h appeared the most effective for gene expression compared to control culture (data not shown). Total RNA was prepared at each time point and the expression of Cyclin D2 mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR. Furthermore, we investigated the effects of these chemical agents on cell growth of ovarian cancer cell lines by cell count at each time point.

Immunohistochemistry. For the purpose of investigating cell proliferation we examined the immunohistochemical expression of Ki-67 in ovarian cancer tissue. Immunohistochemical analysis was carried out with the streptavidin-biotin amplification method using the NX/ES IHC system (Ventana Medical Systems). Monoclonal antibody for Ki-67 (MIB-1) was purchased from DAKO. For antigen retrieval, the slides were heated in an autoclave at 120°C for 5 min in citric acid buffer (2 mM citric acid and 9 mM trisodium citrate dihydrate [pH 6.0]). The dilution of primary antibody was 1:50. Scoring of Ki-67 in carcinoma cells was counted independently by two of the authors (M. S. and J. A.), and the percentage of immunoreactivity in at least 500 carcinoma cells (i.e. the labeling index) was determined.

Statistical analysis. Statistical analysis was carried out using Stat View 5.0 software (SAS Institute). The correlation between the Cyclin D2 mRNA expression level and methylation status was assessed using the Mann-Whitney *U*-test. The statistical significance between methylation status and various clinicopathological parameters was evaluated using Friedman's χ^2 *r*-test and the Mann-Whitney *U*-test. A univariate analysis of prognostic significance for prognostic factors was carried out using the log-rank test after each survival curve was obtained by the Kaplan-Meier method. Multivariate analysis was carried out using the Cox regression model to evaluate the predictive power of each variable independently. All patients who could be assessed were included in the intention-to-treat analysis. A result was considered significant when the *P*-value was less than 0.05.

Results

Methylation status of the Cyclin D2 gene in ovarian cancer cell lines and tissues. Bands corresponding to methylated Cyclin D2 were