

厚生労働科学研究費補助金  
がん臨床研究事業

進行卵巣がんの集学的治療に関する研究  
(H16 - がん臨床 - 一般 - 035)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉川 裕之

筑波大学・大学院人間総合科学研究科  
婦人周産期医学 教授

平成19 (2007) 年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 進行卵巣がんの集学的治療に関する研究----- 1  
吉川 裕之

## II. 分担研究報告

1. 腹膜癌(原発不明 mullerian carcinoma)の検討----- 6  
勝俣 範之
2. 漿液性境界悪性卵巣腫瘍の臨床病理学的検討----- 9  
恩田 貴志
3. 初回化学療法不応卵巣がんに対する新たな化学療法の開発に関する研究----- 11  
嘉村 敏治
4. ヒト上皮性卵巣癌における時計遺伝子群の発現、臨床病理学的意義----- 13  
八重樫 伸生
5. 上皮性卵巣癌におけるセカンドルックオペレーション (SLO) の  
適応基準の確立に関する検討----- 19  
喜多 恒和
6. 卵巣癌における子宮頸部・内膜細胞診の陽性頻度----- 24  
中西 透
7. 卵巣癌播種性転移におけるシグナル伝達機序の解析----- 28  
小西 郁生
8. 卵巣粘液性腫瘍における増殖能とアポトーシスに関する研究----- 30  
岩坂 剛
9. 原発不明癌に対する診断的腹腔鏡適応の有効性の検討----- 33  
星合 昊
10. 胸水を伴った卵巣癌IV期例の臨床的検討----- 34  
斎藤 俊章
11. 卵巣癌治療の個別化に関する基礎的・臨床的研究 明細胞癌に対するP-CPT療法----- 37  
落合 和徳
12. Tumor dormancy による延命効果を目指したテーラード化学療法の  
進行再発卵巣・卵管・腹膜癌に対する治療効果に関する研究----- 40  
小林 裕明
13. 子宮頸部 glassy cell carcinoma の臨床的検討----- 44  
波多江 正紀
14. 卵巣癌に対する weekly TP(paclitaxel/cisplatin)療法に関する研究----- 46  
日浦 昌道
15. 進行卵巣癌における寛解導入・補助化学療法に関する研究  
TC療法とCAP療法の比較検討----- 57  
竹原 和宏

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 61

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 62

- V. 資料

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

総括研究報告書

進行卵巣がんの集学的治療に関する研究

主任研究者 吉川 裕之 筑波大学大学院人間総合科学研究科・教授

研究要旨

進行卵巣がんにおいて化学療法先行治療を確立するために、第 III 相試験に先立ち第 II 相試験（JCOG 0206）を行い、平成 18 年 3 月の最終解析においても、第 III 相試験を行うことの妥当性が確認され、かつ、化学療法先行治療で診断的腹腔鏡を省略できることが確認された。本年度は第 III 相試験の実施計画書作成を行い、最終審査を経て、平成 18 年 11 月に JCOG 0602 として手術先行治療との第 III 相試験（非劣性試験）の登録を開始した。

分担研究者

勝俣 範之  
国立がんセンター中央病院  
通院治療センター・医長  
恩田 貴志  
国立がんセンター中央病院  
婦人科・医長  
嘉村 敏治  
久留米大学医学部  
産婦人科・教授  
八重樫 伸生  
東北大学医学部  
産婦人科・教授  
喜多 恒和  
防衛医科大学病院  
産婦人科・講師  
中西 透  
愛知県がんセンター中央病院  
婦人科・部長  
小西 郁生  
信州大学医学部  
産婦人科・教授  
岩坂 剛  
佐賀大学医学部  
産婦人科・教授

星合 昊  
近畿大学医学部  
産婦人科・教授  
齊藤 俊章  
国立病院機構九州がんセンター  
婦人科・部長  
落合 和徳  
東京慈恵会医科大学  
産婦人科・教授  
小林 裕明  
九州大学医学部  
産科婦人科・講師  
波多江 正紀  
鹿児島市立病院  
産婦人科・部長  
日浦 昌道  
国立病院機構四国がんセンター  
手術部・部長  
竹原 和宏  
国立病院機構呉医療センター  
産婦人科・医師

## A. 研究目的

III、IV 期の卵巣がん、卵管がん、腹膜がんに対して、手術の前後に 4 コースずつ計 8 コースの化学療法を行う「化学療法先行治療」が、現在の標準治療である、手術後に計 8 コースの化学療法を行う「手術先行治療」よりも有用であるかどうかをランダム化比較試験にて検証する。Primary endpoint: 全生存期間。Secondary endpoints: 完全腫瘍消失割合、無増悪生存期間、奏効割合 (B 群のみ)、有害事象、手術侵襲指標 (開腹手術回数、総開腹手術時間、出血量、総輸血量、総血漿製剤使用量)。

## B. 研究方法

研究形式は多施設共同の第 III 相ランダム化比較試験 (非劣性試験)。対象症例は、開腹以外の手段で組織学的または細胞学的に診断され、CT/MRI で進行期分類された上皮性卵巣がん、卵管がん・腹膜がん III/IV 期の初回治療例で、20-75 才、CA125>200 IU/ml、CEA<20 ng/ml、ECOG PS 0-3、適当な骨髄・肝・腎機能が保持され、初回腫瘍縮小手術の対象となりうる症例とする。

症例登録とランダム割付は、データセンターでの中央登録方式をとる。電話または FAX にて症例登録を行い、適格性の確認後、治療群の割付を受ける。ランダム化割付には、調整因子として施設、PS、臨床進行期、年齢を用いる。

解析方法としては、予定症例数の半数の登録時点と症例集積終了後にログランク検定にて両群の生存期間を比較する。予定登録数: 各群 150 例、両群計 300 例。症例数算定の根拠は次のとおりである。NAC 療法が標準治療に劣るかどうかは関心事項ではないため、有意水準  $\alpha=0.05$  の片側検定とする。PCS の真の 3 年生存率を 25% と想定し、NAC がそれを下回る許容限界を 5% とする。NAC 療法の真の 3 年生存率が 30.3% であれば、80% の検出力で

非劣性を検証することができる。

実施施設は、本研究の研究者の所属施設を中心に、全国の卵巣がん治療の基幹施設 30 施設。

(倫理面への配慮)

参加患者の安全性確保については、正確な診断、有用性の高い治療等に配慮がなされており、試験参加による不利益は最小化される。また、「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言等の国際的倫理原則に従い以下を遵守する。1) 研究実施計画書 (プロトコル) の IRB 承認が得られた施設からしか患者登録を行わない。2) すべての患者について登録前に十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得る。3) データの取扱い上、患者氏名等直接個人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保し、個人情報 (プライバシー) 保護を厳守する。研究の第三者的監視: 本研究班により、もしくは賛同の得られた他の主任研究者と協力して、臨床試験審査委員会、効果・安全性評価委員会、監査委員会を組織し、研究開始前および研究実施中の第三者的監視を行う。

## C. 研究結果

III/IV 期卵巣がん、卵管がん、腹膜がんの化学療法先行治療の第 III 相ランダム化比較試験の開始に先立ち、試験治療の NAC 療法の feasibility study (第 II 相試験; JCOG 0206) を行った。第一の確認点はこの新治療体系が高率に完遂され、高い完全腫瘍消失割合が得られること (完全腫瘍消失とは CT または MRI で病変が消失し、CA125<20 IU/ml と定義) であり、第二の確認点とは診断的開腹や腹腔鏡を省略した場合でも、腫瘍マーカー、画像診断、細胞診所見に条件を定めて、原発診断、組織学的診断、進行期診断について高い正診率が得られることである。第二の確認点については feasibility

studyでは全例に行う診断的腹腔鏡の観察所見・組織診と比較する。対象は第III相試験と同じで、完全腫瘍消失割合をprimary endpointとして、診断的腹腔鏡前の臨床所見の適格条件を満たした症例のうち、診断的腹腔鏡による観察所見と病理組織診にて適格であることが確認された症例の割合（90%以上）をmajor secondary endpointとして行った。この試験内容については公表した（JJCO, 2004）。

JCOG 0206 はほぼ予定期間どおりに平成16年に56例の登録を完了した。登録患者の平均年齢は55歳（33-73歳）で、登録時の病期（画像診断）はIII期38名、IV期18名であった。PSは0が28名、1が18名、2が7名、3が3名であった。診断的腹腔鏡前の臨床診断の正診割合は53/56（94.6%）で、第III試験での診断的腹腔鏡の省略が決定された。診断的腹腔鏡前でI/II期と診断されたものは3名であった（そのうち1名は直後の開腹でIII期であることが判明した。それを含めた正診割合は54/56 [96.4%]）。完全腫瘍消失割合は18/53（34.0%, 95%CI; 21.5-48.3%）で、閾値割合20%を下回らないことが確認された。他に途中でprotocol治療中止の4名が完全腫瘍消失を達成しており、それを含めた完全腫瘍消失割合は22/53（41.5%）であった。最終解析は平成18年3月に行われ、その結果を同年5月にASCOにおいて発表した。

平成19年3月8日現在のJCOG 0602のIRB承認は30施設中23施設、登録は7例である。IRB承認直後の施設が多いので、今後の登録が促進されることが期待される。

#### D. 考察

この新治療体系の確立は、治療成績を変えずにまたは向上させて、手術回数・侵襲を減少させることが期待される。化学療法先行治療に関して唯一先行してい

るEORTCでは、第III相試験を開始し、診断的開腹または腹腔鏡の後に手術先行群と化学療法先行群に割り付けているが、結果として手術先行群に余分な開腹または腹腔鏡を行っている。診断的腹腔鏡の省略により、化学療法先行の利点である早期治療開始をさらに早めることができ、かつ現在臨床の現場で行われる切除不能例に対する化学療法先行治療にも一致する。

#### E. 結論

第III相試験として進行中のEORTC55971では第II相試験を省略したために、多くの問題が生じている。両群で診断的開腹・腹腔鏡を行うために、化学療法先行群では化学療法早期開始という利点を半減させ、手術先行群では標準治療以外のことを加えることが最大の欠点である。本試験では第II相試験の成果により、化学療法先行治療の特性を最大限に生かし、EORTC試験の欠点を克服した厳密な臨床試験とすることができた。

#### F. 健康危害情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ohara K, Yoshikawa H, et al. Early determination of uterine cervical squamous cell carcinoma radioresponse identifies high- and low-response tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 64(4): 1179-1182, 2006.
2. Matsumoto K, Yoshikawa H, et al. IgG antibodies to HPV16, 52, 58 and 6 L1-capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Lett* 231(2): 309-313, 2006.

3. Shiina H, Yoshikawa H, et al. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(1): 224-229, 2006.
4. Tanaka YO, Yoshikawa H, et al. MR findings of small round cell tumors of the ovary: A report of 5 cases with literature review. J Comput Assist Tomogr. 30(1): 12-17, 2006.
5. Sakon M, Yoshikawa H, et al. Incidence of venous thromboembolism following major abdominal surgery: a multi-center, prospective epidemiological study in Japan. J Thromb Haemost. 4(3): 581-586, 2006.
6. Yamada K, Yoshikawa H, et al. Phenotypic characterization of endometrial stromal sarcoma of the uterus. Cancer Sci. 97(2): 106-112, 2006.
7. Mori S, Yoshikawa H, et al. Inhibitory cis-element-mediated decay of human papillomavirus type 16 L1-transcript in undifferentiated cells. Mol Cell Biochem. 288(1-2): 47-57, 2006.
8. Ogura T, Yoshikawa H, et al. Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. J Gene Med. 8(8): 990-997, 2006
9. Miura S, Yoshikawa H, et al. Do we need a different strategy for HPV screening and vaccination in East Asia? Int J Cancer, 119(11): 2713-2715, 2006.
10. Ohara K, Yoshikawa H, et al. Explanation for the failure of neoadjuvant chemotherapy to improve outcomes after radiotherapy for locally advanced uterine cervical cancer from the standpoint of the tumor regression rate. Radiat Med 25: 53-59, 2007.
11. Kondo K, Yoshikawa H, et al. Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. Virology. 358(2): 266-272, 2007
12. Arimoto T, Yoshikawa H, et al. Treatment with paclitaxel plus carboplatin, alone or with irradiation, of advanced or recurrent endometrial carcinoma. Gynecol Oncol. 104(1): 32-35, 2007.
13. Uno K, Yoshikawa H, et al. Tissue factor expression as a possible determinant of thromboembolism in ovarian cancer. Br J Cancer. 96(2): 290-5, 2007.
14. Minaguchi T, Yoshikawa H, et al. Combined phospho-Akt and PTEN expressions associated with post-treatment hysterectomy after conservative progestin therapy in complex atypical hyperplasia and stage Ia, G1 adenocarcinoma of the endometrium. Cancer Letters, in press
2. 学会発表  
省略

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

腹膜癌（原発不明 mullerian carcinoma）の検討

分担研究者 勝俣 範之 国立がんセンター中央病院 第二通院治療センター・医長

研究要旨

1996年から2005年までの約10年間に当院で治療を行なった原発性腹膜癌症例の治療・予後を後方視的に検討した。32症例であり同時期の卵巣癌645症例に対し5.0%であった。年齢中央値は59.5歳、進行期（II期2、III期20、IV期10）、化学療法の奏効率は、88%（23/26）であった。生存期間中央値は28.7ヶ月であった。原発性腹膜癌は、卵巣癌と同様の生物学的特性を示すため、卵巣癌に準じた治療法が有効であり推奨される。

A. 研究目的

腹膜癌は今でも原発不明の Mullerian carcinoma や normal sized ovary carcinoma などといわれ、決してまれな疾患でないが適切な治療が選択されていない症例もみうけられる。今回、国立がんセンター中央病院で治療した腹膜癌症例を後方視的に検討してみた。

B. 研究方法

対象：①画像検査にて腹腔内もしくは後腹膜リンパ節に腫瘍を認める。②消化管精査にて消化器癌が否定され、子宮付属器にも腫大を認めず（4cm以下）原発臓器が不明である。③組織学的または細胞診で腺癌の診断が得られている。④細胞診のみの診断の場合、治療前のCA125/CEA比が25以上である。以上を満たす症例を腹膜癌と定義し、1996年～2004年までの約10年間に、当院で腹膜癌と診断し治療した症例について、その割合や背景、予後について後方視的に検討した。

C. 結果

上記基準にて診断した腹膜癌患者32例

（同時期に診断された卵巣癌645症例に対し5.0%）、年齢中央値は59.5歳（34-79）であった。進行期（II期2、III期20、IV期10）であった。年代別の診断数は、1996年1例、1999年1例、2000年5、2001年6例、2002年9例、2003年4例、2004年6例であった。

化学療法は全ての患者に投与されており、内訳は、TC（パクリタキセル/カルボプラチン）療法22例、DC（ドセタキセル/カルボプラチン）5例、TAP（パクリタキセル/アドリアマイシン/シスプラチン）療法2例、TP（パクリタキセル/シスプラチン）療法1例、CAP（エンドキサソ/アドリアマイシン/シスプラチン）療法1例、5FU 1例であった。評価可能病変をもつ症例に対する化学療法の効果は、CR16例、PR 7例、NC 1例、PD 2例、奏効率は、88.4%（23/26）であった。無増悪生存期間の中央値は、16.5ヶ月、生存期間中央値28.7ヶ月であった。

D. 考察

今回の検討により、腹膜癌症例は欧米での報告と同様、卵巣癌に似た生物学的特性をもち、卵巣癌に準じた治療にて良



好な成績が得られていた。

#### E. 結論

腹膜癌は卵巣癌に対し約5%と決して稀な症例ではなく、また近年その認識から診断症例も多くなっていると考えられた。上記診断基準に合致する症例は、腹膜癌と診断し卵巣癌に準じた治療方針が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 橋本浩伸、勝俣範之：「がん薬物治療におけるがん専門薬剤師と腫瘍内科医の連携について」EBM ジャーナル 7 (1), 266-270, 2006.
2. 勝俣範之：「わが国の婦人科がんにおける研究者主導臨床研究の現状」臨床薬理 37(1)：65-69, 2006.
3. 勝俣範之：「薬物療法の基本・抗悪性腫瘍薬の使い方」「内科学」医学書院 279-284, 2006.
4. 土井美帆子、勝俣範之：婦人科領域悪性腫瘍治療に関連する合併症に際して 1)化学療法 「産婦人科救急対応マニュアル」産科と婦人科 2006年 73：11 (283) 1627-1632, 2006.
5. 片山博文、勝俣範之：「がん緩和療法化学療法」日本臨床 65, 198-102, 2006.
6. 西尾真、勝俣範之 他：「進行子宮体癌に対する術後 Doxorubicin/Cisplatin(AP) 併用化学療法の認容性の検討」癌と化学療法 33(11)：1589-1593, 2006.
7. 朝倉義崇、勝俣範之：「がん化学療法-婦人科腫瘍領域における分子標的治療法」産婦人科の世界 58:12 1073-1081, 2006
8. 片山博文、勝俣範之：「がん緩和医療化学療法」日本臨床 65(1)：98-102, 2007.
9. 植原貴史、勝俣範之：「子宮頸がんとヒトパピロウイルス」がん分子標

的治療 4(4)：298-304, 2007.

10. Nishio S, Katsumata N, et al. [A Feasibility Study of Doxorubicin/Cisplatin (AP) for Postoperative Chemotherapy in Patients with Advanced Endometrial Cancer.] Gan To Kagaku Ryoho. 33(11)：1589-1593, 2006.

##### 2. 学会発表

1. 田部宏、勝俣範之、他：第43回日本癌治療学会「腹膜癌（原発不明 mullerian carcinoma）の検討」2005年10月、東京
2. 西尾真、勝俣範之、他：第4回日本臨床腫瘍学会 ポスターディスカッション 「進行子宮体癌に対する術後ドキシソルビシン、シスプラチン (AP) 療法の feasibility study」2006年3月、東京
3. 田部宏、勝俣範之、他：第4回日本臨床腫瘍学会 ポスター 「当院における再発・進行子宮体癌に対するMPA療法の後方視的検討」2006年3月、東京
4. Katsumata N, et al. American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, Poster Discussion Session abstract no. 5013 N. Phase III randomized trial of neoadjuvant chemotherapy (NAC) followed by radical hysterectomy (RH) versus RH for bulky stage I/II cervical cancer (JCOG 0102). June, 2006.
5. Tanabe H, Katsumata N, et al. American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, General Poster Session abstract no. 5060 Fujiwara CA125 nadir as a prognostic factor in advanced ovarian carcinoma: A retrospective study of 84

patients achieving clinical CR.  
June, 2006.

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

漿液性境界悪性卵巣腫瘍の臨床病理学的検討

分担研究者 恩田貴志 国立がんセンター中央病院 婦人科・医員

研究要旨

漿液性境界悪性卵巣腫瘍に対する適切な治療法を検討するため、1998年～2006年に当院で初回治療を行った卵巣境界悪性漿液性腫瘍7例を対象とし、病理学的所見、臨床経過等につき検討を行った。平均年齢は42.7歳、臨床進行期は、Ia期1例、Ic期3例、IIIa期3例であった。

7例のうち、5例で初回から無病生存が得られており、妊孕性温存手術を行ったIc期症例1例、根治手術+化学療法を行ったinvasive implantsを有するIIIa期症例1例において再発が認められた。2例とも第二次腫瘍縮小手術を行い、完全切除の後、タキサン+プラチナの化学療法を追加、現在無病生存中である。境界悪性腫瘍であっても、妊孕性温存手術を行った場合には、慎重な経過観察が必要であること、再発症例においても、腫瘍縮小手術で完全切除が得られれば、延命が期待できること、III期症例、再発症例において、化学療法の必要性、有用性については今後の検討が必要であること、などが示唆された。

A. 研究目的

漿液性境界悪性卵巣腫瘍は稀な疾患であり、特に卵巣外進展を有する進行症例において、初回手術後の化学療法の必要性や再発時の治療など浸潤癌に比べて不明な点が多い。これらの症例に対する適切な治療法を検討するため、臨床病理学的検討を行った。

B. 研究方法

1998年～2006年に当院で初回治療を行った卵巣境界悪性漿液性腫瘍は7例であった。7例のうち卵巣外implantsを有する症例は4例（うち1例はpsammoma bodyのみ）、invasive implantsを有する症例は1例であった。これらの症例につき、病理学的所見、臨床経過等につき検討を行った。

C. 研究結果

漿液性境界悪性腫瘍7例の平均年齢（範囲）は42.7（25-70）歳、臨床進行期は、Ia期1例、Ic期3例、IIIa期3例であった。

初回手術では、7例中6例に子宮全摘、両側付属器切除、大網部分切除（以下、根治手術と略す）が行われ、若年の両側性腫瘍Ic期の1例に対して、片側付属器切除、対側卵巣腫瘍核出術、大網部分切除が行われた。いずれの症例においても、肉眼的な残存は認めなかった。後療法として、invasive implantsを有するIIIa期症例1例および有しないIIIa期症例1例にタキサン+プラチナの併用化学療法6コースが行われた。

7例のうち、Ia期の1例、根治手術が行われたIc期2例、根治手術が行われたinvasive implantsを有しないIIIa期症例2例は、無病生存が得られている。

妊孕性温存手術を行ったIc期症例1例において初回手術後13M、根治手術+化学療法を行ったinvasive implantsを有するIIIa期症例において初回手術後23Mで腹腔内に再発が認められた。いずれの症例も、第二次腫瘍縮小手術を行い、完全切除術の後、タキサン+プラチナの化学療法6コースを追加、現在無病生存が得られている。

#### D. 考察

根治手術が行われ、残存腫瘍を認めないI期症例においては、化学療法の追加なしでも良好な予後が得られた。また、III期症例においても、invasive implantsを有さない場合、化学療法を追加しなくても良好な予後が得られる可能性が示唆された。根治手術が行われていないIc期症例では再発が認められた。

Invasive implantsを有する症例は、化学療法追加を行ったが、再発が認められた。再発例2例において第二次腫瘍縮小手術でいずれも完全切除が得られ、再び無病生存が得られた。Invasive implantsを有する症例、再発症例に対する化学療法の有用性は本試験からは不明であった。

#### E. 結論

境界悪性腫瘍であっても、妊孕性温存手術を行った場合には、慎重な経過観察が必要である。再発症例において、腫瘍縮小手術で完全切除が得られれば、延命が期待できる。III期症例、再発症例において、化学療法の必要性、有用性については今後の検討が必要と考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Onda T, Kamura T, Hatae M, Iwasaka T, Konishi I, Katsumata N, Yoshikawa H, et al. Feasibility study of neoadjuvant chemotherapy

(NAC) followed by interval debulking surgery (IDS) for stage III/IV ovarian, tubal and peritoneal cancers: Japan Clinical Oncology Group study JCOG0206. Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006.

2. 恩田貴志、[特集]Adjuvant and Neoadjuvant

Chemotherapy-Standardなもの、Standardになり得るものとは-卵巣癌、Mebio Oncology 3(4): 58-65, 2006.

##### 2. 学会発表

1. Tanikawa M, Onda T, et al.: Role of surgical treatment for ovarian serous borderline tumors with extraovarian implants, 11th International Gynecologic 2006. Society, USA.
2. 谷川道洋、恩田貴志、他：原発巣が特定困難であった癌肉腫の1例、第40回日本婦人科腫瘍学会、2006年7月、岐阜

#### 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

初回化学療法不応卵巢がんに対する新たな化学療法の開発に関する研究

分担研究者 嘉村 敏治 久留米大学医学部産科婦人科学教室・教授

研究要旨

Paclitaxel と carboplatin(TC 療法)による化学療法後に再発してきたいわゆる sensitive relapse 症例に対する second-line chemotherapy として carboplatin+docetaxel 療法の第 2 相試験を行った。さらに refractory relapse 症例に対して CPT-11+docetaxel の feasibility study を行った。

A. 研究目的

進行卵巢癌に対して診断がつき次第化学療法を行い、腫瘍が縮小した時点で初めて手術を行ういわゆる Neoadjuvant chemotherapy(NAC)の有用性を検討するための無作為化比較試験が計画されている。本研究は卵巢がんに対して80%程度の縮小が期待できる有効な抗がん剤の存在によっている。しかしながらそのうち30%は再発してくる。再発症例のうち6ヶ月以内の再発を sensitive relapse(SR)、6ヶ月以降の再発を refractory relapse(RR)としてこのそれぞれに効果のある regimen を探索することは NAC を行う上で重要なことの一つとなる。そこで SR 症例には docetaxel+carboplatin(DC 療法)を第2相試験として行い、RR 症例には CPT-11+docetaxel を feasibility study として行った。

B. 研究方法

SR 症例に対する DC 療法の第2相試験の regimen は docetaxel 70mg/m<sup>2</sup>, d 1, carboplatin AUC 5, d1 であり、目標症例は30例とした。また RR 症例に対しては CPT-11 は 60mg/m<sup>2</sup>, d 1, 8、

carboplatin は AUC 5, d1 で feasibility を評価した。

(倫理面への配慮)

プロトコールを作成し、IRB で承認を受けて行った。十分なインフォームドコンセントをいただいて本研究を行った。

C. 研究結果

目標30例に達しており、そのうち29例が解析可能であった。Overall response rate は59%(95%CL:41-77%)、complete response は17%であった。重篤な有害事象は認められず有用であることがわかった。RR 症例に対する CPT-11+docetaxel 療法も多種類の化学療法投与後の症例が対象となったにも拘らず、重篤な副作用は認められなかった。

D. 考察

carboplatin+docetaxel 療法は sensitive relapse 症例に対して有望なレジメンであることが明らかとなった。RR 症例に対して CPT-11+docetaxel 療法は安全に投与ができる治療法として、今後第2相試験を開始することを考える。

E. 結論

再発卵巣癌に対して行われる second line chemotherapy と し て carboplatin+ docetaxel 療法は日常臨床で推奨できるレジメンであることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishio S, Kamura T, et al. Fertility-preserving treatment for patients with malignant germ cell tumors of the ovary J Obstet Gynaecol Res 32 : 416 - 421, 2006.
2. Nishida N, Kamura T, et al. Role of immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor C and vasucular endothelial growth factor receptor 2 in ovarian cancer. Handbook of Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas 4 : 441 - 447, 2006.

2. 学会発表

1. Katsumata N, Kamura T, et al. Phase III randomized trial of neoadjuvant chemotherapy (NAC) followed by radical hysterectomy (RH) versus RH for bulky stage I/II cervical cancer (JCOG 0102). The 42<sup>nd</sup> Annual Meeting American Society of Clinical Oncology, 2006. 6. 2-6 Atlanta, USA.
2. Ushijima K, Kamura T. Neuroendocrine tumors of uterine cervix - report of seven cases-. The 18<sup>th</sup> FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics, 2006. 11. 5-10 Kuala Lumpur , Malaysia.

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

ヒト上皮性卵巣癌における時計遺伝子群の発現、臨床病理学的意義

分担研究者 八重樫 伸生 東北大学医学系研究科婦人科学分野・教授  
徳永 英樹 東北大学医学系研究科婦人科学分野・大学院

研究要旨

生物の概日周期を司る時計遺伝子群が細胞周期、アポトーシス、細胞増殖をも分子レベルで制御している可能性を示唆する研究結果が報告されてきており、癌の発生、予後、化学療法感受性にも影響を与えられている。

本研究ではヒト上皮性卵巣癌患者の腫瘍における時計遺伝子の発現量を定量 PCR 法によって測定し、臨床病理学的因子との相関について検討した。卵巣癌患者 83 例と正常卵巣 11 例において period1 (per1)、period2 (per2)、period3 (per3)、cryptochrome1 (cry1)、cryptochrome2 (cry2)、brain and muscle Arnt-like protein 1 (Bmal1)、clock、casein kinase I epsilon (CKI  $\epsilon$ ) の 8 種類の時計遺伝子についてそれぞれの遺伝子発現量を定量 PCR 法を用いて測定した。卵巣癌組織では正常卵巣組織と比較して有意に cry1 の発現が亢進し、per3、Bmal1 は有意な差はなく、per1、per2、cry2、clock、CKI  $\epsilon$  遺伝子の発現量は有意に低下していた。癌組織においては、cry1、per3、Bmal1 が比較的高い発現を示し、per1、per2、cry2、clock、CKI  $\epsilon$  の発現は低かった。cry1 は組織型と比較すると粘液性腺癌において ( $p=0.036$ )、分化度で比較すると grade3 において ( $p=0.029$ ) 発現量が低かった。また、Bmal1 も他の組織型と比較して粘液性腺癌において発現量が低かった ( $p=0.044$ )。多変量解析を行い、進行期と組織型の違いが有意な予後因子であった (それぞれ  $p=0.008$ 、 $p=0.023$ )。加えて cry1 と Bmal1 のいずれもが低値であることが独立予後因子となることが明らかになった ( $p=0.037$ )。

cry1 と Bmal1 は上皮性卵巣癌患者の予後に関与し、その病因に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

上皮性卵巣癌は、婦人科腫瘍のなかで比較的致死率の高い疾患である。その理由は、発見された時点で、進行している場合が多いためであり、進行期のほかにも、組織型、初回手術時の腫瘍残存の程度、化学療法に対する感受性のような因子も予後に影響するといわれている。さらに、Ki67、プロゲステロンレセプターの免疫染色による陽性率、術前の血清 CA125 レベルも全生存率に寄与すると考えられている。このような背景から、新

たな予後因子を同定することは新しい治療法の開発や卵巣癌患者の予後改善につながるものと考えられる。

哺乳類の代謝や行動には概日周期性が観察されるが、環境に適応し、効率のよい生命活動を送ることに役立っている。視交叉上核 (suprachiasmatic nuclei = SCN) が体内時計のペースメーカーであるといわれており、そのペースメーカーの駆動力は複数の遺伝子の転写とタンパク合成がフィードバックループを形成することによって制御されている。それら

の遺伝子を時計遺伝子と呼び、少なくとも8個の遺伝子(per1, per2, per3, cry1, cry2, clock, Bmal1, CKI $\epsilon$ )が体内時計の中枢を構成し、生体の日内変動を規定していると考えられている。これらの遺伝子はSCNで周期的に発現量が変化し、互いの遺伝子発現を正あるいは負のフィードバックによって調節している。また、光刺激や食事といった外界からの入力に応じて、遺伝子発現リズムの位相の変化が起こるといわれ、遺伝子発現の周期性と外環境からの刺激とがあいまって個体の行動や代謝を制御するもの考えられている。

時計遺伝子は生理学的な変化を制御するだけでなく細胞増殖、アポトーシス、細胞周期、DNA損傷の修復といった現象に働きかけることがわかり、なかでもper2は癌抑制効果を発揮する可能性も考えられている。時計遺伝子は哺乳類の数々の遺伝子の2から10%に影響を与えとも言われ、これまで疫学的あるいは臨床的に示唆されてきた癌と時間の関係が分子レベルで解明されつつある。時計遺伝子の発現と癌の予後については乳癌、子宮体癌で報告されているが、卵巣癌での報告はない。

本研究では時計遺伝子群がヒト卵巣癌の発育や伸展、予後に関与するのかを明らかにするために、定量PCR法を用いてヒト卵巣癌摘出標本検体における時計遺伝子群の発現量を測定し、臨床病理学的因子との相関を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 検体

1989年9月から2003年12月の間に、東北大学病院において手術し、組織学的に原発性上皮性卵巣癌と診断された104例の臨床検体を用いた。良性疾患で子宮摘出術を受けた際に子宮付属器を合併切除した11例の患者の卵巣を正常群として用いた。11例の平均年齢は56.7歳(43から69歳; 2例は閉経前、9例は閉経後)

であった。手術時に摘出した検体は速やかにO.C.Tコンパウンド(Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo)へ包埋し、使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。本研究で検討した臨床病理学的因子はFIGO進行期、TNM分類、組織型、分化度で表1に示した。組織型および進行期はFIGO(International Federation of Gynecology and Obstetrics)の取り扱い規約に従った。分化度はa universal grading system for epithelial ovarian cancerに従って決定した。全生存期間は初回手術日から死亡した日または最終外来受診日までの期間とし、2005年9月30日を観察期間の最終日とした。Hematoxylin-eosin(H-E)染色を施し、80%以上の上皮成分を含んだ検体のみRNA抽出を行った。

(倫理面の配慮)

本研究で検体を使用するにあたり、手術前に患者および家族に対して研究の趣旨を十分に説明し文書による同意を得た。なお本研究は本学倫理委員会の承認を得て行われた。

### 2. Quantitative real-time PCR

Total RNAをTrizol(Gibco, Life Tech, Gaithersburg, MD)を用いてフェノールクロロホルム法により抽出した。cDNAはtotal RNA 3 $\mu\text{g}$ からrandom hexamersとreverse transcriptase(Invitrogen Corp. Carlsbad, CA)を用いて作成した。per1, per2, per3, cry1, cry2, clock, Bmal1, CKI $\epsilon$ 、の8遺伝子のmRNA量を定量した。反応物は全量を15 $\mu\text{l}$ (cDNAを1 $\mu\text{l}$ 、senseプライマーとantisenseプライマーを0.4 $\mu\text{l}$ ずつ終濃度0.33 $\mu\text{M}$ 、dH<sub>2</sub>Oを5.7 $\mu\text{l}$ 、iQTM SYBR@ Green Supermix(Bio-Rad Hercules, CA)を7.5 $\mu\text{l}$ )に調整し行った。PCR反応は $94^{\circ}\text{C}$ で15分間、加熱後に $94^{\circ}\text{C}$ で30秒、 $60^{\circ}\text{C}$ (G3PDH)または $57^{\circ}\text{C}$ (その他)で30秒、 $72^{\circ}\text{C}$ で1分を50サイクル行い、 $72^{\circ}\text{C}$ で10分間伸長した。hTERTから作成した各時



計遺伝子の PCR 産物を 2%アガロースゲルで泳動し、RECOCHIP (Takara Shuzo, Otsu, Shiga)を用いて回収した。エタノール沈殿した後に、dH<sub>2</sub>O で溶解し SmartSpect™ 3000 (Bio-Rad Hercules, CA)を用いて濃度を測定した。PCR 産物は 0.3 pmol /  $\mu$ L に調整し 2  $\mu$ l を TOPO@ TA cloning kit Dual Promoter kit (with pCR II - TOPO) (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA) を用いてプラスミドに組み込んだ。プラスミドは competent cell に TOPO@ TA cloning kit Dual Promoter kit (with pCR II - TOPO)を用いて導入した。各組み込みプラスミドは Plasmid Mini Kit (QIAGEN Hilden, Germany)を用いて抽出した。精製したプラスミドを 0.1 ng/ $\mu$ l, 0.01 ng/ $\mu$ l, 0.001 ng/ $\mu$ l に濃度調整し、positive control として使用した。real-time PCR によって増幅された PCR 産物の standard curve に対する相対値によりテンプレート cDNA 内の時計遺伝子を定量し、internal control である G3PDH に対する比を求めた。

quantitative real-time PCR とデータ解析は iCycler と iCycler iQ software Ver. 3 (Bio-Rad Hercules, CA)を用いて行った。

### 3. 統計解析

統計解析は Stat View 5.0 (Abacus, CA)を用いた。時計遺伝子と臨床病理学的因子(年齢、pT、pN、pM、組織型、分化度)との相関は Mann-Whitney U test、Kruskal-Wallis test、Scheffe analysis を用いて検討した。両側検定で P 値が 0.05 未満を有意と判定した。生存率は Kaplan-Meier 法を用い log rank test で判定した。Cox logistic 回帰により全生存率に対する多変量解析を行った。P 値が 0.05 未満を有意と判断した。

## C. 研究結果

Real-time quantitative PCR

hTERT の cDNA をテンプレートとして

RT-PCR を行い、per1、per2、per3、cry1、cry2、clock、Bmal1、CKI  $\epsilon$  は single band としてそれぞれ、333bp、724bp、599bp、284bp、324bp、281bp、427bp、158bp の位置に検出された。これらをプラスミドに組み込み定量 PCR の positive control として使用した。臨床検体から抽出した cDNA を未知のテンプレートとして positive control (0.001、0.01、0.1 ng/ $\mu$ l) と同時に定量 PCR を行い、positive control の蛍光強度から standard curve を引き、臨床検体の蛍光強度と standard curve の交点から臨床検体内の mRNA 量を導き出した。standard curve の correlation coefficients はすべて 0.99 を超えており、適正に PCR が行われた。

卵巣癌と正常卵巣における時計遺伝子の発現量を表 3 にまとめた。各遺伝子間での比較をするため、得られた mRNA の絶対量は internal control である G3PDH の値で除して相対化した。定量 PCR の蛍光のピークが positive control から外れたものは泳動するとサイズが異っており、サンプルとして不適格であったため、そうした 21 例を解析の対象から除外した。

癌組織においては cry1 の発現量が他の遺伝子と比較して非常に高く、続いて per3 と Bmal1 の発現量が高かった。cry1 の発現量は癌組織群で正常群より有意に高く、per3 と Bmal1 の発現量は癌組織群と正常群の間で有意な差は認められなかった。per1、per2、cry2、clock、CKI  $\epsilon$  は cry1、per3、Bmal1 と比較して非常に低い発現量しか示さなかったため、以後の解析に加えなかった。

次に検体の摘出時間と遺伝子の発現量との間に相関がないか検討した。cry1、Bmal1、per3 すべて、摘出時間と遺伝子の発現量の間には有意な相関は認められなかった。摘出時間帯ごとに比較すると、cry1 も Bmal1 も癌組織群と正常群との間

で発現量に有意な差を認めた。cry1 と Bmal1 の発現ピークはちょうど反対の位相を示すことが知られており、それらの発現量の比は体内の時間を反映すると考えられる。興味深いことに弱い相関であるが cry1 と Bmal1 の発現量の間にも負の相関を認めた ( $p=0.046$ ,  $r$  値=0.22)。cry1 と Bmal1 の比と摘出時間の間にも有意な相関は認められなかった。

少なくとも本研究に用いた検体の摘出時間による発現量の差はないものと考えられたので、最終的に 83 例の卵巣癌患者の臨床病理学的因子と cry1、per3、Bmal1 の発現量について解析を行った。cry1 の発現量は粘液性腺癌 ( $p=0.036$ ) と低分化群 ( $p=0.029$ ) で有意に低い値を示した。Bmal1 の発現量も粘液性腺癌において有意に低かった ( $p=0.044$ )。単変量解析の結果、進行期、組織型、分化度は全生存率に対して有意な予後因子であることが示された。cry1 (A) と Bmal1 (B) は単独では全生存率に対して予後因子とはならなかった ( $p=0.138$ ,  $p=0.331$ )。しかし、発現量が低いほうが予後の悪い傾向があったため、それぞれの発現量の高低で 4 群に分けて解析した。その結果、cry1、Bmal1 が両方とも発現量が低い場合に有意に予後不良という結果を得た ( $p=0.031$ )。さらに多変量解析を行うと、分化度は独立した予後不良因子とはならず、進行期 ( $p=0.008$ )、明細胞性腺癌 ( $p=0.023$ )、cry1 と Bmal1 の両方が低値 ( $p=0.037$ , hazard ratio : 5.341) であることが独立予後因子であることが明らかとなった。

#### D. 考察

本研究はヒト卵巣癌における時計遺伝子の発現を検討した最初の報告である。正常卵巣組織と比較すると、卵巣癌組織において時計遺伝子は cry1 の発現量が亢進しており、per3、Bmal1 は低下傾向で、per1、per2、cry2、clock、CKI $\epsilon$  は有意に発現量が低下していた。癌組織

群の中だけで見ると、検討した 8 遺伝子の中では per3、cry1、Bmal1 の発現量が比較的高かった。cry1、Bmal1 は組織型、分化度と相関を示し、cry1 と Bmal1 の組み合わせで評価すると独立予後因子となった。

卵巣癌組織の中で cry1 だけが突出して高い発現量を示した理由については他の時計遺伝子の発現量が低下することによって正負のフィードバックのバランスが崩れて亢進している可能性も考えられるが、遺伝子そのものの変異やプロモーター領域の解析などしてみないことにははっきりはしない。また、時計遺伝子群とひとくりにすると、時計遺伝子群の中だけでの相互作用に目を奪われがちであるが、実際には数多くの遺伝子産物との相互作用が存在すると考えられており、直接あるいは間接的に相互作用する遺伝子が明らかになることによって、cry 遺伝子が発癌や癌組織の発育にどのような役割を持つかが徐々に解明されていくものと思われる。

卵巣癌の発生は単独の遺伝子異常ではなく、複数の遺伝子異常の蓄積が推測されているが、時計遺伝子群 8 遺伝子中 5 遺伝子 (per1、per2、cry2、clock、CKI $\epsilon$ ) の発現が有意に低下している。子宮体癌、乳癌において per 遺伝子の発現低下の理由で言われているように遺伝子そのものの異常よりも promotor 領域のメチル化のような epigenetic な修飾によって発現が低下しているのではないかと考えられた。しかし、卵巣癌という疾患の性質上、同一検体内で癌成分と正常上皮成分が比較に足る量で混在している部分を得ることは困難であるため、正常群として用いた検体は異なる個体から得た組織であること、用いた正常卵巣には間質がほとんどで上皮成分がほとんど含まれておらず、厳密な意味での癌と正常組織の比較を行えたわけではない。したがって cry1 以外の遺伝子が低下していることは単に癌化に伴って低下しているだけ

という可能性も否定できない。per2 遺伝子を Lewis tumor cell に導入することによってアポトーシスの増加、増殖抑制が観察されることや、SCN を電極で焼灼したマウスに骨肉腫組織、膵腺癌組織を移植すると正常マウスと比較して腫瘍の発育速度が速いという報告、さらに per2 ミュータントマウスでは c-Myc の転写が促進され、p53 の転写は抑制されており、胸腺リンパ種の自然発生や放射線によるリンパ腫の発生誘導及び致死率が上昇するという報告から per 遺伝子は癌抑制遺伝子としての機能を持っていると考えられており、本研究でも per1、per2 の発現量が低いという事実と一致しており、上皮性卵巣癌の発生に per 遺伝子の発現低下が寄与している可能性が示唆される。

cry1 と Bmal1 の発現量に負の相関が認められ、また cry1 は粘液性腺癌と低分化度の組織で発現量が低く、Bmal1 は粘液性腺癌での発現量が低いことからこれら 2 つの遺伝子の発現量の多寡が予後に影響を持つか検討した。多変量解析の結果、これら 2 つの遺伝子の組み合わせが独立予後因子となりうることが示された。cry1 と Bmal1 の発現量に負の相関があることはこれらの遺伝子が卵巣癌組織の中でもある程度、相互作用を保っているが、両者とも低い群では何らかの理由で予後が悪くなっていると考えられる。粘液性腺癌は化学療法に対する抵抗性が高い組織型であり、cry1<sup>-/-</sup>cry2<sup>-/-</sup>ダブル KO マウスは抗がん剤感受性が低いことがわかっている。また clock ミュータント/Bmal1KO マウスでは抗がん剤感受性の日内変動が消失しているという報告もあり、細胞周期の制御や抗がん剤に対する感受性の違いを通して cry1 と Bmal1 が予後に影響を与えている可能性が考えられた。cry ノックアウトマウスにおいては G2 期から M 期に入るのをブロックする Wee1 kinase の発現が高く、細胞分裂が抑制されることから細胞周期の制御とのかかわりが示唆されている。後になって

Timeless タンパクが DNA damage checkpoint タンパクである ATR と Chk1 に結合し、DNA 修復反応に重要な役割をもつうえに、CRY タンパクとも直接結合するため cry の発現量の変化が直接的に細胞周期を制御する可能性が示唆された。cry1 ミュータントマウスでは多くの組織で wee1 の発現が亢進しており、肝臓では肝切除後の組織修復が遅れるという報告も合わせると cry1 の発現が高いことによって卵巣癌の発育に寄与している可能性が考えられた。

抗がん剤の多くは分裂速度の速い組織には効きやすいため cry1 の発現量が高い方が腫瘍の発育に有利な反面、治療がよく効く可能性がある。したがって卵巣癌組織において cry1 の発現量が高いという結果に対して、発現量が低い方が予後が悪いという、一件矛盾するような結果も治療に対する感受性によって説明が可能かもしれない。そのためには癌組織を培養して薬剤感受性試験を行うとか、薬剤耐性遺伝子の発現量を検討に追加することによって時計遺伝子群と呼ばれる遺伝子群と癌との関わりを明らかにできるのではないかと考えられる。

## E. 結論

本研究結果は生活リズムや光のような日内変動に影響を与える因子が概日リズムの攪乱が癌の発生や発育に影響を及ぼすという考えに分子生物学的な裏づけを与える一助と考えられる。さらなる研究が必要であるが、ヒト上皮性卵巣癌の化学療法感受性や全生存率といった臨床病理学的因子に影響を与える生物学的背景を解明し、時計遺伝子群が果たす役割を理解する手がかりを発見したと考えられる。

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