

学会

国際学会

2011年

X X III ISTH2011, Kyoto Jul23-28, 2011

FINE (FEIBA INHIBITOR ENTRY) POST-AUTHORIZATION SAFETY SURVEILLANCE (PASS) : CAPTURING LONG-TERM EXPERIENCE IN JAPANESE INHIBITOR SUBJECTS UNDER ROUTINE CLINICAL MANAGEMENT

Satoshi Higasa¹), Kagehiro Amano²), Hideji Hanabusa³), Shinji Muto⁴), Tadashi Matsushita⁵), Midori Shima⁶), Teruhisa Fujii⁷), Michio Sakai⁸), Study Group FINE⁹)

THE POST-AUTHORIZATION SAFETY SURVEILLANCE (PASS) PROGRAM CONFIRMED ACTUAL CLINICAL SAFETY AND EFFICACY OF RECOMBINANT PLASMA/ALBUMIN-FREE METHOD FACTOR VIII IN JAPAN

Katsuyuki Fukutake¹), Hideji Hanabusa²), Masashi Taki³), Tadashi Matsushita⁴), Midori Shima⁵), Akira Shirahata⁶), The Advate PASS Study Group⁷)

CLINICAL EXPERIENCE OF PREVIOUSLY UNTREATED PATIENTS WITH ANTIHEMOPHILIC FACTOR (RECOMBINANT), PLASMA/ALBUMIN-FREE METHOD FROM POST-AUTHORIZATION SAFETY SURVEILLANCE IN JAPAN

Masashi Taki¹), Hideji Hanabusa²), Katsuyuki Fukutake³), Tadashi Matsushita⁴), Midori Shima⁵), Akira Shirahata⁶), the Advate PASS Study Group⁷)

PROSPECTIVE ADVATE IMMUNE TOLERANCE REGISTRY (PAIR) IN JAPANESE HEMOPHILIA A PATIENTS WITH INHIBITORS: AN INTERIM REPORT

Tadashi Matsushita¹), Hideji Hanabusa²), Katsuyuki Fukutake³), Masashi Taki⁴), Midori Shima⁵), Akira Shirahata⁶), the Advate PASS Study Group⁷)

CLINICAL PHARMACOLOGICAL STUDY OF A PLASMA-DERIVED FACTOR VIIA AND FACTOR X MIXTURE (MC710) IN HAEMOPHILIA PATIENTS WITH INHIBITORS - PHASE I TRIAL -

Tadashi Matsushita¹), Akira Shirahata²), Katsuyuki Fukutake³), Jun-ichi Mimaya⁴), Junki Takamatsu¹), Midori Shima⁵), Hideji Hanabusa⁶), Hideyuki Takedani⁷), Yoshifumi Takashima⁴), Akio Tawa⁸), Satoshi Higasa⁹), Noboru Takata¹⁰), Michio Sakai²), Kiyoshi Kawakami¹¹), Yasuo Ohashi¹²), Hidehiko Saito¹³)

STUDY ON THE METHOD FOR ASSAYING FVIII INHIBITOR TITER USING FVIII
CONCENTRATE FOR THE NEUTRALIZATION THERAPY

Tatsuya Araki¹⁾, Kohei Hashimoto¹⁾, Sayaka Oonishi-Kanakuri¹⁾, Noriyuki Ishihara²⁾,
Kazuhiko Tomokiyo¹⁾, Takayoshi Hamamoto¹⁾, Tomohiro Nakagaki¹⁾, Hideji
Hanabusa³⁾

ヒト精子凍結保存の最適化に関する研究—新規可変型 2 重腔チューブを用いる液体チッソ直接投入法による凍結とバーコードシステムによる取り違え防止に関する研究

東京歯科大学市川総合病院産婦人科 講師 兼子智

要旨

ヒト精子凍結保存の簡便化を目的として液体チッソ直接投入法による凍結保存を試みた。さらに凍結時と融解時にそれぞれ最適な温度変化率が得られる可変型 2 重腔チューブの容器について、医療用 2 次元バーコード管理が可能なチューブを採用し、取り違え防止に配慮した。

1. 目的

本研究は夫 HIV 陽性、妻陰性夫婦間において夫精液中の浮遊ウィルスおよび感染リンパ球を除去し、調製した運動精子を用いた生殖補助医療 (ART) により挙児を図ることを目的としている。in vitro における分離精子の生存、妊孕能保持時間は数時間である。分画した精子懸濁液中の HIV 陰性確認 (高感度 HIV 検出) には時間を要し、しかも検査に精子半量を使用するため、媒精に供する精子の量は少量となってしまう。これまで新鮮精子を用いて受精を行い、その後検査結果に従い、受精胚の破棄または培養続行を決定する方法が採られてきた。精子凍結保存は射精と排卵の時間的同調を不要とする。具体的には、分画した精子懸濁液を凍結保存し、HIV 陰性が確認された後に排卵誘発、採卵を行うことにより胚の破棄を強いられることを防止できる。また排卵は月に一回であるが、採精は週に一回程度可能であり、乏精子症例など精液所見不良例にお

いてより多数の精子を受精に供することが可能となる。しかし、現実には精子保存における融解後精子蘇生率 (融解後における運動精子回収率) の低さが ART 臨床応用へのボトルネックとなっている。

精液中の HIV を除去する過程において精漿の完全除去が求められる。そのため、精子は精漿中から人工培養液に置換されるが、われわれはこの過程における体液タンパク質除去に伴うコロイド浸透圧の低下が精子蘇生率の低下の主因であることを明らかにした。遠心媒体として用いる PVP 被覆コロイドシリカゲルである Percoll をタンパク質代用コロイドとした凍結保護剤、HIV 分離遠心媒体一体型のシステムを構築した。

従来、精子凍結保存は凍結保護剤と等量混合した精液または洗浄精子を小容器に充填し、閉封した後凍結速度調節するため液体チッソ蒸気中で凍結する方法が採られてきた。融解は、取り出した容器を 37°C の温湯中に浸

漬して行うのが、一般的である。本研究ではすでに tube in tube 型の可変型 2 重腔容器を考案し、報告した。これまで、融解時には速い温度上昇を必要とするため、内容器として熱伝導性が良好な PCR チューブを使用してきた。本年度は取り違え防止を考慮したシステム導入を目的として、底部に医療用バーコードを刻印した肉厚容器の使用が可能であるかを検討した。

2. 方法

精子の分画にはすでに報告した、1. クッション法による精子濃縮、2. Optidenz 沈降平衡、3. Percoll 沈降速度差遠心分離法を用いた。20mM HEPES 緩衝化 Hanks 等張化 90% Percoll 液に凍結保護物質として 250mM DMSO、250mM エチレングリコール、50mM トレハロースを添加したものを遠心媒体とした。遠心分離後、沈澱した精子 (50-100 μ l) は底面に 2 次元バーコードを刻印した内容器に充填、閉封した後さらに 2.0ml 容量のセラムチューブに入れて閉封した。これを直ちに液体チッソ中に投入して凍結を行った。融解時は、容器を液体チッソタンクから取り出し、直ちに外容器を開封し、取り出した内容器を 37°C の温湯中に浸漬して融解した。

倫理面への配慮

東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンターを受診し、精液検査を施行した検体のうち、研究使用へのインフォームドコンセントが得ら

れた精液を使用した。

3. 結果

1. 凍結容器管理システムの評価

図 1 は、これまで使用した PCR 用チューブを用いる可変型 2 重腔容器を示している。氏名識別はマジックインキ等で内外容器に氏名、凍結日などを記載した。図 2 は今回検討した底部に 2 次元バーコードを刻印した容器を内容器として用いるシステムを示した。本法では外容器に氏名、凍結日等の患者情報と 1 次元バーコードを印刷したシールを貼付する。外容器の 1 次元バーコードに関しては、試験したソフトウェアに含まれていたので使用したが、実際には不要と考える。内容器は底部のバーコードと患者情報を手書きで記載した。さらに外容器キャップに 10 色のカラーキャップを装着した。バーコードの導入、コンピュータ管理をすれば、患者取り違えはなくなると単純に考えがちであるが、バーコードリーダーの読み取りミスは人が感知することができない。一般に医療現場では、医師、看護師等の複数人によるダブルチェックが推奨されるが、情報管理学の立場からは思考アルゴリズムが異なる人とコンピュータの組み合わせによるダブルチェックが精度向上に有効である。また人が視覚情報を認識するのに、手書き文字と色の組み合わせは複数情報の統一の観点から有効である。エクセルまたはファイルメーカー等のソフトウェアを用いてバーコード情報を読み取

り、人がコンピュータ上に記載された氏名等の患者情報、カラーキャップを識別することにより高精度なチェックが可能となる。また実際に試験運用を行った結果、ファイルメーカーを用いて当該するチューブが収納されている液体チツソタンクの番号、ラック番号、ケーン番号を検索し、チューブを取り出すが、カラーキャップを視認することにより素早く取り出すことが可能となり、他の検体の温度上昇を防ぐことができた。一般的には2次元バーコードは民生用に汎用されるQRコードが有名である。本法は携帯電話等で簡単に解読可能であり、個人情報の取扱いにおいて不適當である。本研究ではdata matrix型バーコードを導入した。これは携帯電話では解読不能であり、また刻印されたバーコードの30%程度が欠落しても解読可能な高い冗長性を有している。図3は同時に検討した培養シャーレのバーコード管理案を示している。HIV除去精子を用いるARTでは、培養操作が必須である。上述したバーコード管理が単に精子保存に留まらず、採卵、媒精、顕微授精、培養、胚移植、更にはHIV除去確認のPCR等の全操作を総合的に管理することが理想である。ここではその一部であるシャーレ管理を示した。現在、data matrix型バーコードは粘着紙に印刷して、それをシャーレに貼付する方法が採られる。汎用されるQRコードではすでに全生産量に対して連番を印刷したシャーレが市販されている。さらにはICチップを搭載した情報トレーサーシールも市販されてい

る。また128bitのLSIを搭載した1mm角のチップも開発されている。これは耐熱性であり、ポリスチレン製シャーレを溶融形成する際にシャーレ内に包埋することが可能である。今後、どのような管理法を導入したら最も簡便かつ高精度に臨床応用が出来るかを議論する必要がある。

2. 凍結容器の精子蘇生率に及ぼす影響

同一検体を50 μ lずつ2種の容器に充填して凍結保存を行った。液体チツソから容器を取り出し、直ちに外容器を開封して内容物を微温湯に浸漬した。5分後に運動率を観察して、両者の融解後運動率を比較した。

射精精液(6600 \pm 2100 \times 10⁴精子/ml、運動率52 \pm 12%、n=6)から調製した洗浄精子の運動率は86 \pm 48.5%であった。熱伝導性の高いPCRチューブとバーコード刻印チューブを内容物とした場合、融解後運動率は各々64 \pm 6.3%、60 \pm 5.4%と両者に有意な差を認めず、今回検討したバーコード刻印チューブを内容物としても問題ないことが示された。

4. 考察

われわれはヒト精子凍結保存の最適化を目指して、1.凍結保護剤の最適化、2.HIV除去を目的とした密度勾配遠心分離担体に凍結保護剤を添加し、遠心分離時間中に保護剤の細胞内浸透、平衡化を行う工程数減少、3.融解後に精子から保護剤を除去過程における細胞保護、4.臨床応用において検

体識別による取り違え防止システムの最適化を行った。特に 4. は HIV 除去とその検査、更には最終的な胚移植に至る総合的なセキュリティ対策に不可欠であり、最終的にはこれを利用して児の長期予後調査に至るトレーサビリティの構築を目指すべきである。

5. 自己評価

1) 達成度について

本研究を遂行するにあたり、筆者はまず密度勾配遠心分離法と swim up を組み合わせ、精漿中に浮遊する free HIV とリンパ球内の HIV の同時除去法を確立した。次いで分離精子を用いて生殖補助医療による挙児を図るためには、精子凍結保存システムの最適化が不可欠であると考えた。本年度までに、凍結保護剤の選択と平衡化、保存法、融解法、保護剤の除去と培養液への置換など、すべての過程において細胞保護を考慮した手法の開発を終了した。さらに凍結精子の個体識別およびトレーサビリティ保証が臨床応用の前提となると考え、コンピュータ、人の組み合わせによる総合的な施策を提案した。これらにより、当初予定した研究項目を概ね達成した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究は HIV 患者を対象とする基礎的、臨床的研究の一貫として行われた。一方、精子凍結保存の効率的運用は、これまで絶対的な制限であった排卵（採卵）と射精の同調を不要にし、男

性不妊治療、ひいては生殖年齢にある男性担癌患者における化学療法、放射線療法前精子凍結保存に大きく寄与する。

3) 今後の展望について

これまで抗 HIV 剤を投与された患者の多くに造精機能障害による精液所見の低下を認めた。精子凍結保存は、排卵（採卵）当日以外に得られた精子の利用を可能とする。今後は HIV 除去精子の凍結蓄積による sperm banking システムを構築して患者の希望に応えたい。

6. 結論

HIV 除去ヒト精子凍結保存の最適化を目的とし、1. 凍結保護剤の最適化、2. HIV 除去を目的とした密度勾配遠心分離担体に凍結保護剤を添加し、遠心分離時間中に保護剤の細胞内浸透、平衡化を行う工程数減少、3. 融解後に精子から保護剤を除去過程における細胞保護、4. 臨床応用において検体識別による取り違え防止システムの最適化を行った。今後、積極的な臨床応用が期待される。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

研究発表

图1 可变型2重空凍結容器

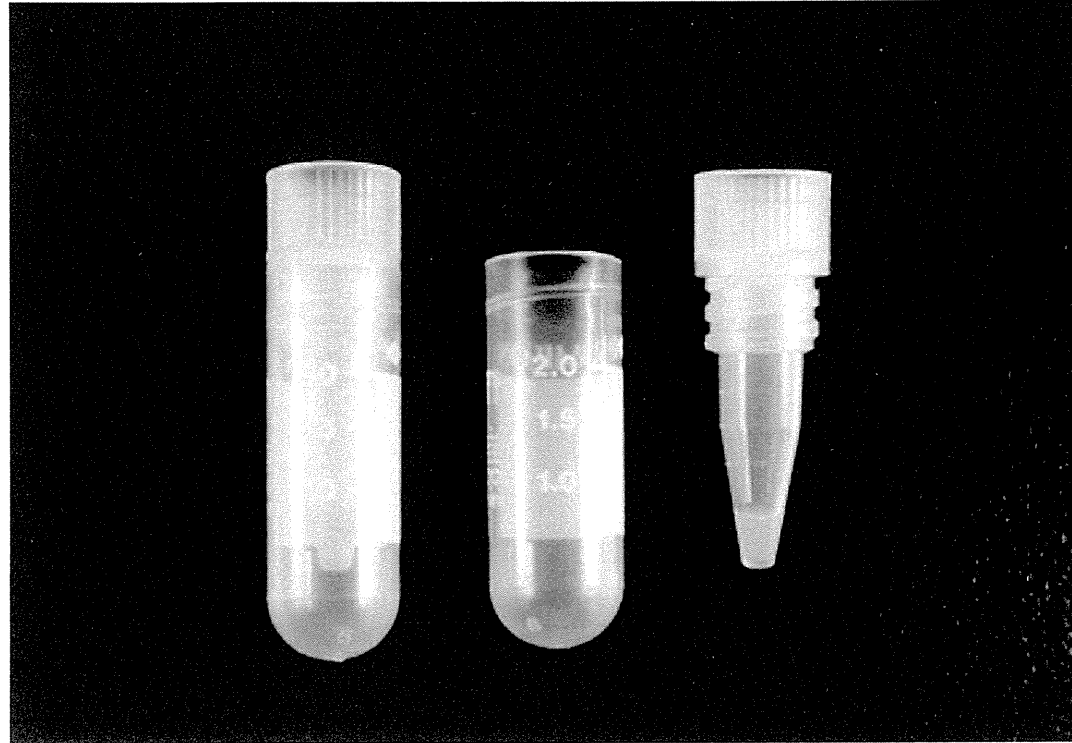


図2 バーコード刻印容器を内容器とする
可変型2重腔チューブによる精子凍結保存

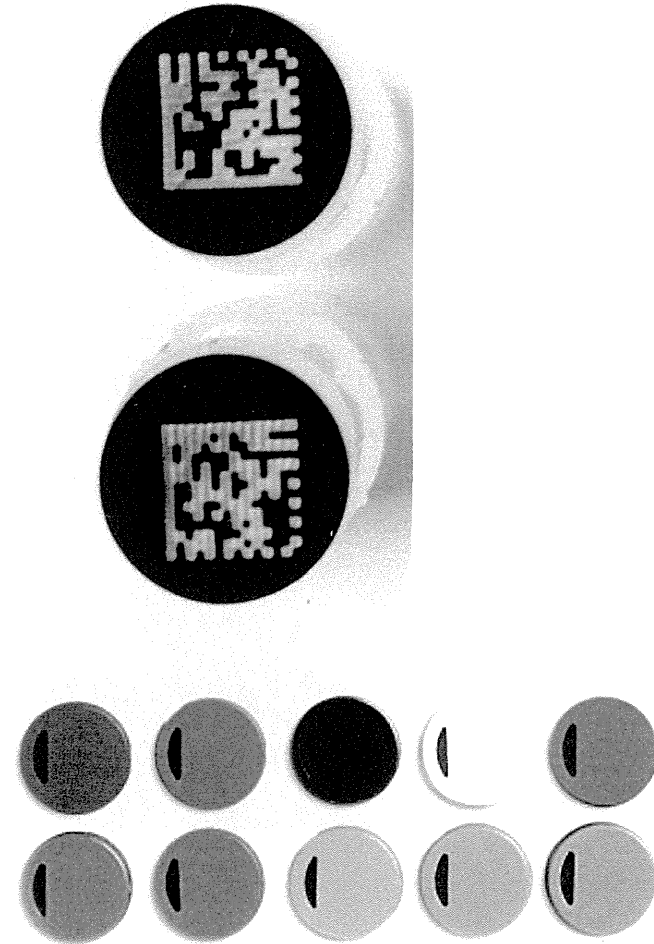
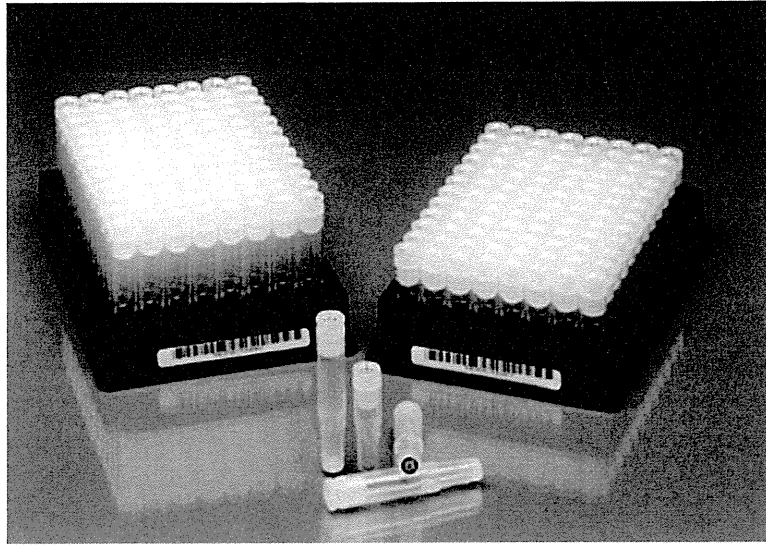
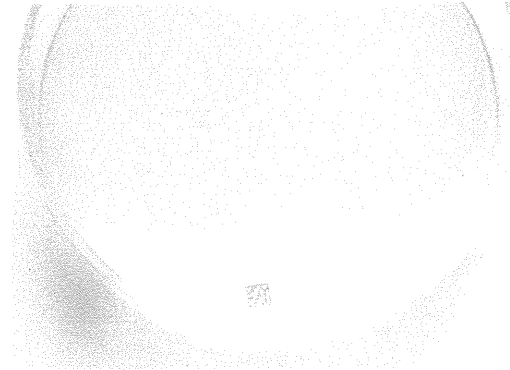


図3 培養用シャーレにおけるバーコード識別システム

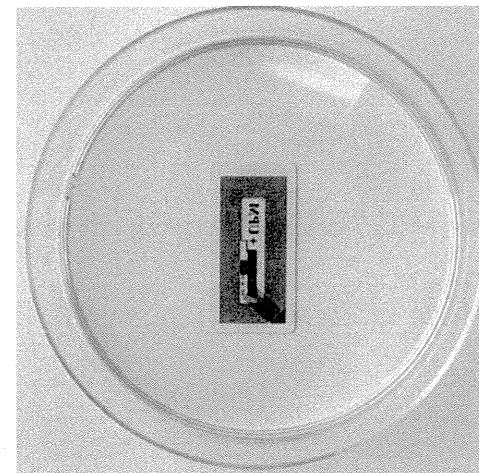
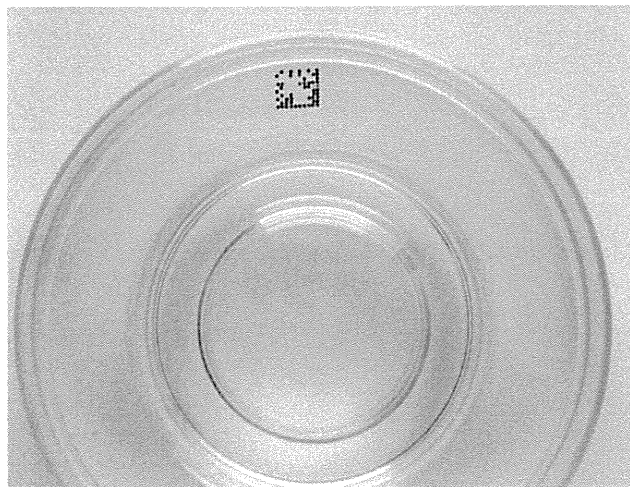
DATA MATRIX
フタ、側面 シール貼付



DATA MATRIX
底面 シール貼付



QRコード、底面 直接印刷 ICチップ 底面 シール貼付



平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金 (エイズ対策 研究事業)
分担研究報告書

HIV 除去精子を用いた不妊治療の臨床応用

研究分担者 久慈 直昭 慶應義塾大学医学部産婦人科

研究要旨

本年度もパーコール連続密度勾配による精液洗浄と swimup を組み合わせた HIV-1 感染精液洗浄法により精子を回収、凍結保存し、これを用いて顕微授精による不妊治療を行った。研究期間中に 14 症例 (新規患者 13 例、再洗浄希望患者 1 例) を洗浄し、全症例で運動精子を回収、13 症例では 10 万/ml 以上の濃度の精子浮遊液を得ることが出来た。また一症例では、精液濃度 4000 万/ml、運動率 5%以下と、提出された精液は高度精子無力症の所見であったが、swimup 精子は 1.0×10^4 /ml 得られた。

採卵・新鮮胚移植については、胚移植時の患者平均年齢は 36.08 歳 (25-47 歳)、採卵あたりの平均採卵数は 6.04 個、移植胚数は新鮮胚移植で 1.11 個、凍結胚移植で 1.26 個であり、単胚移植が増加している。採卵周期 41 周期中で、受精可能卵が出来た周期は 39 周期であるが、このうち 20 周期で全胚移植、胚移植を行ったのはわずかに 9 例であった。新鮮胚による臨床妊娠例は認められなかった (表 4)。

凍結胚移植については、胚移植 35 周期で妊娠例 12 例、すべて単胎で 10 症例が出産あるいは妊娠 12 週を越えて妊娠継続している。着床率は 27%であった。本年度の臨床成績の検討から、胚盤胞培養の普及により妊孕性の高い胚の選別が可能になって多胎がほとんど消失していることと、および胚移植法としては新鮮胚移植から凍結胚移植が優位になってきていることが示された。

A. 研究目的

精液中ヒト後天性免疫不全ウイルス (以下 HIV-1) は洗浄操作によって希釈・除去できることが知られている。

しかし約 5%の検体では洗浄後ウイルスが残存するといわれており、また

洗浄後の精子回収率が低いために、男性不妊合併症例では精子の回収が不能となる例が出現する。さらに PCR を用いた HIV-1 検出系は極めて高感度ではあるが、高感度ゆえに contamination による疑陽性の risk が常に存在し、臨床的治療効率の体歪

をもたらす恐れがある。そこで今年度我々は、精子回収率、洗浄後精液と受精卵培養液の PCR 検査結果、妊娠転帰の三点から本法の臨床的有用性を検討した。これに平成 22 年度の精液洗浄・および顕微授精・凍結胚移植による治療結果を加えて報告する。

B. 研究方法

1) 対象

洗浄精液を用いた生殖補助医療を希望して慶應義塾大学病院産婦人科を受診した夫 HIV-1 陽性、妻 HIV-1 陰性の夫婦。

2) 精液洗浄法および HIV-1 遺伝子検査法

精液は原則として洗浄・swim up によりウイルス除去、得られた精子浮遊液を 2 分し、一方を env あるいは gag 領域を標的とする nested-PCR 法により HIV-1 遺伝子の有無を確認、遺伝子が陰性であった検体の残り一方を不妊治療のため凍結保存した。ART 治療は原則として long 法あるいは GnRH antagonist 法による排卵誘発を行い、全例顕微授精を行った。さらに胚移植前に受精卵培養液について、HIV-1 遺伝子の有無を確認した（新鮮胚移植では肺移植前、凍結胚移植では胚凍結前）。本法による感染の確認は、非妊娠例および流産例では移植後 3 ヶ月後の妻の抗体検査、分娩例では分娩時の母体血・臍帯血および/または分娩後 6 ヶ月の母体血・乳児血中 HIV-1 遺伝子の有無にて評価した。

C. 研究結果

精液洗浄に関しては、平成 23 年 4 月より平成 24 年 3 月までに 14 症例（新規患者 13 例、再洗浄希望患者 1 例）を洗浄し、全症例で運動精子を回収、13 症例では 10 万/ml 以上の濃度の精子浮遊液を得ることが出来、症例あたり 10 本の tube に分注して凍結保存が可能であった（表 1）。残る一症例では、精液濃度 4000 万/ml、運動率 5% 以下と、提出された精液は高度精子無力症の所見であったが、swimup 精子は 1.0×10^4 /ml 得られ、2 本に分注・凍結保存した。ただし、この症例は翌月に再度精液を採取、このときは精子濃度 2000 万/ml、運動率 70% で swimup 精子も 290×10^4 /ml えられ、10 本の tube に分注して凍結保存が可能であった。

採卵・新鮮胚移植については、平成 23 年 4 月より平成 24 年 3 月までの期間では、胚移植時の患者平均年齢は 36.08 歳（25-47 歳）であった。

採卵あたりの平均採卵数は 6.04 個、移植胚数は新鮮胚移植で 1.11 個、凍結胚移植で 1.26 個であり、単胚移植が増加している。

採卵周期 41 周期中で、受精可能卵が出来た周期は 39 周期であるが、このうち 20 周期で全胚移植、胚移植を行ったのはわずかに 9 例であった。新鮮胚による臨床妊娠例は認められなかった（表 2）。

凍結胚移植については、胚移植 35 周期で妊娠例 12 例、すべて単胎で 10 症例が出産あるいは妊娠 12 週を越え

て妊娠継続している。着床率は 27%であった (表 3)。

D. 考察

第一に精液洗浄の精子回収効率、および洗浄効率に関する検討では、本年度、前述した運動率 5%以下の高度精子無力症症例を含み精子濃度 1500 万以下、あるいは精子運動率 40%以下の、WHO 基準による男性因子症例を 5 例含んでいるにもかかわらず、すべての症例で洗浄・swimup を行つての精子回収が可能であり、あくまで顕微授精を前提としてではあるがこの手法が高い精子回収率を維持していることが示された。また本年度、前年度と検査システムを変更していないにもかかわらず洗浄後の nested PCR の結果 HIV-1 陽性と判定された検体はなく、また受精卵培養液でも HIV 陽性と判定された症例はなかった。少なくとも、陽性コントロール混入による偽陽性の確率は低くなっていることが示唆され、これは検査者の熟練度の上昇 (2009 年 4 月入職) によるものが大きいと思われる。偽陽性率の低下は、安心して移植できる胚が多くなることにつながるため、臨床上は非常に好ましい。ただし、この偽陽性率低下によって真にの臨床上の治療効率が改善したかどうかは、今年度行ったすべての症例の水平・垂直感染の結果を見なければ判定できない。

また、今年度の臨床成績を見てみると、いくつかの特徴がある。第一は、新鮮胚移植が減少し、凍結胚移植が増

加したことである。特に比較的高年齢の女性に対しては GnRH antagonist を使用したために、また低年齢の女性に対しては採卵数が多いために OHSS 予防のため、いずれも移植可能な胚があるにもかかわらず、全胚凍結する症例が急増している。第二に昨年同様、胚盤胞までの体外培養が一般的になった結果、胚あたりの着床率が 27%と上昇している。本治療では、胚移植に伴ってわずかではあるが水平感染のリスクが残ることから、真に妊孕性のある胚を選別して移植できる胚盤胞培養は本治療の目的に適した治療法であると考えられ、また移植胚数は昨年度より減少するとともに、多胎症例は一例も認められていない。

E. 結論

本法は、男性因子合併例においても HIV-1 陰性と判断される運動精子を高い確率で回収可能であり、また本法で用いた PCR 解析系は、回収精子からのウイルスを高感度・高特異度で検出可能である一方、受精卵培養液の HIV-1 遺伝子検出系としては改良の余地があることが示された。

また、今年度の臨床成績の検討からは、胚盤胞培養による妊孕性の高い胚の選別が可能になってきていること、および凍結保存技術の高い効率が確認された。

F. 研究発表

Osamu INOUE, Naoaki KUJI, Tomoko

FUKUNAGA, Seiji OGAWA, Kana
SUGAWARA, Mitsutoshi YAMADA, Toshio
HAMATANI, Hideji HANABUSA, Yasunori
YOSHIMURA and Shingo KATO.
Processing of semen from an
HIV-1-positive male and its use in
the IVF-ICSI procedure -clinical

efficacy. 27th Annual Meeting of
the European Society of Human
Reproductoin and Embryology,
Stockholm, Sweden, 3-6 July, 2011.

表1. 精液洗淨(2011.4～2012.3)

	症例数 (%)
洗淨後回収精子濃度10万/ml以上	13 (7)
洗淨後回収精子濃度10万/ml未滿	1 (93)
洗淨後HIV-1遺伝子残存	0
計	14

表2. 採卵・新鮮胚移植(2011.4～2012.3)

	周期数 (%)
採卵あり	41
胚移植	9
臨床妊娠	0 (0)*
胚移植にいたらず	12
全胚凍結	20
採卵総数	41

表3. 凍結胚移植(2011.4～2012.3)

	周期数 (%)
臨床妊娠	12 (34)*
出産	3
on-going	7
流産	2
(妊娠・出産例はすべて単胎)	
胚移植総数	35

* 胚移植施行した35例を分母とした

** 移植胚44個、着床率は27%

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高桑好一	パンデミックH1N1 2009の臨床像 産科	鈴木宏、渡辺彰	インフルエンザの最新知識 Q&A 2012 パンデミックH1N1 2009の終焉を迎えて～IV	医薬ジャーナル社	東京	2012発行予定	
花房秀次	指導と支援	石黒精	はじめての血友病診療 実践マニュアル	診断と治療社		2012	86-93

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Quan J, Yahata T, Adachi S, Yoshihara K, Tanaka K	Identification of receptor tyrosine kinase, discoidin domain receptor 1 (DDR1), as a potential biomarker for serous ovarian cancer.	Int J Mol Sci,	31	971-982	2011
Nonaka T, Takakuwa K, Tanaka K	Analysis of the polymorphisms of genes coding biotransformation enzymes in recurrent miscarriage in the Japanese population.	J Obstet Gynaecol Res,	37	1352-1358	2011
Yoshihara K, Tajima A, Adachi S, Quan J, Sekine M, Kase H, Yahata T, Inoue I, Tanaka K	Germline copy number variations in BRCA1-associated ovarian cancer patients.	Genes Chromosomes Cancer	50	167-177	2011
Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H	Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors - Phase I trial.	Haemophilia,	18	94-101	2012
長尾梓, 花房秀次	【小児医療における診断・治療の進歩】 治療技術 HIV陽性夫婦の生殖補助医療と母子感染防止対策	小児科	52(12)	1793-1798	2011
長尾梓(荻窪病院 血液科), 花房秀次	【ライフスパンからみた小児科診療】血友病(解説/特集)	小児内科	43(9)	1552-1554	2011
花房秀次	HIV感染者の生殖補助医療	医薬の門	51(6)	56-61	2012
田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 嶋緑倫, 白幡聡, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 堀越泰雄, 松下正, 松本剛史, 三室淳, 吉岡章	【東日本大震災と日本血栓止血学会】 東日本大震災で被災された血友病患者者への支援	日本血栓止血学会誌	22(5)	259-265	2011
瀧正志, 花房秀次, 竹谷英之, 沖本由理, 西須孝, 島田幸造	頻回出血を繰り返す血友病患者における滑膜切除術の適応	小児科臨床	64(9)	2061-2072	2011
加藤真吾	HIV検査およびHIV関連検査.	化学療法の領域	27	71-77	2011
加藤真吾, 今井光信	HIV検査の新たな展開	日本エイズ学会誌	13	132-136	2011

Article

Identification of Receptor Tyrosine Kinase, Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1), as a Potential Biomarker for Serous Ovarian Cancer

Jinhua Quan, Tetsuro Yahata *, Sosuke Adachi, Kosuke Yoshihara and Kenichi Tanaka

Division of Obstetrics and Gynecology, Niigata University, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, 951-8520, Japan; E-Mails: zenkinka@yahoo.co.jp (J.Q.); sadachi@med.niigata-u.ac.jp (S.A.); yoshikou@med.niigata-u.ac.jp (K.Y.); tanaken@med.niigata-u.ac.jp (K.T.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: yahatat@med.niigata-u.ac.jp; Tel.: +81-25-227-2320; Fax: +81-25-227-0789.

Received: 20 December 2010; in revised form: 18 January 2011 / Accepted: 18 January 2011 / Published: 31 January 2011

Abstract: Ovarian cancer, one of the most common gynecological malignancies, has an aggressive phenotype. It is necessary to develop novel and more effective treatment strategies against advanced disease. Protein tyrosine kinases (PTKs) play an important role in the signal transduction pathways involved in tumorigenesis, and represent potential targets for anticancer therapies. In this study, we performed cDNA subtraction following polymerase chain reaction (PCR) using degenerate oligonucleotide primers to identify specifically overexpressed PTKs in ovarian cancer. Three PTKs, janus kinase 1, insulin-like growth factor 1 receptor, and discoidin domain receptor 1 (DDR1), were identified and only DDR1 was overexpressed in all ovarian cancer tissues examined for the validation by quantitative real-time PCR. The DDR1 protein was expressed in 63% (42/67) of serous ovarian cancer tissue, whereas it was undetectable in normal ovarian surface epithelium. DDR1 was expressed significantly more frequently in high-grade (79%) and advanced stage (77%) tumors compared to low-grade (50%) and early stage (43%) tumors. The expression of the DDR1 protein significantly correlated with poor disease-free survival. Although its functional role and clinical utility remain to be examined in future studies, our results suggest that the expression of DDR1 may serve as both a potential biomarker and a molecular target for advanced ovarian cancer.

Keywords: ovarian cancer; tyrosine kinase; DDR1; disease biomarker; cDNA subtraction; degenerate PCR

1. Introduction

Ovarian cancer, one of the most common gynecological malignancies, is an aggressive cancer associated with high morbidity and mortality, especially in the case of advanced disease. Unfortunately, ovarian cancer is rarely diagnosed in its early, most curable stages, and the tumors are already disseminated abdominally in 75% of patients at the time of diagnosis. The tumor grade, histological type, and presence of residual disease after initial surgery are also important clinicopathological factors related to patient outcome [1]. To improve the prognosis of ovarian cancer, it is vital to clarify the molecular mechanisms involved in the progression of this disease, and to develop novel and more effective treatment strategies against advanced disease.

Protein tyrosine kinases (PTKs) play an important role in the signal transduction pathways that control cell proliferation and differentiation, and are involved in tumorigenesis. Many PTKs have been shown to act as oncogenes, and analysis of PTK expression in malignant cells will lead to a better understanding of oncogenesis, which in turn may lead to novel therapies based on selective inhibition of the PTKs involved in malignant transformation [2]. Various targeted therapeutics have been explored for the management of ovarian cancer. PTKs such as Her2/neu, the epidermal growth factor receptor (EGFR), and vascular endothelial growth factor (VEGF), represent potential targets for ovarian cancer, and agents targeting these molecules are already being used in the clinic for other diseases [3–5]. The PTKs may also provide an important predictive marker for therapeutic response and patient outcome [6,7]. It is important to identify predictive PTKs to identify targeted subpopulations of patients who will respond to both the existing tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and to new agents developed against new targets, and to obtain a better understanding of the underlying mechanisms of resistance to the existing agents so that new compounds can be developed to overcome this resistance.

The expression of PTKs can easily be determined by RT-PCR using degenerate primers which recognize common, relatively invariable cDNA sequences of members of the PTK family. PCR-based cDNA subtraction offers an efficient method for selectively amplifying differentially expressed genes. This method is particularly well-suited for the identification of target cDNAs that correspond to rare transcripts, which are typically the most difficult to obtain.

In this study, we have combined cDNA subtraction and polymerase chain reaction (PCR) using degenerate oligonucleotide primers representing conserved amino acid sequences within the tyrosine kinase domain to identify specifically overexpressed PTKs in serous ovarian cancer. The PTKs that were identified were subsequently examined for their potential association with the clinicopathological factors and patient outcome.

2. Materials and Methods

2.1. cDNA Subtraction and Degenerate PCR

Primary serous papillary ovarian cancer tissue samples and their corresponding normal ovarian tissue samples were obtained from three patients who underwent primary debulking surgery at the Niigata University Medical and Dental Hospital. Total RNA was extracted using an RNeasy Miniprep Kit (Qiagen), and poly(A)RNA was isolated using the FastTrack 2.0 Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized, and cDNA subtraction was performed for each patient using a PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. To select truly overexpressed PTKs in the cancer tissue, cDNA subtraction was performed between the tumor cDNA as a tester and 5-times the amount of normal ovarian cDNA as a driver. The subtracted cDNA fragments were amplified by suppression PCR in order to enrich the differentially expressed sequence and to reduce background. The final products of cDNA subtraction were further amplified with primers corresponding to consensus sequences for PTKs. Primers were synthesized corresponding to the amino acids HRDLAARN and DVWS(F/Y)G(I/V), which are highly conserved sequences in the catalytic domains of PTKs. The products of the degenerate PCR were subcloned and then sequenced.

2.2. Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay

Quantitative RT-PCR was performed to validate the expression of each clone identified by cDNA subtraction and degenerate PCR using Taqman probes. Tumor samples from 8 patients with serous ovarian cancer and their corresponding normal ovarian tissue were used for the analysis. Total RNA was isolated and processed with the RNeasy Miniprep Kit (Qiagen). A TaqMan two-step kit (Applied Biosystems) was utilized for all RT reactions. The High Capacity cDNA Archive kit utilizes a proprietary mixture of $10 \times$ random primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ L) and $10 \times$ Reverse Transcription Buffer and $25 \times$ dNTPs for the RT reaction. RT reactions were incubated at 25 °C for 10 min, followed by 37 °C for 120 min in a thermal cycler. After cDNA synthesis was performed during the second step, RT-PCR was then performed in an ABI PRISM 7900 in a 50 μ L final volume with 1 μ L of the cDNA template, 10 μ M of primers and 5 μ M of TaqMan Probe, and enzymes from the $2 \times$ TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI) according to the manufacturer's protocol. The thermal cycling conditions were: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The primer sequences were designed by Operon Biotechnology (Tokyo, Japan), and were as follows; IGF1-R: forward primer: 5'-ACTTCTGCGCCAACATCCTCA-3'; reverse primer: 5'-CCCTTTAGTCCCCGTCACCTCC-3', JAK1: forward primer: 5'-AGAGGCATATAAAATTTAGATTGC-3'; reverse primer: 5'-TGTCCTTGTTGAGAGTGAACA-3', DDR1: forward primer: 5'-ATGGAGCAACCACAGCTTCTC-3'; reverse primer: 5'-CTCAGCCGGTCAAACCTCAAACCT-3', and GAPDH: forward primer: 5'-GGCTCCCACCTTTCTCATCC-3'; reverse primer: 5'-GATGTGGGGAGTACGCTGC-3'. The TaqMan-probes were obtained from Applied Biosystems.

2.3. Immunohistochemistry

Archival tissue from patients with ovarian cancer removed at debulking surgery and normal ovaries removed during surgery for benign conditions were used for immunohistochemical analysis. H&E-stained sections of each sample were reviewed by a pathologist, and areas corresponding to tumor tissue were marked. Immunohistochemistry (IHC) was performed on 67 serous ovarian cancer tissue specimens and 5 normal ovarian tissue specimens that were paraffin-embedded and cut into 4- μ m-thick sections and mounted on positive charge-coated slides. Tissue sections were dried overnight in a 45 °C oven. For antigen visualization, the EnVision/HRP system and DAB+ (Dako) were used. The immunohistochemical procedure was optimized by testing different antigen retrieval methods using negative and positive controls. An anti-DDR1 antibody (Santacruz) was added at a 1:100 dilution to each section and incubated for 60 min at room temperature. The IHC results were scored based on the staining intensity as negative and positive. Immunoreactivity was scored as follows: the numbers of DDR1 positive cells were counted out of 100 cells in three different high power fields and judged as “positive” when >50% of cells were positively stained according to previous reports [8]. Cases were classified into two groups: group 1 (negative) included the cases with negative staining and less than 50% of staining, group 2 (positive) included cases with more than 50% of staining.

2.4. Association between the Expression of DDR1 Protein in Ovarian Cancer and the Clinical Disease Stage, Tumor Grade, and Patient Outcome

The clinical data for this immunohistochemical staining study were collected from 67 consecutive unselected patients with primary epithelial ovarian cancer who had undergone surgery at the Niigata University Dental and Medical Hospital between 2000 and 2004. Only patients with a histological diagnosis of serous papillary ovarian cancer were included in this study, and those with borderline tumors were excluded. All tumors were graded and staged according to the FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) classification. All patients provided consent according to the institutional review board of Niigata University Dental and Medical Hospital, Niigata, Japan.

3. Results

After screening ovarian cancer tissue samples by the PCR-based cDNA subtraction and degenerate PCR for selection of the clones of differentially overexpressed PTKs, we randomly selected 202 clones. By sequencing analyses, 140 clones were revealed to be identical to janus kinase 1 (JAK1), 30 to the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1-R), and eight to the discoidin domain receptor 1 (DDR1). The other 24 clones were unidentified genes.

We performed quantitative real-time PCR to validate whether the three PTKs were constitutively overexpressed in ovarian cancer using eight serous ovarian cancer tissue and their corresponding normal ovarian tissue samples. The DDR1 gene was overexpressed in all eight individuals, whereas the expression levels of JAK1 and IGF1-R were not increased in half of the ovarian cancer tissue samples (Figure 1). The DDR1 expression level in the ovarian cancer tissue samples was increased 6.7 fold on average compared with normal ovarian tissue.