

## STR 解析に基づいた絨毛癌の遺伝学的診断

名古屋大学大学院医学系研究科

医療行政学 准教授 山本英子

名古屋大学大学院医学系研究科

法医学 准教授 山本敏充

名古屋大学医学部

産婦人科 助教 新美薫

助教 西野公博

### 1. 研究の背景・目的

絨毛癌は妊娠性絨毛癌と非妊娠性絨毛癌に分類される。多くの絨毛癌は妊娠性であり、過去の妊娠時の胎盤絨毛細胞を発生起源とする。分娩、流産、中絶、胞状奇胎など、どの種類の妊娠後にも発症する可能性があり、さらに直前の妊娠が発症原因になるとは限らないと報告されている<sup>1)</sup>。絨毛癌患者の約半数には胞状奇胎の既往歴があり、胞状奇胎は絨毛癌発症のリスクファクターである。胞状奇胎は異常な受精による妊娠であり、全胞状奇胎と部分胞状奇胎に分類される。全胞状奇胎は核が不活化した卵子に2精子受精あるいは1精子受精後2倍化した雄核発生であること<sup>2)</sup>、部分胞状奇胎は正常卵子に2精子受精による3倍体であることが明らかにされている<sup>3)</sup>。妊娠性絨毛癌は化学療法が奏功するため、生存率は約90%と比較的予後が良好である。ファーストレジメンはエトポシド (E)、メトトレキサート (M)、アクチノマイシン D (A) を用いた MEA 療法や EMA/CO 療法 (C: サイクロフォスファミド、O: ビンクリスチン) が選択されるが、セカンドレジメンでの効果がなく、手術や放射線治療の適応ではない場合には、サードレジメン以降は難治性となり死亡に至る症例が約10%認められる。

一方、非妊娠性絨毛癌は、胚細胞性絨毛癌と他癌の分化異常によるものがある。胚細胞性絨毛癌は、卵巣や精巣に発症する胚細胞腫瘍で絨毛癌成分のみを認める腫瘍である。手

術で完全に切除できない、あるいは多発転移を認める場合に用いられる化学療法は、胚細胞性腫瘍やそれぞれの癌（胃癌や大腸癌など）に対するレジメンを用いる治療と、絨毛癌のレジメン（EMACO 療法や MEA 療法）を用いる治療と、それぞれの報告があり、いずれが適切であるのかについては結論が得られていない。妊娠性絨毛癌と比較して非妊娠性絨毛癌では予後が不良であるとの報告がある。しかしながら、これらは少数症例を扱った報告がほとんどであり、また、妊娠性か非妊娠性かについての診断も、遺伝学的診断に基づいた正確な報告は少ない。

妊娠性絨毛癌の発生源、あるいは絨毛癌の妊娠性と非妊娠性の鑑別は、DNA 多型解析である short tandem repeat (STR) 解析を用いた遺伝学的分析によって可能である<sup>4, 5)</sup>。現在、絨毛癌患者で妊娠歴がある場合には妊娠性絨毛癌、妊娠歴がない場合や性交経験がない場合には非妊娠性絨毛癌として臨床的に診断されている。STR 解析は医療用検査として保険適応はなく、現在は研究レベルで行われるのみである。しかし、化学療法が奏功し予後良好といわれる妊娠性絨毛癌の中にも難治性症例や死亡症例が約 10%あること、非妊娠性絨毛癌は予後不良と報告されているが症例数が少ないためにエビデンスに乏しいことより、絨毛癌の発生源を遺伝学的検査によって明らかにすることは、絨毛癌の正確な診断だけではなく、特に非妊娠性絨毛癌の治療法の確立のためには必須であると考えられる。臨床的に診断された妊娠性絨毛癌の難治症例は、非妊娠性絨毛癌の可能性も考えられる。また、妊娠性絨毛癌の中でも、発生源となる妊娠の種類によって化学療法の奏効率や予後に差が生じる可能性もある。

絨毛癌の薬剤耐性機序は解明されていない。メトトレキサートに対する耐性には multidrug resistance protein 1 (MDR1) や dihydrofolate reductase (DHFR) の関与が骨肉腫では示唆され<sup>6)</sup>、その場合にはホモシステインが治療薬の候補に考えられる。また、programmed cell death ligand 1 (PD-L1) を強発現した難治性性絨毛癌に PD-1 阻害薬であるペムブロリズマブが著効したと報告された<sup>7)</sup>。非妊娠性や難治性絨毛癌で PD-L1 発現が明らかになれば PD-1 阻害薬は新規治療薬となり死亡例が減少する。

化学療法が奏功し予後良好といわれる妊娠性絨毛癌の中にも難治性や死亡症例が約 15%あること、非妊娠性絨毛癌は予後不良といわれるがエビデンスに乏しいことより、絨毛癌の発生源を遺伝学的検査により明らかにすることは、正確な診断だけではなく、特に非妊娠性絨毛癌の治療法の確立のためには必須である。本研究では遺伝学的診断に基づ

いた絨毛癌の責任妊娠（発生源）、化学療法有効性および予後、さらには新規治療法につながる薬剤耐性関与因子やPD-L1 の発現との関連を明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究の対象ならびに方法

### (1) 対象患者

名古屋大学医学部附属病院産婦人科において治療中または治療を終えた絨毛癌患者を対象とした。本研究を始める前に名古屋大学医学部の倫理委員会の承認を得た。平成 29 年度は先に報告したとおり、臨床的に診断された 3 名の妊娠性絨毛癌患者、1 名の非妊娠性絨毛癌患者の STR 解析を行った。平成 30 年度は新たに 8 名の、臨床的に診断された妊娠性絨毛癌患者を対象とした。治療中の 1 名については、患者本人およびパートナーに研究についての説明を行い、文書にて同意を得た。残りの 7 名については名古屋大学産婦人科のホームページ上で、オプトアウトとして対応した。

### (2) 絨毛癌組織、及び正常組織からの DNA 抽出

手術時に作製された病理組織ブロックから、10  $\mu\text{m}$  切片を RNase-Free フォイル付きスライド上に作製し、LMD7000 (Leica) を用いたレーザーマイクロダイゼクション (LMD) により、絨毛癌部組織、及び正常組織をそれぞれ分離した。分離された組織は、PicoPure DNA Extraction Kit (ThermoFisher Scientific) に付属する DNA Reconstruction buffer 及び Proteinase K 入りのチューブに直接投入し、キットのプロトコールに従って DNA 抽出液を作製した。

### (3) 患者本人、パートナーからの DNA 採取

同意を得られた患者及びパートナーから、オムニスワブを用いて採取した口腔内粘膜について、QIAamp DNA Micro kit (QIAGEN) を用いて、キットのプロトコールに従って DNA 抽出を行った。

### (4) DNA 定量

患者及びパートナーから抽出した DNA について、Qubit 3.0 フルオロメーター (ThermoFisher Scientific) を用いて DNA 量を定量した。

### (5) STR 解析

患者及びパートナーから抽出した DNA、並びに手術時に得られた絨毛癌組織、及び正常組織から抽出した DNA を、1 ng/ $\mu$ L 溶液に調整した。これら調整 DNA 溶液各 1  $\mu$ L について、AmpFlSTR Identifilter™ plus PCR amplification キット (ThermoFisher Scientific) を用いて、15 ローカスの STR および性別判定用マーカー (アメロゲニン) を PCR 増幅した。増幅された産物を、プロトコールに従って、Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems) を用いてキャピラリー電気泳動した後、GeneMapper ID v3.2 ソフトウェアにより型判定を行った。

### (6) 免疫染色

絨毛癌組織のパラフィンブロックより 4  $\mu$ m 切片のプレパラートを作製し、脱パラ後、Dako Target Retrieval Solution を用いて抗原不活化を行った (95°C、40 分)。PBS 洗浄後、1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加メタノール 150ml で 30 分室温静置し (内因性ペルオキシダーゼ処理)、PBS 洗浄を行った。正常ヤギ血清によりブロッキング (室温、10 分) の後、一次抗体として抗 MDR1 抗体、抗 DHFR 抗体、抗 PD-L1 抗体をそれぞれ希釈し添加 (室温、90 分)。PBS 洗浄後、二次抗体 (SAB-PO キット) 添加、PBS 洗浄後、DAB 発色を行った。

## 3. 研究結果

STR 解析の結果を表 1 に示す。いずれの患者も臨床的に妊娠性絨毛癌と診断されており、STR 解析の結果もそれを支持するものであった。詳細な内訳としては、8 名中 2 名 (患者 7、8) が胎状奇胎由来と判定され、正常妊娠または流産由来と判定されたものは 2 名 (患者 1、4)、妊娠性であるのは確実であるが、胎状奇胎由来なのか、それら以外 (正常妊娠または流産) なのか、どちらとも断定できないと判定されたものは 4 名 (患者 2、3、5、6) であった。

現在治療中、または経過観察中の 2 名の患者 (患者 1、4) については患者本人、及び、パートナーの口腔粘膜から DNA を採取することができ、これらの STR 解析はすべてのローカスにおいて可能で、コントロールとして十分に評価に耐えうるものであった。

一方、経過観察が終了している残りの 6 名の患者 (患者 2、3、5、6、7、8) に関しては、

患者本人、及び、パートナーの口腔粘膜から DNA を採取することができず、患者本人の組織切片の非癌部分から採取した DNA をコントロールとして用いざるを得なかった。そのため、正常組織として肺を用いた患者 6 は、組織採取量が少なかったためか、多くのローカスで STR 解析が不能であった。また、手術日がかなり古い患者 8 でも、多くのローカスで STR 解析が不能であった。

以上のような解析状況の中で、患者本人と絨毛癌組織の STR 解析の結果が完全に一致、すなわち非妊娠性絨毛癌と判定された患者は存在しなかった。逆に、患者本人のゲノムが全く関与していないと判断された患者は 2 名（患者 7、8）であり、これらは胎状奇胎由来と考えられた。さらに、患者 8 は 1 精子受精胎状奇胎由来、患者 7 は 2 精子受精胎状奇胎由来であることが明らかとなった。

正常妊娠または流産由来とはっきりと判定されたものは 2 名（患者 1、4）であり、これらの患者はいずれも、そのパートナーの口腔粘膜から DNA を抽出できた症例であった。残りの 4 名（患者 2、3、5、6）は、妊娠性であるのは確実であるが、パートナーの口腔粘膜から DNA を抽出できなかったため、胎状奇胎由来なのか、それら以外（正常妊娠または流産）なのか、はっきりと判定することができなかった。

詳細な妊娠、分娩歴が判明している 2 名（患者 1、4）は、いずれも胎状奇胎妊娠の既往はなく、臨床的に正常妊娠または流産に由来する絨毛癌と考えられていたが、今回の STR 解析の結果は、それを支持するものであった。すなわち、この 2 名は、患者本人、及び、そのパートナーの口腔粘膜から DNA が採取できていた症例であり、絨毛癌組織のゲノムは、患者本人とパートナーのそれぞれのゲノムの関与を示唆するものであったため、正常妊娠または流産に由来する絨毛癌と判定した。

免疫染色の結果、絨毛癌細胞に PD-L1 の強い発現を認めたが、PD-L1、MDR1、DHFR の発現は初回寛解群と薬剤耐性群（再発、死亡を含める）において差を認めなかったため、条件設定を変更し再検討する予定である。

#### 4. 考察

今回、臨床情報に基づいて妊娠性と診断された絨毛癌 8 名の STR 解析を行った。STR 解析に基づく遺伝学的診断はいずれも妊娠性であり、絨毛癌の発生源に関して、臨床情報に基づく診断が STR 解析に基づく遺伝学的診断とは大きく異なっていないことが示唆され

た。また、妊娠歴として明確な胞状奇胎既往のない患者に発生した絨毛癌は、正常妊娠または流産の際の絨毛が、絨毛癌発生起源であることが確認された。

今回解析した 8 名中 2 名のみが、患者本人、及び、そのパートナーの口腔粘膜から DNA を採取することでき、残りの 6 名はコントロールとして、患者の非癌部分の組織からしか DNA を採取できず、パートナーの DNA は採取できなかった。この 6 名のうち 2 名は、絨毛癌組織のゲノムに対して、患者本人のゲノムの関与が全くなく、胞状奇胎由来絨毛癌と診断することが可能であった。残りの 4 名に関しては、少なくともパートナーのゲノムの関与があり、妊娠性であることは確実であるが、それが胞状奇胎由来であるか、正常妊娠または流産由来であるかは、パートナーの DNA が採取できていないため、鑑別不可能であり、今回の研究の限界を示す形となった。

今回の絨毛癌の STR 解析により、絨毛癌は次のように 3 つのタイプに分類することが可能であることが示唆された。A. 患者本人のゲノムの関与しかない、すなわち、パートナーのゲノムの関与がない絨毛癌（＝非妊娠性絨毛癌）。B. 患者本人、及び、パートナーのゲノムの関与がある絨毛癌（＝正常妊娠または流産または部分胞状奇胎に由来する絨毛癌）。C. 患者本人のゲノムの関与が全くない、すなわち、パートナーのゲノムの関与しかない絨毛癌（＝全胞状奇胎由来絨毛癌）。これらの分類が、化学療法反応性、生命予後にどのように影響するのか、腫瘍免疫学的側面から今後検討する必要があるかもしれない。

## 5. 文献

1. Fisher RA, Newlands ES, Jeffrey AJ, Boxer GM, Begent RH, Rustin GJ, Bagshawe KD. Gestational and nongestational trophoblastic tumors distinguished by DNA analysis. *Cancer*, 69(3):839-45, 1992
2. Kajii T, Ohama K. Androgenetic origin of hydatidiform mole. *Nature*, 268(5621):633-634, 1977
3. Jacobs PA, Szulman AE, Funkhouser J, Matsuura JS, Wilson CC. Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole. *Ann Hum Genet*, 46(Pt 3):223-231, 1982

4. Yamamoto E, Niimi K, Shinjo K, Yamamoto T, Fukunaga M, Kikkawa F. Identification of causative pregnancy of gestational trophoblastic neoplasia diagnosed during pregnancy by short tandem repeat analysis. *Gynecol Oncol Case Rep*, 9:3-6, 2014
5. Yamamoto E, Ino K, Yamamoto T, Sumigama S, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F. A pure nongestational choriocarcinoma of the ovary diagnosed with short tandem repeat analysis: case report and review of the literature. *Int J Gynecol Cancer*, 17(1):254-258, 2007
6. Lee YH, Yang HW, Yang LC, Lu MY, Tsai LL, Yang SF, Huang YF, Chou MY, Yu CC, Hu FW. DHFR and MDR1 upregulation is associated with chemoresistance in osteosarcoma stem-like cells. *Oncol Lett*. 2017;14(1):171-179.
7. Hung JJ, Yeh YC, Jeng WJ, Wu KJ, Huang BS, Wu YC, Chou TY, Hsu WH. Predictive value of the international association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification of lung adenocarcinoma in tumor recurrence and patient survival. *J Clin Oncol*. 2014;32(22):2357-1264.