

新規卵巣明細胞癌マーカー TFPI2 の臨床的有用性

大 竹 則 久*¹
 明 庭 昇 平*¹
 新 谷 晃 司*²
 荒 川 憲 昭*³
 平 野 久*³
 宮 城 悦 子*⁴

Clinical Significance of Tissue Factor Pathway Inhibitor 2, a Novel Serum Biomarker for Diagnosis of Ovarian Clear Cell Carcinoma

Norihisa OHTAKE
 Shohei MYOBA
 Koji SHINTANI
 Noriaki ARAKAWA
 Hisashi HIRANO
 Etsuko MIYAGI

Ovarian clear cell carcinoma (OCCC) is intrinsically resistance to conventional taxane-platinum combination chemotherapy, and a highly lethal histological subtype in epithelial ovarian cancer (EOC). We identified tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) as a novel specific serum biomarker candidate for OCCC by a proteome-based approach. Furthermore, we measured serum TFPI2 levels in a retrospective training set (n=268) and a prospective validation set (n=156) consisting of patients with benign and borderline ovarian tumors, EOC subtypes, and uterine diseases. Serum TFPI2 levels were specifically elevated only in OCCC patients, consistent with the mRNA expression pattern in tumor tissues. Our results revealed that TFPI2 is useful for preoperative clinical diagnosis of OCCC and monitoring of malignant transformation from endometriosis to OCCC in the future.

1. 背 景

[1] 卵巣癌の現状

本邦における卵巣癌の罹患数・死亡数は共に増加傾向にあり、国立がん研究センターの2015年がん統計予測では罹患数10,400人、死亡数4,800人とされ、婦人科悪性腫瘍の中で最も死亡数が多い疾患である。卵

巣癌は漿液性、類内膜、粘液性、そして明細胞と主に4つの組織型に分類される。その中でも、明細胞癌は①他の組織型と比べて抗癌剤が効きにくく予後不良例が多く¹⁾、②日本における明細胞癌の発生頻度は欧米に比べて有意に高く（欧米：約5%、日本：約23%）、③明細胞癌は子宮内膜症を母地として高頻度に発生する²⁾ことが報告されており、本邦主導で卵巣明細胞癌診断／治療法の改善に向けた検討が進んでいる^{3,4)}。

*1 バイオサイエンス事業部 第一開発部 技術グループ
 *2 バイオサイエンス事業部 第一開発部
 *3 横浜市立大学 先端医学研究センター
 *4 横浜市立大学 大学院医学研究科 産婦人科学

[2] 卵巣癌の診断

卵巣腫瘍は術前に血液検査や画像診断による精密検査にて悪性度を推定するが、良性・境界悪性・悪性の組織学的分類は術後の病理検査で初めて確定される。代表的な卵巣癌マーカーである CA125 は、卵巣癌全般の検出には優れたものの、①組織型の鑑別性能を有していない、②明細胞癌の陽性率が低い、③良性腫瘍である子宮内膜症で高値となり内膜症からの明細胞癌発症を正確に診断することができないといった問題がある。その結果、明細胞癌症例の対応の遅れや疾患の偽陽性判定による良性疾患の過剰治療、それに伴う患者の QOL の低下が喫緊の問題となっている。

新規卵巣癌マーカータンパク質として数多くの論文が報告されている中、HE4⁵⁾ と Ova1 test⁶⁾ が FDA 承認を受けて米国で臨床応用されている。しかし、これらのマーカーは卵巣腫瘍における卵巣癌全般の検出精度向上や卵巣癌のリスク判定を目的としており、卵巣癌組織型を鑑別するものではない。従って、卵巣明細胞癌の診断、治療効果および経過観察を的確に管理するために、特異度の高い卵巣明細胞癌マーカーの開発が必要とされている。これまで、我々は卵巣癌細胞株の培養上清を起点にプロテオーム解析（タンパク質）およびトランスクリプトーム解析（遺伝子）により新規卵巣明細胞癌マーカー候補を探索し、組織因子経路インヒビター 2 (TFPI2) を候補タンパク質として見出し、自動免疫診断試薬 (AIA) にて臨床評価を実施してきた^{7) 8)}。これまでの研究経緯と今後の展望を報告する。

2. 卵巣明細胞癌マーカー探索

[1] プロテオーム解析

本研究では血液診断用の新規マーカー探索を目的として、癌細胞株から培養上清中に分泌または放出されるタンパク質（セクレトーム）に焦点を当て、プロテオミクスによる網羅的比較解析を行った。

卵巣明細胞癌細胞株 4 種類 (OVTOKO, OWISE, OVMANA および OVSAYO)、卵巣漿液性癌細胞株 2 種類 (OVSAHO および OVKATE) および卵巣粘液性癌 2 種類 (RMUG-S および MCAS) を無血清培地で培養後、培養上清中のタンパク質を脱塩・濃縮し、還元アルキル化およびトリプシン消化後に LC-MS/MS 解析を実施した。

LC-MS/MS 解析により卵巣明細胞癌群 (891 種)、卵巣漿液性癌群 (1085 種)、卵巣粘液性癌群 (948 種) のタンパク質が同定された。3 群を統合した結果 (Fig. 1)、CA125 は 3 群に共通するタンパク質として分類

され、FDA に認可された卵巣癌検査方法 OVA1 テストの対象タンパク質である $\beta 2$ -マイクログロブリン、アポリipoprotein A1 およびセロトランスフェリンもいずれかの群に含まれていることが明らかとなった。そこで、新規卵巣明細胞癌マーカー候補として明細胞癌特異的な 148 種のタンパク質に焦点を当てた。

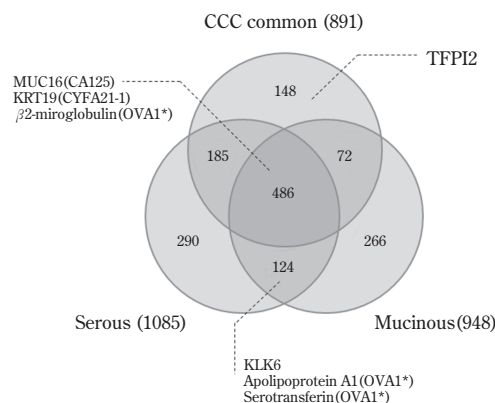


Fig. 1 Venn diagrams show overlap between the 891 proteins common to CCC cell lines and the set of proteins identified in serous- and mucinous-type ECC cell lines. Asterisks (*) indicate the biomarker used in the OVA1 test.

[2] トランスクリプトーム解析

次に、遺伝子発現情報による絞り込みを目的として、RCAI RefDIC データベース (<http://refdic.rcai.riken.jp>) により 148 種の卵巣明細胞癌マーカー候補遺伝子の Gene Ontology (GO) 分類にて「分泌／細胞外」に分類される 30 種のタンパク質遺伝子に絞り込んだ。さらに、主要臓器における遺伝子発現データ、並びに、卵巣癌細胞株 (8 種) および卵巣組織 (正常、良性および悪性腫瘍、計 14 種類) の遺伝子発現量を real-time RT-PCR にて解析し、卵巣明細胞癌のみで遺伝子発現が上昇する TFPI2 を有力な卵巣明細胞癌マーカー候補として選定した (Fig. 2)。

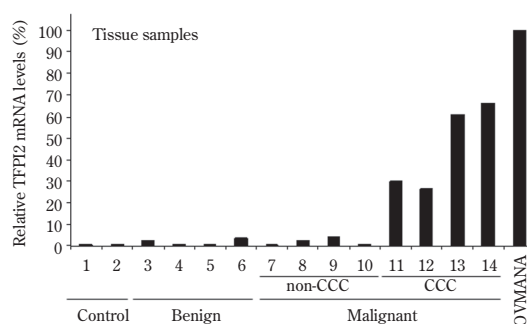


Fig. 2 TFPI2 mRNA levels in various ovarian tissue samples were evaluated by real-time PCR. Data were normalized against β -actin mRNA levels.

3. TFPI2 免疫測定試薬の構築

患者血液を簡便かつ高精度に解析するために、抗体を用いた酵素免疫測定法（イムノアッセイ）の構築を試みた。一般的な抗体作製方法は、大腸菌等の宿主を用いた組換えタンパク質、また当該タンパク質の部分領域からなるオリゴペプチドを免疫源として用いる。しかし、TFPI2は複数のジスルフィド結合を介した複雑な高次構造を取っており、生体内のTFPI2の立体構造を反映しないオリゴペプチド、あるいは、調製過程で立体構造が変化したタンパク質を免疫源として使用した場合、得られた抗体が生体内のTFPI2に対して高い特異性や結合力を有していない可能性が類推される。そこで本研究では、DNAワクチン手法を応用したプラスミドDNA免疫法による抗TFPI2モノクローナル抗体作製を行った。60種以上の抗TFPI2モノクローナル抗体を得た後、TFPI2の構造類縁体であり血中に豊富に含まれるTFPI1（いわゆるTFPI）と交叉しない10種類の抗TFPI2モノクローナル抗体を選抜した。

TFPI2免疫測定試薬は2種類の抗TFPI2抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法（EIA）である。磁性ビーズに固定化した抗TFPI2抗体とアルカリ性ホスファターゼ標識された抗TFPI2抗体を含む免疫反応溶液が、凍結乾燥体として試薬カップに封入されている。この試薬カップに検体と分注水を注入すると、凍結乾燥試薬が溶解され免疫反応が開始される。37℃、10分間の反応後、未反応の検体成分と未反応の酵素標識抗体をB/F分離により洗浄除去する。蛍光基質である4-メチルウンベリフェリルりん酸（4MUP）を分注後、経時的に蛍光強度を測定し単位時間あたりの4-メチルウンベリフェロン（4MU）の生成量を測定する。既知濃度のTFPI2タンパク質を含む標準品を用いて、各種TFPI2濃度の蛍光強度から検量線を作成することで、患者検体中のTFPI2濃度の定量が可能となる。測定の際、検体のカップへの分注、一定時間下での免疫反応、B/F分離、基質分注、蛍光強度の測定は自社自動免疫測定装置（AIA-2000、AIA-1800、AIA-900、AIA-600II、AIA-360）にて自動で行われ、測定開始から約20分後に測定結果が得られる。

選抜した10種類の抗TFPI2抗体を用いて、測定シグナル強度（力価）、再現性、安定性等を指標にサンドイッチEIAに最適な抗体ペアを選定し、免疫反応溶液組成の最適化（pHおよび添加剤等）を行い、TFPI2免疫測定試薬を構築した。

4. 臨床評価

[1] 欧米人検体による評価

健康人 $n = 30$ 、子宮内膜症 $n = 30$ および卵巣明細胞癌 $n = 50$ の欧米人購入検体（IVT社製、IC取得済）を対象に、TFPI2免疫測定試薬にて血中TFPI2を測定した。その結果、血中TFPI2濃度は健康者や子宮内膜症と比べて明細胞癌にて有意に高く、適切なカットオフ値を設定することでCA125陰性（35 U/mL未満）の卵巣明細胞癌症例においても高頻度に陽性と検出可能なことを見出した（Fig. 3）。

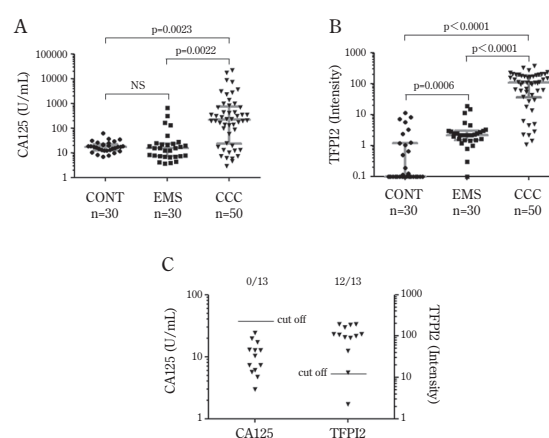


Fig. 3 Serum levels of CA125 (A) and TFPI2 (B) were measured in 50 CCC patients, 30 endometriosis patients (EMS), and 30 healthy controls (CONT). Statistical analysis was performed by nonparametric Mann-Whitney U test. (C) TFPI2 levels in sera from 13 CCC patients with normal CA125 levels (< 35 U/mL)

[2] 日本人検体による評価

横浜市立大学および奈良県立医科大学にて収集した卵巣腫瘍および子宮腫瘍含む婦人科腫瘍患者術前血清（Training set：保管検体 $n = 268$ 、Validation set：前向き収集検体 $n = 156$ 、計 424 症例、Table. 1）を対象に、TFPI2 および CA125 を測定した（UMIN: 000007501）。

(1) Training set（保管検体）

Training set ($n = 156$) において、CA125 は卵巣子宮内膜症および卵巣癌全般で高値傾向を示した（Fig. 4 A）。CA125 は卵巣がんマーカーとして非常に有用なものの、卵巣子宮内膜症でも高値を示す例が散見された。一方、TFPI2 は卵巣明細胞群においてのみ特異的な高値傾向を示すことが明らかとなった（Fig. 4 B）。

Table 1 Sources of samples

Histology	Serum Samples		
	Training Set		Validation Set
	YCU	NMU	YCU
Benign ovarian tumor	56	58	40
Non-EMS	43		23
EMS	13	58	17
Borderline ovarian tumor	7	1	15
Ovarian cancer	42	66	38
CCC	11	18	7
Serous	10	17	17
Endometrioid	7	21	4
Mucinous	5	3	4
Other	9	7	6
Uterine disease	38		58
Uterine fibroids	5		17
Cervical cancer	18		15
Endometrial cancer	15		26
Other disease			5
Total	143	125	156

Abbreviations : YCU, Yokohama City University, NMU, Nara Medical University ; EMS, endometriosis

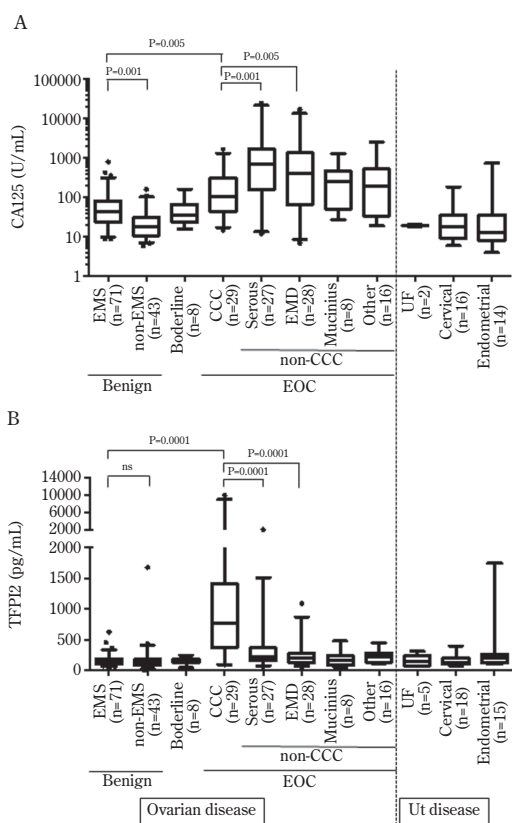


Fig. 4 Distribution of CA125 (A) and TFPI2 (B) levels in serum samples from patients with CCC and other gynecological diseases (retrospective training set, n = 268).

Abbreviations: EMS, endometriosis; Ut, Uterin tumor; UF, uterine fibroids. Box plots display 5th, 25th, 50th (median, middle horizontal line), 75th, and 95th, percentiles. Statistical analysis was performed by nonparametric Mann-Whitney U test.

(2) 卵巣明細胞癌鑑別性能の検証

卵巣癌疑い時の術前精密検査（卵巣明細胞癌、卵巣境界悪性腫瘍および卵巣明細胞癌を除く卵巣悪性腫瘍）、または卵巣子宮内膜症からの卵巣明細胞癌発症診断（卵巣明細胞癌および卵巣子宮内膜症）を想定し、TFPI2とCA125の卵巣明細胞癌鑑別性能をROC解析にて比較した。CA125は卵巣境界悪性腫瘍含む卵巣悪性腫瘍（AUC 0.636, Fig. 5 A点線）、卵巣子宮内膜症（AUC 0.700, Fig. 5 B点線）のいずれにおいても、卵巣明細胞癌の鑑別性能は比較的低い結果を示した。一方、TFPI2は卵巣境界悪性腫瘍含む卵巣悪性腫瘍において高い卵巣明細胞癌鑑別性能を有し（AUC : 0.854, Fig. 5 A実線）、卵巣子宮内膜症と卵巣明細胞癌の鑑別性能も非常に高いことが示された（AUC 0.924, Fig. 5 B実線）。

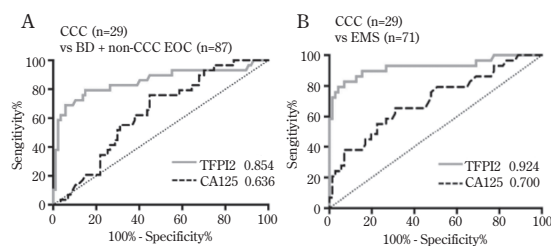


Fig. 5 ROC and AUC values for serum CA125 and TFPI2 levels in discrimination of CCC from other ovarian diseases (borderline and non-CCC EOCs) (A), CCC versus EMS (B). Line: TFPI2, Dotted line: CA125.

(3) Validation set (前向き収集)

卵巣癌疑い時の術前精密検査(卵巣明細胞癌、卵巣境界悪性腫瘍および卵巣明細胞癌を除く卵巣悪性腫瘍)時のTFPI2カットオフ値をYouden Index(感度-100-特異度)最大値から設定した。横浜市立大学にて新たに前向き収集されたValidation set(卵巣腫瘍検体(n=156))を用いて、設定したカットオフ値の妥当性を検証したところ、高い卵巣明細胞癌鑑別性能(感度71.4%、特異度85.7%、AUC 0.797)が再現された。

(4) 早期癌の診断性能とCA125との相補性

早期卵巣明細胞癌(FIGO I/II)/後期卵巣明細胞癌(FIGO III/IV)および卵巣子宮内膜症を対象に、CA125とTFPI2の卵巣明細胞癌診断性能と相補性、Training setとValidation setの連続性を検証した。CA125においては早期卵巣明細胞癌と卵巣子宮内膜症の間に統計的な有意差が認められなかった(Fig. 6 A)。一方、TFPI2は早期卵巣明細胞癌と卵巣子宮内膜症に顕著な有意差が認められた(p<0.0001, Fig. 6 B)。本結果は、TFPI2が卵巣子宮内膜症からの卵巣明細胞癌発症の早期発見に有用な可能性を示唆するものである。

CA125とTFPI2の相関分析の結果、両マーカー値の間には強い相関関係は認められなかった(スピアマン相関係数r=0.26(training), 0.61(Validation), Fig. 7)。また、早期明細胞癌の陽性率を比較すると、CA125およびTFPI2はいずれも単独では50%の陽性率となった。しかし、CA125とTFPI2を組み合わせることで、陽性率は約90%(20/22)に向上することが明らかとなった。このことから、TFPI2は卵巣明細胞癌マーカーとして高い特異性を有するのみならず、CA125との同時測定により卵巣明細胞癌検出の感度向上にも期待できると考えられた。

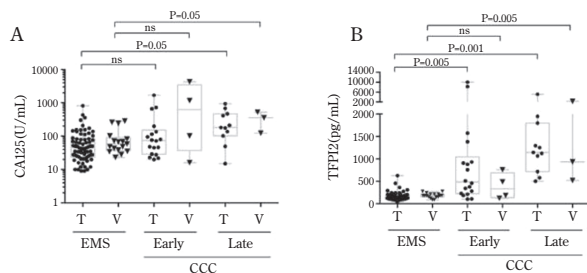


Fig. 6 Distribution of serum CA125(A) and TFPI2(B) levels in Endometriosis (EMS) and CCC patients at early/late stages. CCC patient groups in training (T) and validation (V) sets were divided into early (FIGO I/II) and late (FIGO III/IV) stages. Statistical analysis was performed by nonparametric Mann-Whitney U test.

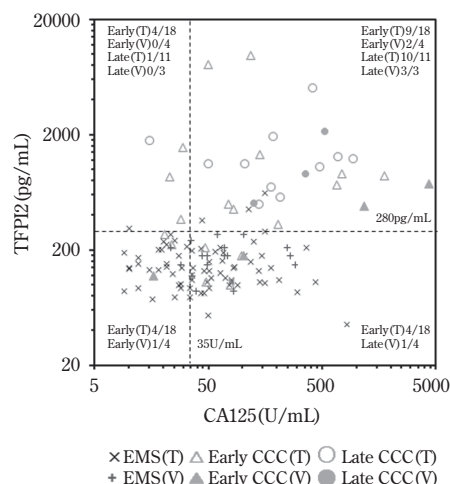


Fig. 7 Correlation of serum TFPI2 levels vs. serum CA125 levels in CCC and EMS patients. Two-dimensional scatter graphs show serum levels vs. TFPI2 and CA125 in patients with CCC or EMS in the training (T) and validation (V) sets.

5. 総 括

TFPI2は胎盤タンパク質5(PP5)と同一分子であり、共著者である横浜市立大学産婦人科学 宮城悦子らにより分泌型セリンプロテアーゼインヒビターとして報告されている⁹⁾。胎盤および妊婦血清で発現亢進することから、周産期における血液凝固系への関与が考察されている分子である^{10, 11)}。癌との関連に関しては浸潤転移を抑制するがん抑制遺伝子と考えられているが¹²⁾、多くの癌種でTFPI2 DNAプロモーターにメチル化修飾を受けていることが明らかとなり、メチル化修飾を指標とした遺伝子診断ターゲットとして様々な癌種を対象に臨床研究が進められている¹³⁻¹⁶⁾。

本研究では卵巣明細胞癌マーカー探索を目的とし、卵巣癌細胞株の培養上清を起点にプロテオーム解析(タンパク質)およびトランスクリプトーム解析(遺伝子)からTFPI2を見出し、TFPI2免疫測定試薬を作成して500症例を超える血清検体を用いて、TFPI2の卵巣明細胞癌血液診断マーカーとしての臨床的有用性を確認した。卵巣明細胞癌は比較的進行例が少なく(約50%がFIGO I期で診断)、静脈血栓症の頻度が高いことを鑑みると、TFPI2が卵巣明細胞癌の増殖抑制、並びに、血液凝固系の異常に直接または間接的に関与している可能性が強く示唆される。現在、横浜市大を中心とした複数の国内臨床施設において卵巣明細胞癌とTFPI2の関係解明に向けた基礎的研究と臨床応用に向けたトランスレーショナルリサーチを遂行している。

TFPI2免疫測定試薬が卵巣癌診療に臨床応用されれば、血液検査において高い精度で明細胞癌と推察する

ことが可能となる。その結果、卵巣明細胞癌の早期発見（診断）、治療法選択、並びに、経過観察（治療効果判定／再発）の一助となり、上皮性卵巣腫瘍の診断・治療・経過観察の的確な管理への貢献が期待される。

6. 謝 辞

本研究は文部科学省イノベーションシステム整備事業「翻訳後修飾プロテオミクス拠点形成」プログラムの研究成果である。また、臨床検体の提供や研究方針策定に多大なご協力をいただいた奈良県立医科大 産婦人科学 小林 浩 教授、神奈川県立がんセンター 臨床研究部 宮城 洋平 部長、横浜市立大学 臨床統計学 山中 竹春 教授に心より感謝申し上げます。

7. 文 献

- [1] Sugiyama, T., et al., *Cancer*, 88 (11), 2584 (2000)
- [2] Kobayashi, H., et al., *Int J Gynecol Cancer*, 17 (1), 37 (2007)
- [3] Takakura, S., et al., *Int J Gynecol Cancer*, 20 (2), 240 (2010)
- [4] Kashiyama, T., et al., *PLoS One*, 9 (2), e87220 (2014)
- [5] Fujiwara, H., et al., *Tumor Biol*, 36 (2), 1045 (2015)
- [6] Bristow, R. E., et al., *Am J Obstet Gynecol*, 209 (6), 581 (2013)
- [7] Arakawa, N., et al., *J Proteome Res*, 12 (10), 4340 (2013)
- [8] Arakawa, N., et al., *PLoS One*, 11 (10), e0165609 (2016)
- [9] Miyagi, Y., et al., *J Biochem*, 116 (5), 939 (1994)
- [10] Udagawa, K., et al., *Placenta*, 23 (2), 145 (2002)
- [11] Ogawa, M., et al., *Placenta*, 28 (2), 224 (2007)
- [12] Sierko, E., et al., *Semin Thromb Hemost*, 33 (7), 653 (2007)
- [13] Takada, H., et al., *Cancer Genet Cytogenet*, 197 (1), 16 (2010)
- [14] Hibi, K., et al., *Anticancer Res*, 30 (4), 1205 (2010)
- [15] Sun, F. K., et al., *Dig Dis Sci*, 58 (4), 1010 (2013)
- [16] Nigro, C. L., et al., *J Invest Dermatol* 133 (5), 1278 (2013)