

「国立病院機構共同臨床研究 平成31年度NH0ネットワーク共同研究」
「免疫組織化学的バイオマーカーによる子宮間葉性腫瘍の予後予測
法の技術の事業化検証」



独立行政法人 国立病院機構
京都医療センター
National Hospital Organization Kyoto Medical Center

免疫組織化学的バイオマーカーによる子宮間葉性腫瘍 の予後予測法の確立に関する研究 (PRUM-IBio study)

https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000044182



START



**独立行政法人 国立病院機構 京都医療センター
高度がん治療センター**

**京都大学医学部附属病院連携 癌ゲノム医療
林 琢磨 がん医療、癌ゲノム医療 室長**

<https://kyoto.hosp.go.jp/html/guide/medicalinfo/clinicalresearch/expand/gan.html>

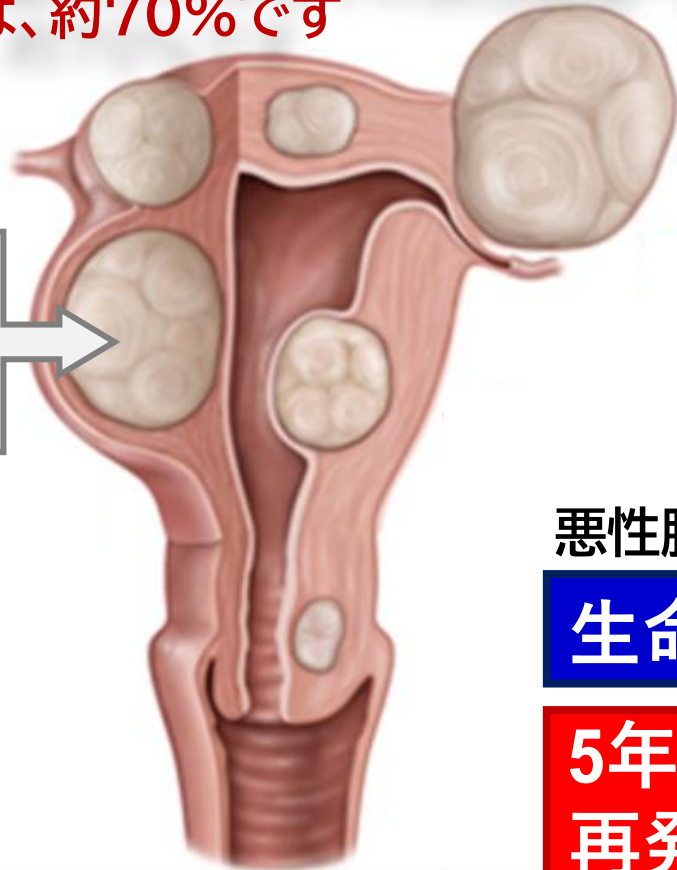
子宮間葉性腫瘍について

子宮の平滑筋層で発症する腫瘍は間葉性腫瘍です

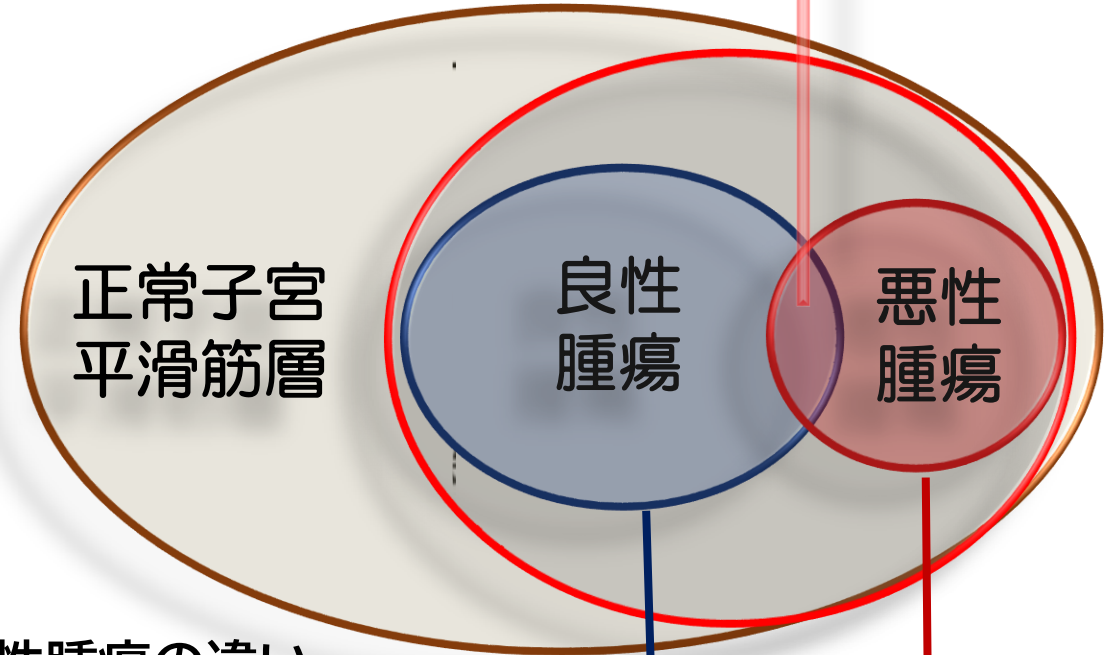
がん(上皮細胞系悪性腫瘍)と異なり、子宮間葉性腫瘍の外科病理診断が困難な症例が少なくないです

人種間無く50歳以上の女性での良性腫瘍:子宮筋腫の罹患率は、約70%です

外科病理診断が困難な腫瘍が混在しています



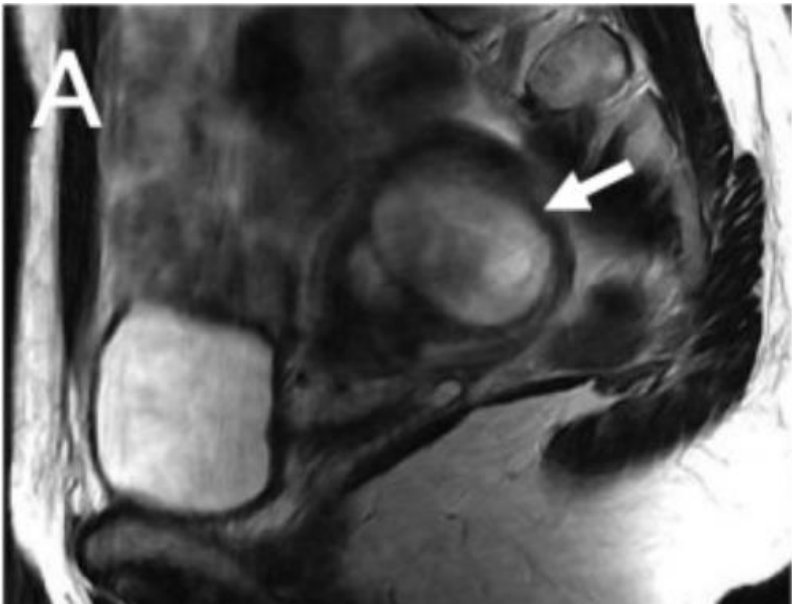
実臨床での問題点
良性・悪性の診断が困難な症例
STUMP, LMA with BN, etc



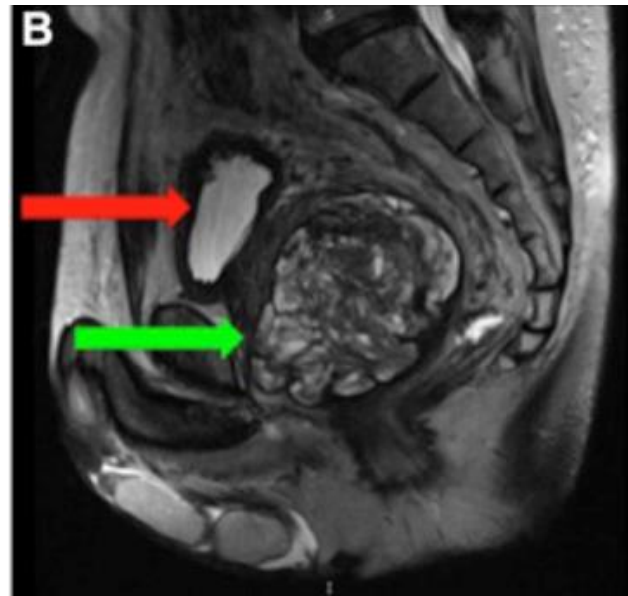
悪性腫瘍と良性腫瘍の違い

生命予後には関係しません

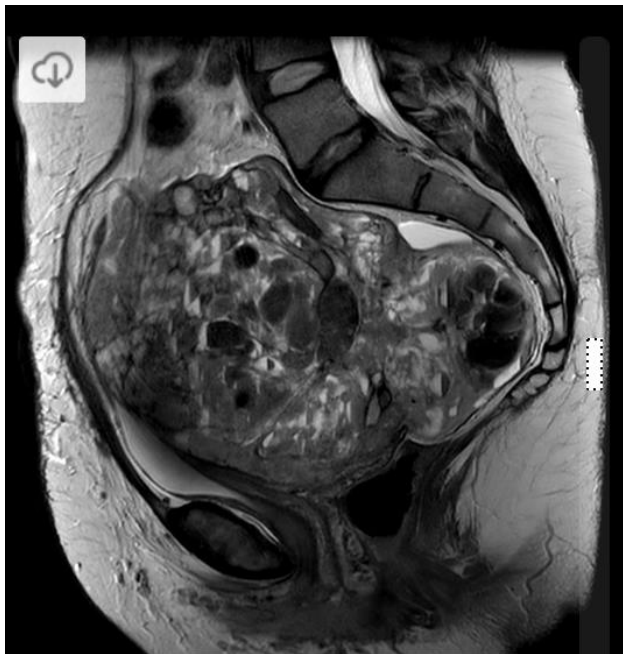
5年生存率は、20%前後であり、再発・転移が認められます



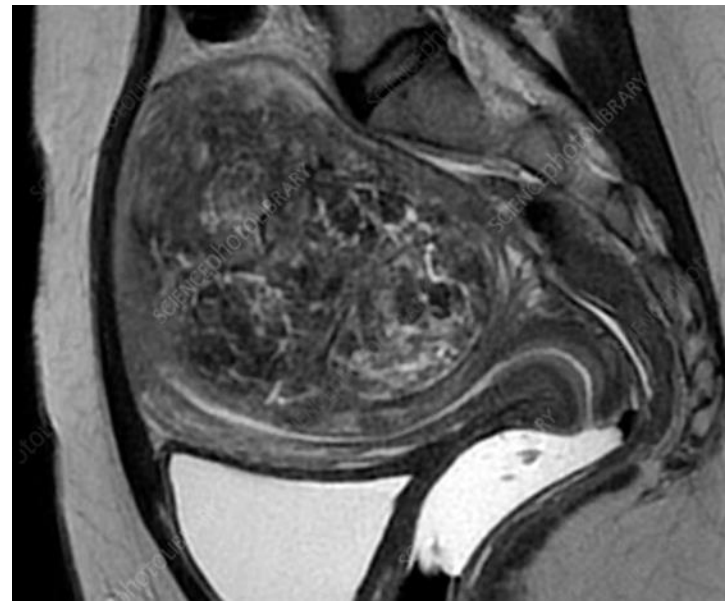
T2-weighted MRI of bizarre leiomyoma



T2 MRI demonstrating **STUMP** (green) urinary bladder (red arrows).

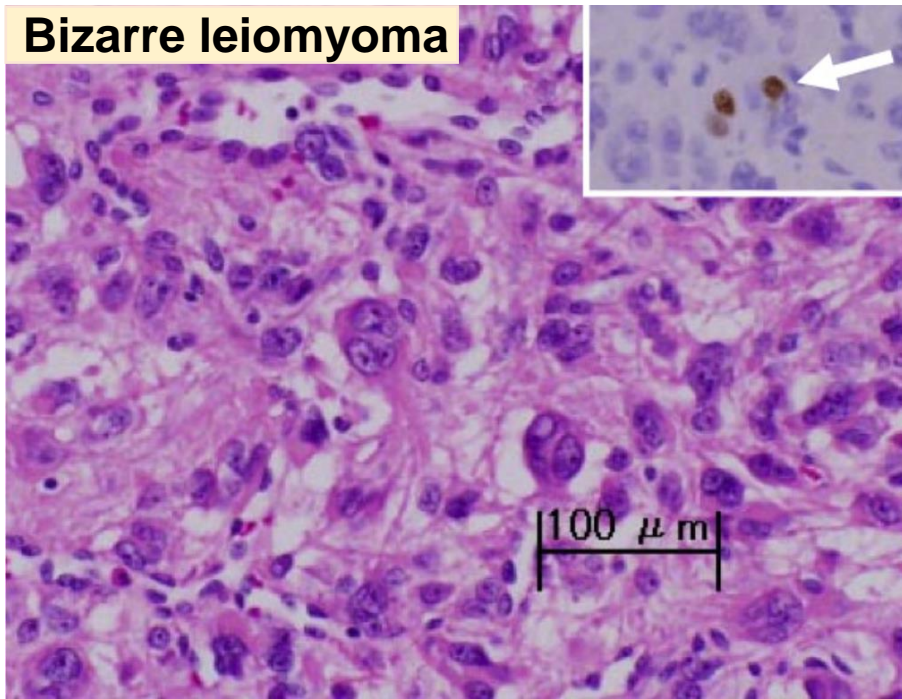


T2 MRI Uterine leiomyosarcoma

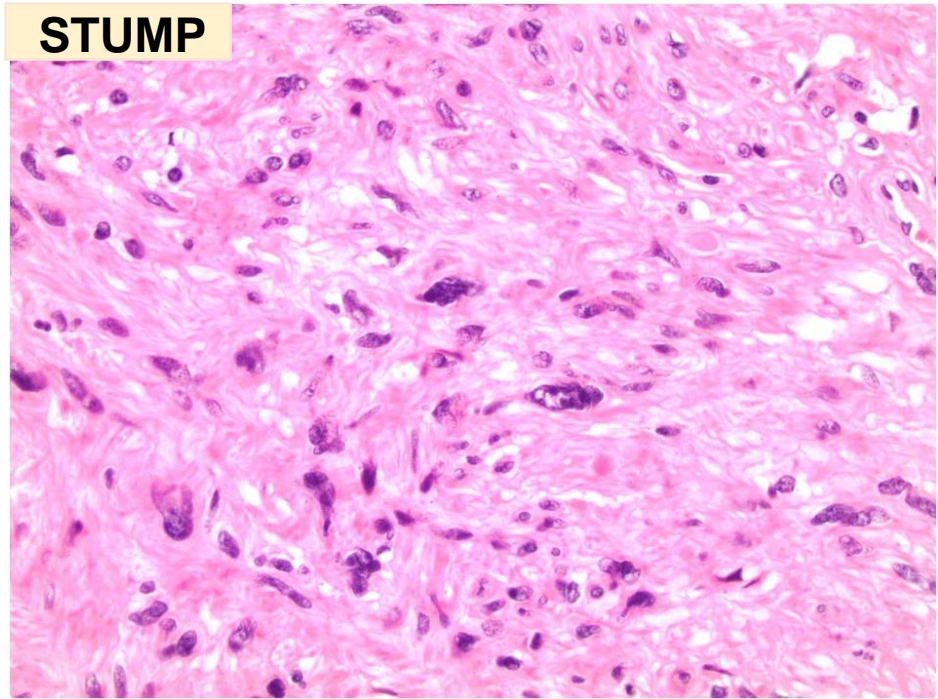


T2 MRI Leiomyoma

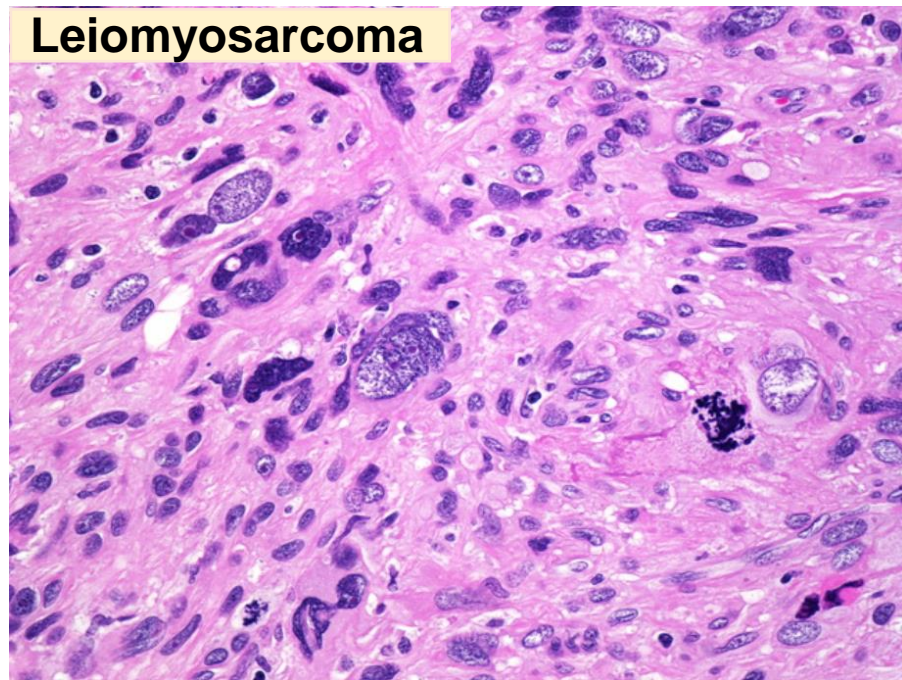
Bizarre leiomyoma



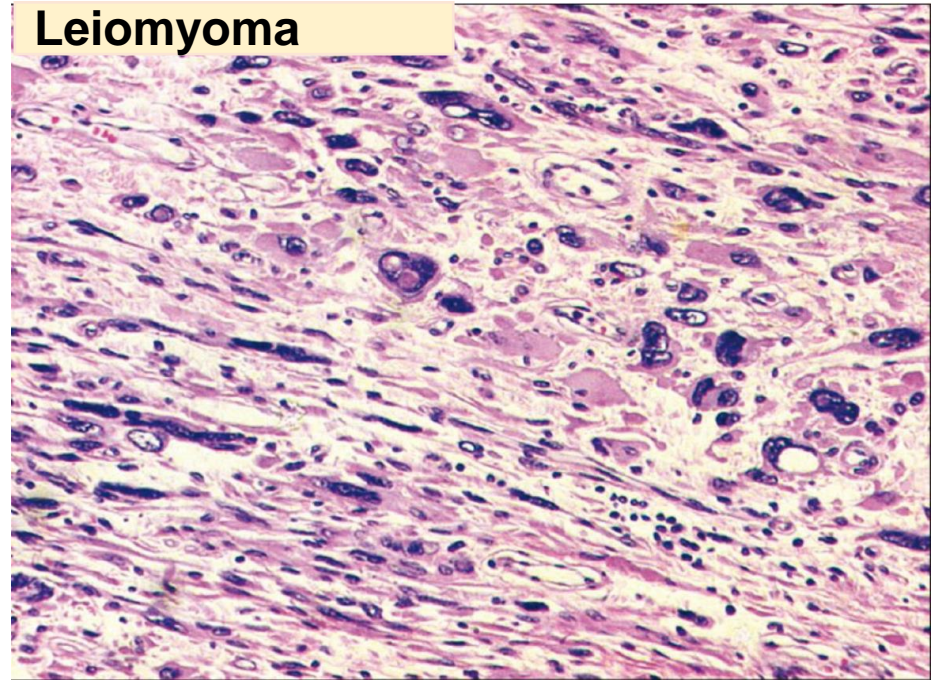
STUMP



Leiomyosarcoma



Leiomyoma



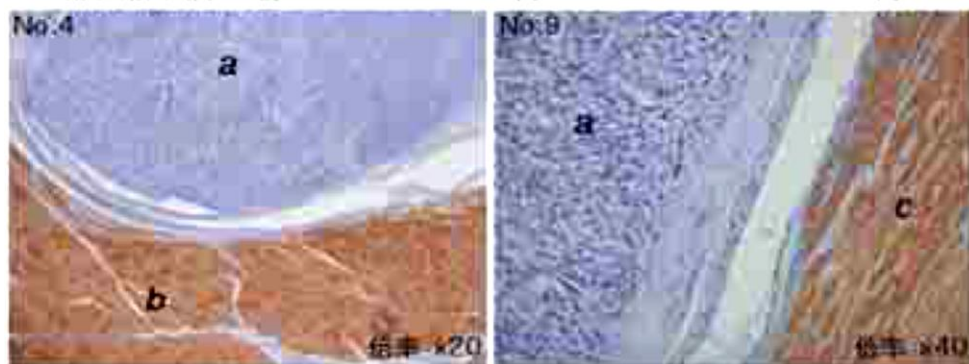
研究課題名:免疫組織化学的バイオマーカーによる子宮間葉性腫瘍の予後予測法の技術の事業化検証

研究課題/領域番号: STSC20001 (年度):2020年度

研究代表者:林 琢磨 独立行政法人国立病院機構京都医療センター

研究開始時の研究の概要:子宮間葉性腫瘍に対する悪性・良性の外科病理診断は、困難を伴う場合がある。実臨床において、特に、STUMPやLMS with Bizarre nucleiなどの悪性度の診断に対する客観的な診断法の確立が必要とされている。私達はプロテアソーム構成因子LMP2の欠損マウスで、子宮肉腫が高頻度に自然発症することを報告した(利根川 進 教授の研究協力)。

免疫組織化学染色: SIGMA-Aldrich 抗ヒトLMP2 モノクローナル抗体



a: 子宮平滑筋肉腫、b: 正常子宮平滑筋、c: 子宮平滑筋腫
(患者 No. 4 and No. 9,)

手術摘出組織を抗ヒトLMP2抗体を用いて免疫組織化学染色で検討を行なった。正常子宮平滑筋組織と子宮平滑筋腫において、LMP2の発現が認められた(茶色)が、子宮平滑筋肉腫においては、LMP2の発現がみとめられなかった(薄い青色)。

免疫組織化学的バイオマーカーとして、私達は、病理診断が困難な症例に対して **Caveolin、Cyclin B、Cyclin E、Ki-67とLMP2の5つの因子の色彩コンビネーション**で、子宮間葉性腫瘍に対する外科病理診断の**予後予測の術前での補助診断法の確立**を目的とします。

さらに、本研究成果を小さい規模のクリニック等でも簡便に行える「子宮間葉系腫瘍に対するリキッドバイオプシー血液・尿を用いた簡便な診断法」の確立へと応用する。



ノーベル賞受賞者 

受賞年: 1987年

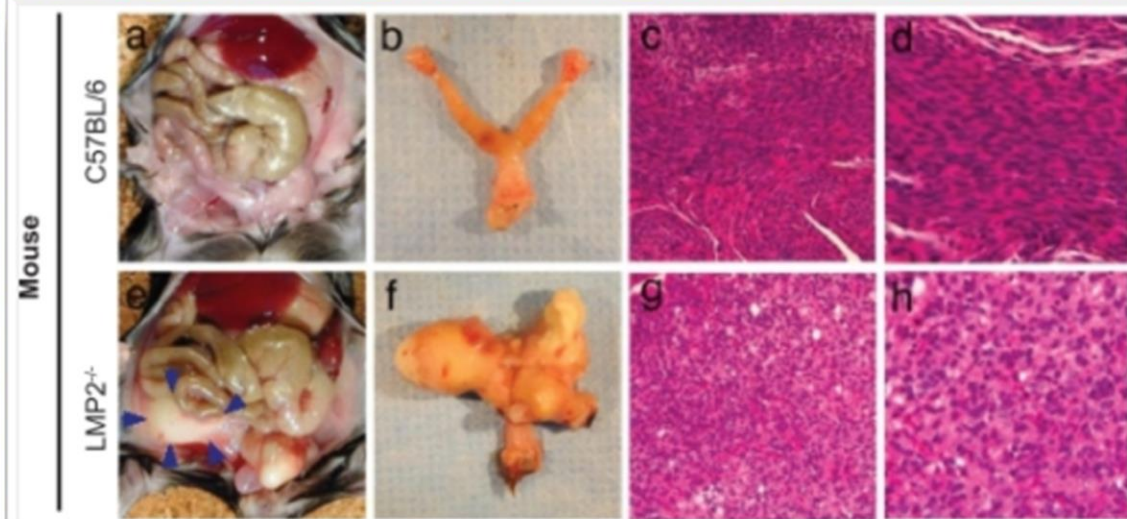
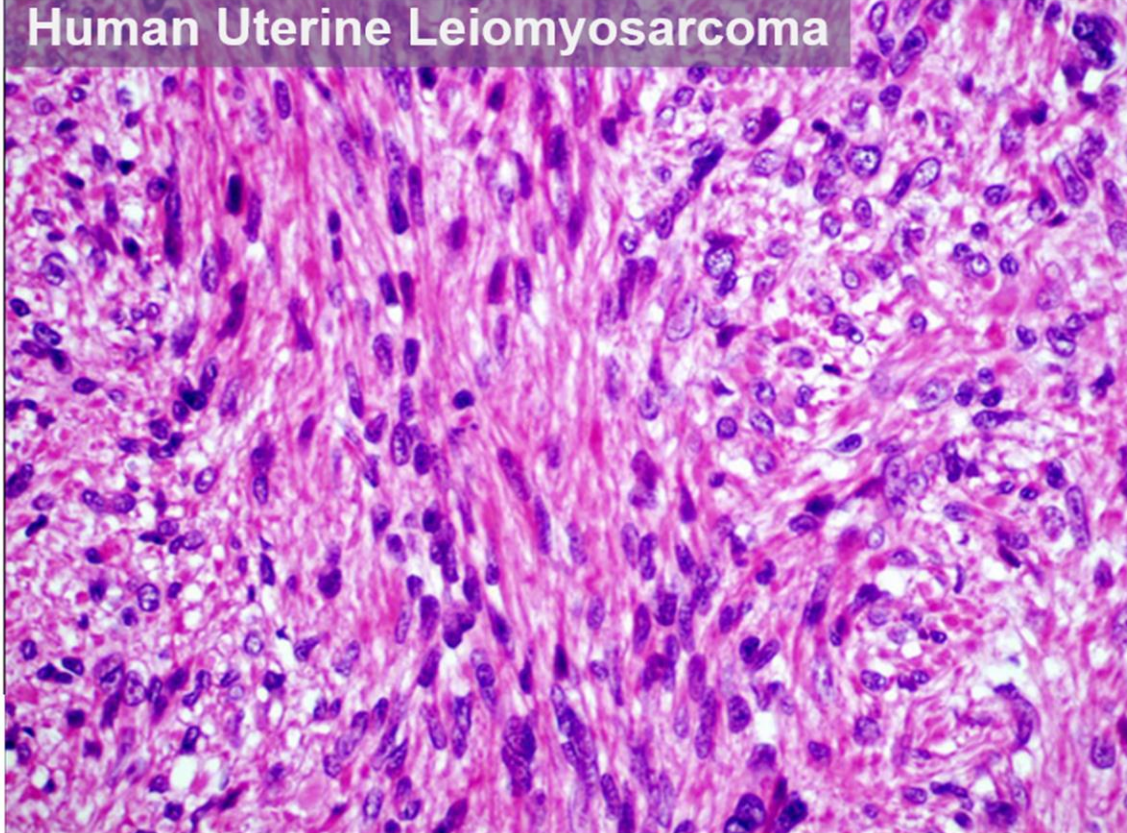
受賞部門: ノーベル生理学・医学賞

受賞理由: 多様な抗体を生成する遺伝的原理の解明

Dr. 利根川 進

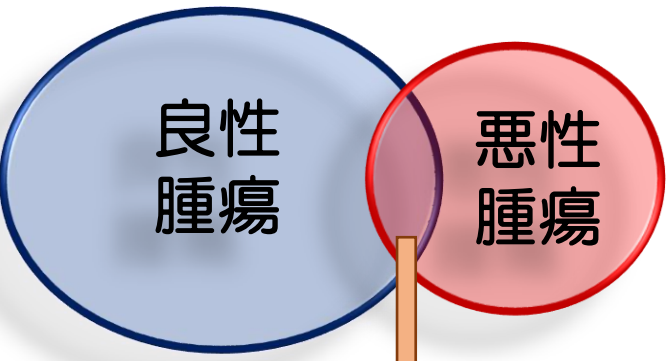


利根川チームで
LMP2欠損マウスで
悪性腫瘍：子宮平滑筋肉腫の自然発症を認めました



In clinical practice, it is difficult to distinguish uterine leiomyosarcoma from other mesenchymal tumors of the uterus.

With the research cooperation of Prof. Susumu Tonegawa (MIT), we reported that uterine leiomyosarcoma spontaneously develops in LMP2-deficient mice.



そこで、
私達は、ヒト摘出組織
を用いた臨床研究より

Potential Biomarkers

**Caveorin 1, Cyclin B1
Cyclin E, LMP2, Ki-67**
を同定しました。

Development of prognostic prediction method for Uterine
mesenchymal tumor with biomarker 5 candidate factor

Tumor type	protein expression *												
	Cytokeratin	Desmin	Caveolin 1	SMA	Vimentin	ER / PR	Endoglin	EGFR	Cyclin B1	Cyclin E	LMP2	Calponin h1	Ki-67
Endometrial stromal tumor													
Endometrial stromal nodule	+	-	++	+	+	+++	+	+	+	-	++	++	-
Endometrial stromal sarcoma	+/-	-	++	+/-	+	+++	+	+	+	-	+/-	++	+/-
Undifferentiated endometrial sarcoma	+/-	Foc.	*	-	-	-	+	+	+	+	+/-	+	+
Smooth muscle tumors													
Leiomyoma, NOS	foc.	+	++	+	*	+++	+/-	+/-	+	-	++	++	+/-
Mitotically active leiomyoma	*	+	++	+	*	+++	+/-	+/-	+	-	++	++	+/-
Cellular leiomyoma	*	+	++	+	*	+++	+/-	+/-	+	-	++	++	+/-
Hemorrhagic cellular leiomyoma	*	+	++	+	*	+++	+/-	+/-	+	-	++	++	+/-
Epithelioid leiomyoma	*	+	++	+	*	+++	+/-	+/-	+	-	++	++	+/-
Myxoid leiomyoma	*	+	++	+	*	+++	+/-	+/-	+	-	++	++	+/-
Atypical leiomyoma	-	+	++	+	*	+++	+	+/-	+	+	+/-	+	+
Lipoleiomyoma	*	+	++	+	*	+++	*	+/-	*	+	+/-	*	+/-
STUMP#	*	+	++	+	*	+++	*	+/-	*	+	+/-	*	+/-
Leiomyosarcoma	+	+	++	+	+	+++	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-
Leiomyosarcoma, epithelioid variant	+	+	++	+	+	+++	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-
Leiomyosarcoma, myxoid variant	+	+	++	+	+	+++	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-
Leiomyomatoid tumor													
LANT#	-	-	+	+	+	*	*	+	*	++	-	-	+/-

CAY1

Cyc.B1

Cyc.E

LMP2

Calp.h1

Ki-67



臨床研究概要票

研究事業名：平成31年度 NHOネットワーク共同研究事業 がん(一般)領域

「免疫組織化学的バイオマーカーによる子宮間葉系腫瘍の予後予測法の確立に関する研究 (PRUM-IBio study)」

総研究期間 2019 ~ 2024年
6.5年間

実施体制：多施設共同研究
実施機関：参加希望のNHO病院と国公立大学病院など
プロジェクトリーダー：国立病院機構 京都医療センター 林 琢磨

背景：
子宮平滑筋肉腫は、再発・転移を繰り返す難治性腫瘍であり、子宮平滑筋肉腫の発症機序については不明な点が多い。様々な臨床検査の情報より、子宮平滑筋肉腫が疑われる場合、単純子宮全摘出術と両側付属器(卵巣)摘出術が行われる。しかし、多くの場合、子宮平滑筋肉腫の存在を示す医学的エビデンスが確立されていないため、6ヶ月毎の画像検査を含む定期診断による経過観察が数年間行われる、これにより医療費が高んでいる。今日の晩婚や高齢出産等などの社会的背景より、子宮温存が強く求められている。そこで、医療費の削減のためにも、これら子宮間葉性腫瘍に対する病理組織学診断法の確立が必要である。

研究目的：
子宮平滑筋肉腫が疑われ、単純子宮全摘出術と両側付属器(卵巣)摘出術を受けた子宮間葉性腫瘍の患者において、摘出標本における免疫組織化学的バイオマーカーを用いて、(1)生存期間、(2)無再発生存期間をアウトカムとする予後予測スコアモデルの構築とその評価を行う。そして、同バイオマーカーでの診断法を確立する。

有効性の評価
予後(手術日を起点とした生存期間、無再発期間)に関する下記因子による予後予測スコアモデルを構築する。
(1)年齢、(2)FIGO分類、(3)5種類の免疫組織化学的バイオマーカー：**LMP2/β1i, Cyclin B, Cyclin E, Caveolin1, Ki-67**
(I)上記(1)(2)(3)を合わせた計7因子の場合、(II)(3)のみの5因子の場合、(III)(1)と(2)の6因子の場合、(IV)(1)と(3)の6因子の場合、(V)(2)と(3)の6因子の場合の5通りで予後予測モデル構築を試みる。同マーカーによる病理組織学診断法を評価する。

臨床研究のシエマ

術前に子宮平滑筋肉腫が疑われて単純子宮全摘出術を受け、摘出標本の病理組織学的診断により子宮間葉系腫瘍と確定診断された患者



同意と登録
ディベロプメント・コホート(後向き、250例)：オプトアウトによる同意
バリデーション・コホート(前向き、140例)：文書による同意



死亡、再発(転移)、または観察期間終了までのデータを収集



ディベロプメント・コホートを対象とした摘出標本の免疫組織化学的バイオマーカー※による予後予測スコアモデルの構築
バリデーション・コホートを対象とした摘出標本の免疫組織化学的バイオマーカーによる予後予測スコアモデルの検証

※日本特許：特許第4982869号名称「LMP2を用いた子宮平滑筋肉腫の検出」

実施医療機関 28医療機関

東北婦人科がんユニット(TGCU)

東北6県：弘前大学、秋田大学、岩手医科大学、山形大学、東北大学、東北医科薬科大学、福島県立医科大学、宮城県立がんセンター、国立病院機構仙台医療センター

国立病院機構

北海道がんセンター、埼玉病院、横浜医療センター、名古屋医療センター、浜田医療センター、米子医療センター、四国がんセンター、鹿児島医療センター

信州ユニット

長野県飯田市立病院

東京ユニット

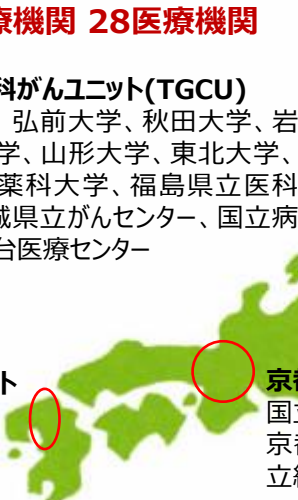
東京大学、国立がん研究センター、慶應義塾大学

九州ユニット

九州大学、熊本大学

京都・大阪ユニット

国立病院機構京都医療センター、京都大学、大阪市立大学、大阪市立総合医療センター、近畿大学



色彩コンピネーションにより
良性・悪性の補助診断法を確立するための臨床研究



臨床研究での解析ポイント

術前での、
MRI画像診断

		MRI		
		良性	良性悪性？	悪性
外科病理 診断 (FIGO分類)	良性			
	良性悪性？			
	悪性			

術後での、
摘出組織での
5つの因子の
発現情報

		外科病理診断(FIGO分類)		
		良性	良性悪性？	悪性
免疫組織化 学染色法	LMP2/b1i			
	Cyc B			
	Cyc E			
	Caveolin			
	Ki-67			
年齢				
生命予後(術 後3年以内)	転移			
	再発			
	無再発期間			

初発時の年齢

医学的悪性腫
瘍のエヴィデ
ンス(再発転移)

色彩コンバージョンにより
良性・悪性の補助診断法を確立

225 cases

N.Myo.175

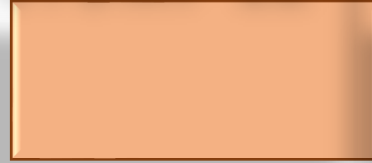
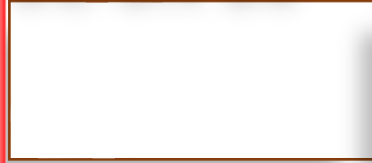
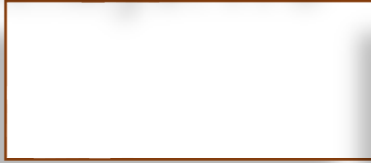
UL 175

UL-BN 26

STUMP 22

ULMS 157

Cyclin B



Cyclin E*



Caveolin 1



Ki-67*



LMP2



MRI



consistency
(inconsistency)

inconsistency

inconsistency

inconsistency

***Rosette : Age**
高い悪性度

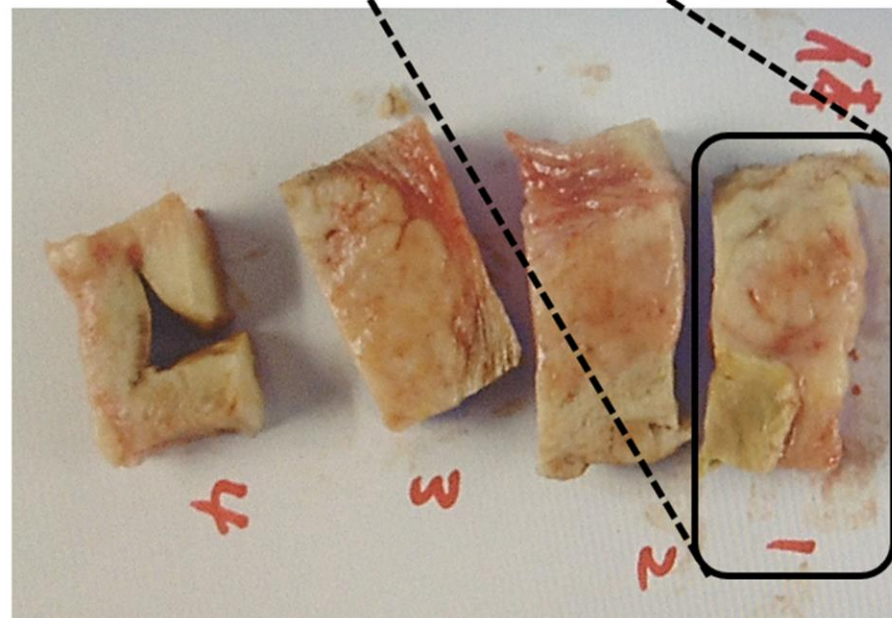
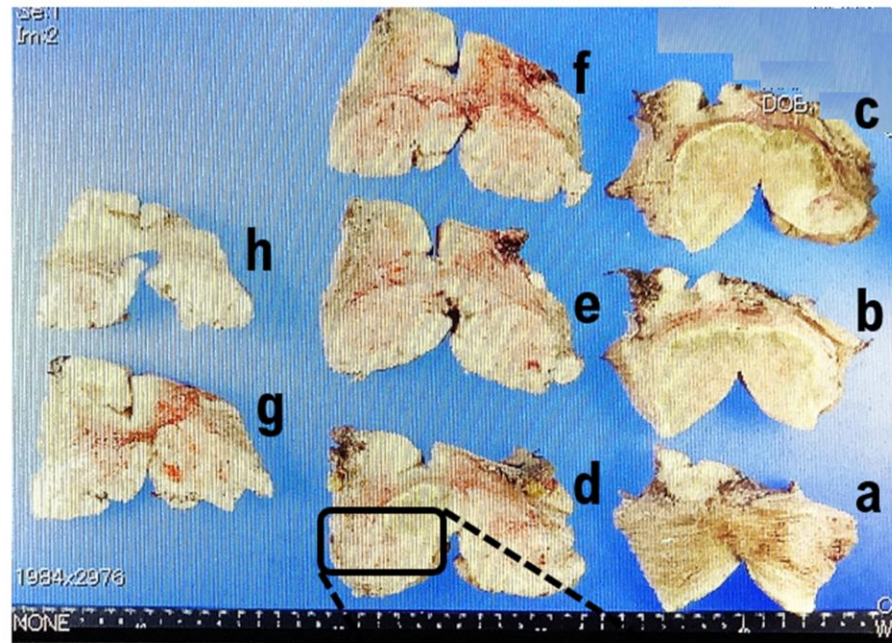
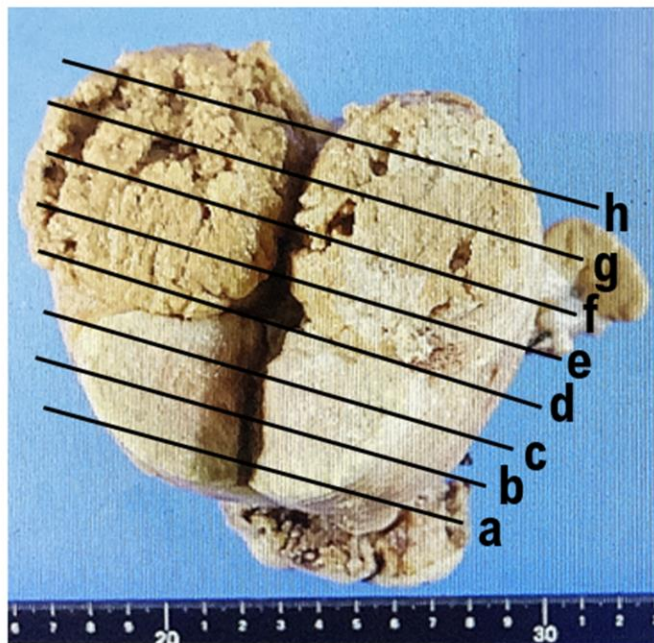
20 ≤

20 ≤

40 ≤

40 ≤

例:子宮間葉性腫瘍: 良性組織・悪性組織・悪性度不明組織が混在



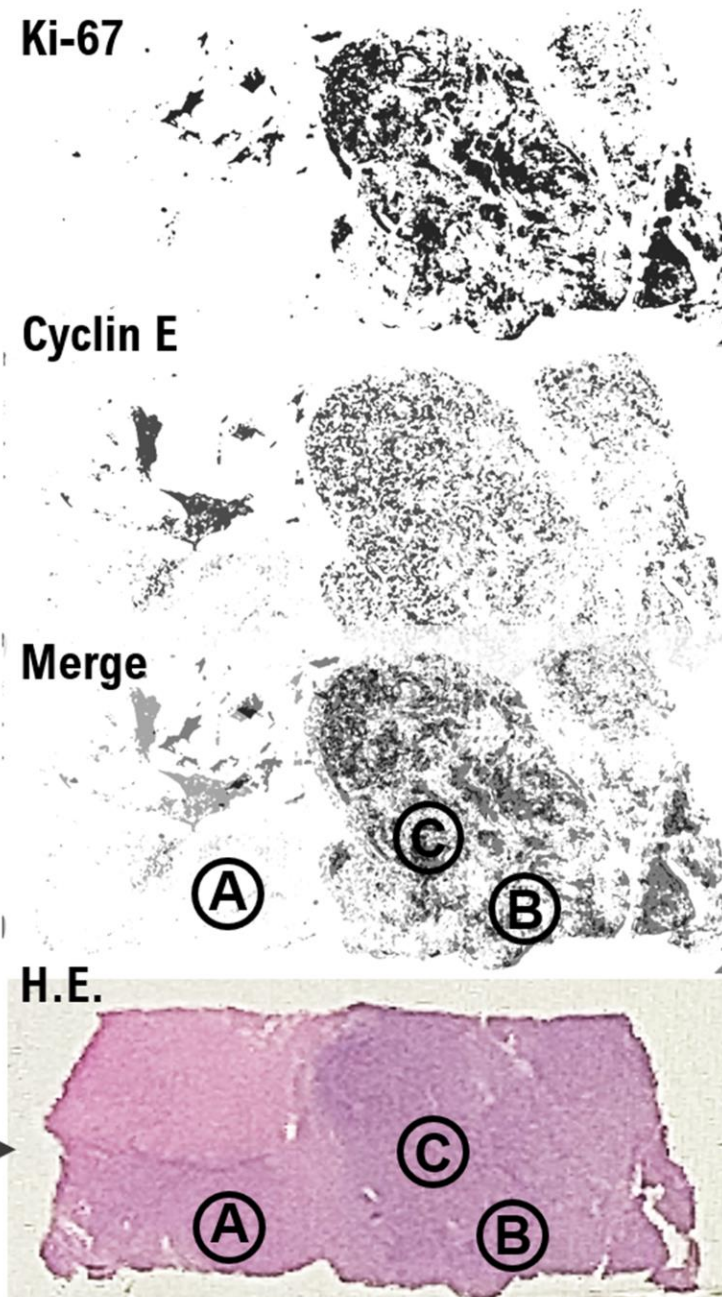
特許出願の準備

Ki-67

Cyclin E

Merge

H.E.



黒点が各因子の発現を示す 例えば(C)が悪性腫瘍となる

本研究課題で実施する内容

国立病院機構の多施設共同コホート研究(PRUM-iBio study)で、研究代表者らは、患者からの摘出組織における病理組織学的解析により、「Cyclin B, Cyclin E, Caveolin, LMP2/ β 1i, Ki-67のコンビネーションでの子宮平滑筋腫と子宮平滑筋肉腫の鑑別における免疫組織化学的バイオマーカー」の有用性と信頼性(正診率95%)を報告した。

本研究課題で実施する内容は、国立病院機構の多施設共同コホート研究(PRUM-iBio study)で構築されている「免疫組織化学的バイオマーカー候補因子の子宮間葉性腫瘍に対する予後予測スコアモデル」を基盤とした**Cyclin E**と**Ki-67(Rosetteフォーム)**の発現の客観的な数値化による予後予測マーカーの検証である。連携医療機関において、子宮平滑筋肉腫と悪性・良性の外科病理診断が困難であるLeiomyoma with Bizarre Nuclei、STUMPの子宮間葉性腫瘍 **計15症例**を登録して頂き、免疫組織化学法によって、各腫瘍組織でのバイオマーカー5つの候補因子の発現状況を確認する。

連携医療機関での未染薄切スライドの作成 300千円

内訳 未染薄切スライドの作成 15症例 x 20千円

免疫組織化学染色用消耗品 560千円

内訳 免疫組織化学染色用5種類の抗体 560千円

免疫組織化学染色外部委託費 360千円

内訳 免疫組織化学染色外部委託費 15症例 x 24千円

問題点(宿題)と対策

1. 現在、Cyclin EとKi-67の発現状況をMantra 2(Akoya Bioscience 社 Opal 解析)で行っている。しかし、同機器の価格は、2000万円前後と高い、なので、各医療機関への普及は難しい。そのため、同機器と同レベルの結果が得られる様なより安価な機器またはソフトの検討が必要である。

対策：Cyclin EとKi-67の発現状況をKEYENCEのハイブリッドセルカウントとマイクロセルカウントの解析ソフトを用いて検討を行っている。現在まで、数症例で同解析ソフトによって検討をおこなっているが、プロトコールの固定が必要である。

2. 悪性(口ゼットタイプ)では、数値は高いです。長期生存者では、数値が低いです。数値が高いことが、予後不良(4~5年以内の死亡する)であるが、解析値が「高い」か「低い」かを決定するために、カットオフ値の設定が必要であろう。

対策：上記1で検討されている解析ソフトによって、各患者さんの生存状況と解析数値との相関性を検討の上、カットオフ値の設定を行う。

研究内容

1. 連携医療機関において、子宮平滑筋肉腫と悪性・良性の外科病理診断が困難である Leiomyoma with Bizarre Nuclei、STUMPの子宮間葉性腫瘍 計15症例を登録して頂き、免疫組織化学法によって、各腫瘍組織でのバイオマーカー5つの候補因子の発現状況を確認する。
2. Cyclin EとKi-67の発現状況を客観的な数値で示すために、Cyclin EとKi-67の発現状況を KEYENCEのハイブリッドセルカウントとマイクロセルカウントの解析ソフトを用いて検討を行っている。現在まで、数症例で同解析ソフトによって検討を検討しているが、プロトコールの固定が必要である。
3. 各患者さんの生存状況と解析数値との相関性を検討の上、カットオフ値の設定を行う。
4. 新技術:Cyclin EとKi-67(Rosetteフォーム)の発現の客観的な数値化による予後予測マーカーの確立です。本新技術では予後予測も可能であるが、術前の針生検でRosetteフォーが確認できれば確実に悪性と判断でき鑑別が容易になる。本新技術の特許出願を行い、登録する。



研究事業名：2019年度（採択年度記載）
 NHOネットワーク共同研究事業癌般領域「免疫組織化学的バイオマーカーによる子宮間葉性腫瘍の予後予測法の確立に関する研究」

総研究期間
 2019年11月～25年03月（6年間）
 臨床研究：UMIN000038789

実施体制：多施設共同研究
実施機関：参加希望のNHO病院と国公立大学病院など
プロジェクトリーダー：国立病院機構 京都医療センター 林 琢磨

背景：
 子宮平滑筋肉腫は、再発・転移を繰り返す難治性腫瘍であり、子宮平滑筋肉腫の発症機序については不明な点が多い。様々な臨床検査の情報より、子宮平滑筋肉腫が疑われる場合、単純子宮全摘出術と両側付属器(卵巣)摘出術が行われる。しかし、多くの場合、子宮平滑筋肉腫の存在を示す医学的エビデンスが確立されていないため、6ヶ月毎の画像検査を含む定期診断による経過観察が数年間行われる、これにより医療費が高んでいる。今日の晩婚や高齢出産などの社会的背景より、子宮温存が強く求められている。そこで、医療費の削減のためにも、これら子宮間葉性腫瘍に対する病理組織学診断法の確立が必要である。

研究目的：
 子宮平滑筋肉腫が疑われ、単純子宮全摘出術と両側付属器(卵巣)摘出術を受けた子宮間葉性腫瘍の患者において、摘出標本における免疫組織化学的バイオマーカーを用いて、(1)生存期間、(2) 無再発生存期間をアウトカムとする予後予測スコアモデルの構築とその評価を行う。そして、同バイオマーカーでの診断法を確立する。

有効性の評価
 予後(手術日を起点とした生存期間、無再発期間)に関する下記因子による予後予測スコアモデルを構築する。
 (1)年齢、(2)FIGO分類、(3) 5種類の免疫組織化学的バイオマーカー：LMP2/β1i, Cyclin B, Cyclin E, Caveolin1, Ki-67
 (Ⅰ)上記(1)(2)(3)を合わせた計7因子の場合、(Ⅱ)(3)のみの5因子の場合、(Ⅲ)(1)と(2)の6因子の場合、(Ⅳ)(1)と(3)の6因子の場合、(Ⅴ)(2)と(3)の6因子の場合の5通りで予後予測モデル構築を試みる。同マーカーによる病理組織学診断法を評価する。

実施医療機関(28機関)

国立病院機構
 北海道がんセンター、埼玉病院、横浜医療センター、名古屋医療センター、浜田医療センター、米子医療センター、四国がんセンター、鹿児島医療センター

信州ユニット
 長野県飯田市立病院

東京ユニット
 東京大学、国立がん研究センター、慶應義塾大学

九州ユニット
 九州大学、熊本大学

京都・大阪ユニット
 国立病院機構京都医療センター、京都大学、大阪市立大学、大阪市立総合医療センター、近畿大学

※日本特許：特許第4982869号名称「LMP2を用いた子宮平滑筋肉腫の検出」

国立病院機構所属医療機関		28医療機関	
北海道がんセンター	20症例	仙台医療センター	4症例
横浜医療センター	2症例	埼玉病院	0症例
浜田医療センター	3症例	名古屋医療センター	2症例
四国がんセンター	5症例	京都医療センター	15症例
大学病院等			
京都大学附属病院	43症例	宮城県立がんセンター	25症例
東北大学病院	13症例	大阪 北野病院	0症例
九州大学附属病院	33症例	大阪総合医療センター	20症例
熊本大学附属病院	17症例	国立がん研究センター	7症例
飯田市立病院	7症例	近畿大学附属病院	17症例
山形大学附属病院	6症例	合計	326症例
大阪市立大学附属病院	54症例		

現在まで、298症例(後ろ向き試験)において有効性の評価が検討中、2021年度以降は、前向き試験(140症例)が検討されています。

参加医療施設 ◀ 婦人科腫瘍研究グループ

◀ 東北婦人科がんユニット[二神・真行・先生、横山・良仁・教授・(弘前大学)、利部・正裕・先生、馬場・長・教授・(岩手医科大)、寺田・幸弘・教授・(秋田大学)、島田・宗昭・先生、徳永・英樹・教授、八重樫・伸生・教授*・(東北大学)、中西・透・先生、渡部・洋・教授・(東北医科薬科大学)、山田・秀和・院長・(宮城県立がんセ)、永瀬・智・教授・(山形大学)、藤森・敬也・教授・(福島県立医科大学)]、佐野・健司・部長*・(飯田市立病院)、山口・建・先生、万代・昌紀・教授・(京都大学)、市村・友季・先生*・(大阪市立大学)、川村・直樹・先生・(大阪市立総合医療セ)、松村・謙臣・教授・(近畿大学)、加藤・聖子・教授・(九州大学)、片淵・秀隆・教授・(熊本大学) ◀

2021年第1回班会議
7月1日から8月31日
Zoomにより班会議を
行いました。

現在の臨床研究の
参加メンバー

◀ ゲノムサイエンス

◀ 外科病理

◀ 油谷・浩幸・教授・(東京大学)、金井・弥栄・教授・(慶應義塾大学)、平岡・伸介・部長・(国立がん研セ)、
◀ 吉澤 明彦 准教授 (京都大学)

◀ 独立行政法人・国立病院機構 ◀

加藤・秀則・部長・(北海道医療セ)、新倉・仁・部長・(仙台医療セ)、中川・博之・部長・(埼玉病院)、鈴木・りえ・先生・(横浜医療セ)、中西・豊・部長・(名古屋医療セ)、小林・正幸・部長・(浜田医療セ)、竹原・和
宏・部長・(四国がんセ)、米子医療セ、恒松・良祐・部長・(鹿児島医療セ) ◀

◀ 中央施設：林・琢磨*、安彦・郁・先生、長谷川・浩二・部長*、小西・郁生・院長*・(京都医療セ) ◀

◀ *運営委員 ◀

◀ アドバイザー

◀ 運営委員会

◀ 万代 昌紀 京都大学 産科婦人科教授
◀ 片淵 秀隆 熊本大学 前産科婦人科教授
◀ 日本婦人科腫瘍学会理事長
◀ 八重樫 伸生 東北大学 産科婦人科教授
◀ 東北大学 医学部長
◀ 小西 郁生 京都医療センター 名誉院長
◀ 日本産婦人科学会前理事長
◀ アジア婦人科腫瘍学会理事長
◀ 日本医学会 理事

◀ 協力者

◀ 利根川 進 マサチューセッツ工科大学 教授

◀ アドバイザー	田中 夏生 (たなか なつお)	平木国際特許事務所 弁理士(専門：バイオ、診断薬)	特許出願に関する指導と特許出願事業を担当
	〒105-6232 東京都港区愛宕 2-5-1 愛宕グリーンヒルズ MORI タワー32 階		
◀ アドバイザー	福西 克弘 (ふくにし かつひろ)	独立行政法人 医薬品医療機器総合機構(PMDA)テクニカルエキスパート	体外診断薬・技術の商品化および商品の上市、保険収載に関する指導
	〒530-0011 大阪府大阪市北区大深町 3-1 グランフロント大阪 タワーB12 階		



独立行政法人 国立病院機構
京都医療センター

National Hospital Organization Kyoto Medical Center



国立研究開発法人
科学技術振興機構
Japan Science and Technology Agency

START



SIGMA-ALDRICH

ご清聴有り難うございました。