

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10725

研究課題名(和文) 子宮頸癌および子宮頸部上皮内病変における細胞極性制御因子aPKC / の役割解明

研究課題名(英文) Role of the cell polarity regulator aPKC in uterine cervical cancer and cervical intraepithelial lesion.

研究代表者

丸山 康世 (MARUYAMA, Yasuyo)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：10534141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞極性制御因子・癌遺伝子であるaPKCの子宮頸癌および子宮頸部上皮内病変(SIL)における発現様式を解析し、aPKCの子宮頸癌の発癌と進展に及ぼす影響と子宮頸癌バイオマーカーや治療標的への応用の可能性を検証した。

子宮頸癌、SILの一部ではaPKCが過剰発現または核に異常局在していた。aPKC核局在型の子宮頸癌は細胞質局在群に比較して有意に予後不良であった。aPKC過剰発現または核局在型のSILはより高度な病変に進展する傾向があった。核aPKCを強制発現させた子宮頸癌細胞株では浸潤能が亢進していた。aPKC、特に核局在aPKCは子宮頸癌の癌化と進展に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study was to explore the role of aPKC, a cell polarity regulator as well as a oncogene, in development and progression of cervical cancer. For this purpose, the expression patterns of aPKC were assessed in cervical cancer and its precursor lesion (SIL).

In a part of cervical cancer and SIL, aPKC over-expressed or aberrantly located in nucleus. The prognoses of the cervical cancer patients with nuclear aPKC were significantly poorer than the patients with cytoplasmic aPKC. Furthermore, over-expression of aPKC and nuclear localization in low grade SIL were risk factor of progression to higher grade of SIL. In addition, cervical cancer cell lines with forced expression of aPKC in nucleus showed higher invasive capacity than aPKC knock-down cells.

Our study suggested the implication of aPKC in oncogenesis and progression of cervical squamous carcinoma.

研究分野：産婦人科

キーワード：aPKC 子宮頸がん 子宮頸部異形成

1. 研究開始当初の背景

昨今、若年女性において子宮頸部扁平上皮癌(SCC)の前駆病変である子宮頸部扁平上皮内病変 (Squamous Intra-epithelial lesion, SIL) 罹患数が増加しており、社会的問題になっている。子宮頸部の HPV 感染を契機に軽度 SIL (Low-SIL, LSIL)が生じるが、がん化の危険性が高く治療を要する高度 SIL (High-SIL, HSIL)に進展するのは 20%以下と報告されている。しかし LSIL のうち、より高度な病変に進展する症例を選別する方法は確立していない。したがって現状では多くの LSIL を診断された女性が、不要であるかもしれないにも関わらず長期に渡る定期検診や治療を甘受しており、その心身的・経済的・社会的負担は大きい。そこで HSIL へ進展する LSIL 症例を選別する有効な予測ツールは SIL の管理上非常に有用と考えられる。さらに、HPV ワクチンや子宮がん検診が普及したとはいえ、国際的にも未だ進行子宮頸癌で死亡する女性は多く、子宮頸癌に対する新規治療法の開発に対する要望は大きい。

atypical protein kinase C (aPKC)は細胞極性制御因子であるが、近年の研究で癌遺伝子でもあることが報告されている。aPKC の過剰発現は多くのがん腫において予後不良因子であると報告されている。我々は、SIL の病理組織学的特徴が扁平上皮細胞の層分化の消失と細胞増殖性の亢進であることに着目し SIL と SCC における aPKC の発現について検証した。そこで SIL の病変が高度なほど、また SCC の病期が進行しているほど aPKC が過剰発現している症例割合が多くなることを見出し、aPKC が子宮頸部上皮の発がん・進展に関与している可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究は下記の 3 つを目的として施行した

1) SIL における aPKC タンパク発現様式を解析することにより、aPKC が SIL 進展や発癌のバイオマーカーとなりうるかの検証

2) 子宮頸部扁平上皮癌(SCC)における aPKC タンパク発現様式を解析することにより、aPKC が SCC の進展に及ぼす影響を明らかにする

3) 子宮頸癌細胞における aPKC の異常発現 (発現量および局在) の及ぼす分子生物学的影響についての解析を行うことにより治療標的となりうるかについての検証

3. 研究の方法

本研究は学内倫理委員会の認可を得て施行され、臨床データおよび組織検体に関してはすべて定められた文書による本人の同意の下で使用された。

1) LSIL における aPKC の発現様式と HSIL への進展リスクについて

LSIL 症例において、免疫組織化学法を用

いて aPKC の発現様式、すなわち染色強度 (正常の上皮細胞より強発現か否か) および細胞内局在 (細胞質優位か核優位か) の差異と HSIL への進展リスクについて解析した。

2) SCC における aPKC の発現様式と予後などの臨床像との相関について

SCC において、免疫組織化学法を用いて aPKC の発現様式と患者臨床的背景、病期、リンパ節転移の有無や予後について後方視的に解析した。

3) SCC 細胞株における aPKC 核局在が細胞形質に及ぼす影響についての検証

aPKC を核に過剰発現している HeLa, 細胞にレンチウイルスを用いて short hairpin RNA を導入, aPKC ノックダウン細胞株 (aPKC-KD), さらに aPKC を細胞質と核にレスキュー発現させた細胞株 (aPKC-KDR), および核に発現する変異型 aPKC を強制発現させた細胞株 (aPKC-120E) を作成し, 細胞増殖能, 浸潤能をそれぞれ WST-1 assay, マトリゲル浸潤・遊走アッセイで評価した。aPKC-120E において発現誘導あるいは抑制される mRNA の発現について microarray 法を用いて解析した。

4. 研究成果

1) aPKC が過剰発現または核局在の LSIL は HSIL への進展リスク因子である。

LSIL87 例の 4 年累積病変進行率は aPKC タンパク正常発現群に比して aPKC 過剰発現群, 細胞質局在群に比して核局在群で有意に高かった ($p < 0.01$, log-rank test, 図 1)。同様に 4 年累積病変退縮率は過剰発現群と各局在群で有意に低かった ($p < 0.01$, log-rank test, 図 2)。年齢, HPV 型, p16 の発現様式などを加えた多変量解析においても, aPKC の過剰発現と核局在は HSIL への進展および LSIL 持続の独立したリスク因子であった。(HSIL への進展では過剰発現: crude HR = 5.96; 95% CI = 2.19-16.3; $p < 0.01$, 核局在: crude HR = 6.08, 95% CI = 2.23-16.6, $p < 0.01$, Cox 比例ハザードモデル, LSIL 持続は過剰発現: crude HR = 0.27; 95% CI = 0.14-0.52; $p < 0.01$ 核局在: crude HR = 0.33, 95% CI = 0.17-0.64, $p < 0.01$, Cox 比例ハザードモデル)。

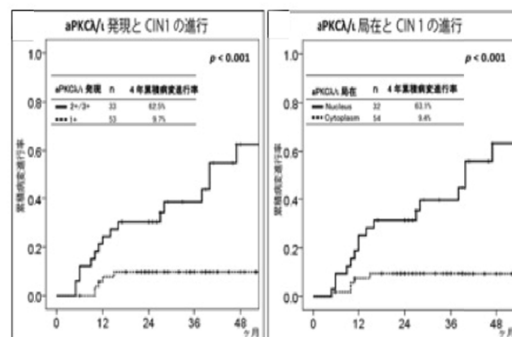


図 1. aPKC 発現量と細胞内局在による

LSIL(CIN1)のHSILへの4年累積病変進展率・aPKC 過剰発現および核局在群(それぞれ実線)ではLSILからHSILへの進展率が高い。p: log-rank test

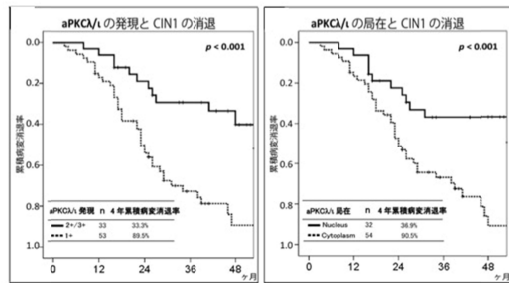


図 2 . aPKC 発現量と細胞内局在によるLSIL(CIN1)の4年累積病変消退率。aPKC 過剰発現および核局在群(それぞれ実線)ではLSILの消退率が低い。p: log-rank test

2) aPKC 核局在のSCCは予後不良である。

140ヶ月の観察で、SCC168例の生存率を解析した。aPKC発現量による生存率の有意差は認められなかった(p=0.356, log-rank test)一方で、aPKC核局在群は細胞質局在群より有意に予後不良であった(p<0.001, log-rank test, 図4)。SILでの所見も合わせると、aPKCは子宮頸部の癌化と進展に関与している可能性が示唆された。

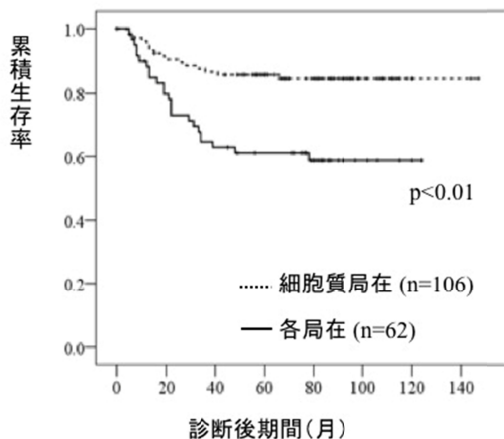


図 3 . aPKCの細胞内局在による子宮頸癌の累積生存率の差異。aPKC核局在群(実線)では、細胞質局在群(破線)に比して有意に予後不良であった。p: log-rank test

3) aPKCの異常発現はがん細胞浸潤を亢進する。

野生型Hela細胞と、aPKC遺伝子発現抑制したaPKC-KD Hela細胞との間には細胞増殖能、浸潤能、遊走能発現の差異は認められなかった。一方で、aPKC-KDとaPKCを強発現させたaPKC-KDRでは細胞増殖能、遊走能に変化は認められなかったものの、細胞浸潤が亢進し、aPKCを核特異的に発現さ

せたaPKC-120Eではさらに浸潤能が亢進していた(p<0.001, ² test)。現在、aPKC-KDとaPKC-120Eにおける遺伝子発現の差異をmicroarray法で検証、細胞浸潤能を亢進させる遺伝子の検出を試みている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Mizushima Taichi, Asai-Sato Mikiko, Kazunori Akimoto, Yoji Nagashima, Masataka Taguri, Kazunori Sasaki, Masa-aki Nakaya, Ryoko Asano, Aya Tokinaga, Tohru Kiyono, Fumiki Hirahara, Shigeo Ohno and Etsuko Miyagi. "Aberrant expression of cell polarity regulator aPKC is associated with disease progression in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): A possible marker for predicting CIN prognosis. Int J Gynecol Pathol, 査読あり, 35巻, 2016, 106-117.

[学会発表](計2件)

1. 水島大一, 佐藤美紀子, 時長亜弥, 浅野涼子, 最上多恵, 宮城悦子, 平原史樹: 細胞極性制御因子/がん遺伝子 atypical protein kinase C / (aPKC) の異常発現は子宮頸部上皮内病変の予後予測因子である。第67回日本産科婦人科学会講演会, 2015年4月。
2. 時長亜弥, 佐藤美紀子, 水島大一, 大野茂男, 大橋建一, 宮城悦子: 細胞極性制御因子/がん遺伝子 aPKC の子宮頸癌における発現様式と臨床的意義。

4.

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 丸山 康世
(MARUYAMA Yasuyo)
(横浜市立大学・医学部・共同研究員)
研究者番号：10534141
- (2) 研究分担者 長嶋 洋治
(NAGASHIMA Yoji)
(東京女子医科大学・医学部・教授)
研究者番号：10217995
- (3) 研究分担者 秋本 和憲
(AKIMOTO Kazunori)
(東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・准教授)
研究者番号：70285104
- (4) 連携研究者 宮城 悦子 (MIYAGI Etsuko)
(横浜市立大学・医学研究科・教授)
研究者番号：40275053
- (5) 連携研究者 佐藤 美紀子 (SATO Mikiko)
(横浜市立大学・大学病院・准教授)
研究者番号：70326049
- (6) 連携研究者 平原 史樹
(HIRAHARA Fumiki)
(国立病院機構横浜医療センター・院長)
研究者番号：30201734