

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591934
 研究課題名（和文） LKB1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた子宮頸部腺癌発生メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Mucinous adenocarcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice.
 研究代表者
 伊藤 昌春 (ITO MASAHARU)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：10136731

研究成果の概要：

LKB1 遺伝子の子宮頸部腺癌発癌への関与を明らかにすることを目的とし、雌性 LKB1 遺伝子 (+/-) マウスと LKB1 遺伝子野生型 (+/+) 姉妹マウスとを繁殖させているが、目標週齢への到達が難しく、計画の一部変更を必要とされた。癌もしくは癌類似組織の発生は認めるものの、ターゲットとした粘液性腺癌に関しては、今後の解析が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

子宮頸部腺癌 (adenocarcinoma) は子宮頸癌全体の 20% を占め、先進国においては近年増加傾向にある。その予後は特に進行症例において、子宮頸癌の約 80% を占める扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma) に比して不良であり、化学療法、放射線治療に抵抗性を示すことなどが知られている。扁平上皮癌の 90% 以上

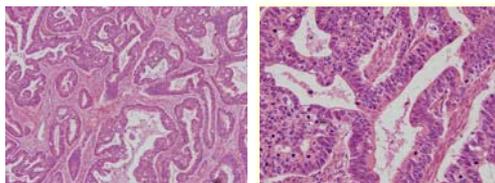
で HPV (ヒトパピローマウイルス) が発癌に関与する一方、腺癌では約 80% とやや低率である報告が多いことからウイルス感染以外の発がん経路が疑われている。

悪性腺腫は、腺癌全体の 1-3% (総子宮頸がんの 0.2-0.6%) と非常に稀な粘液性腺癌であるが、非常に分化度が高いために診断に苦慮する疾患であるとともに、予後不良である。悪性腺腫の発癌に関し

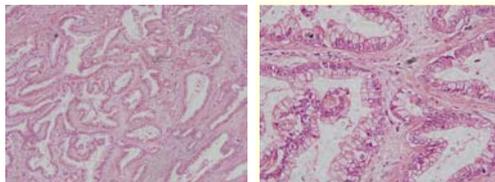
ては、HPV の関与は否定的であり、腺腫様病変との関与を疑うものもあるが明らかではない。

ところで Peutz-Jeghers syndrome (PJS) 患者の約 10-20% に悪性腺腫が合併すること、散発性の悪性腺腫においても LKB1 の遺伝子変異が 55% (6/11) に見られることから、悪性腺腫と LKB1 遺伝子の関連は強いと考えられている。一方、PJS 患者に悪性腺腫以外の腺癌が合併すること、また腺癌の 5% (1/19) に LKB1 の遺伝子変異が見られることから、LKB1 遺伝子の腺癌への関与も疑われている。

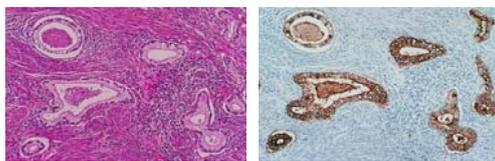
悪性腺腫は、形態的には正常の頸管腺に類似するが、胃幽門腺型の粘液を産生することが知られている。我々の検討では、胃幽門腺型の粘液を産生する腺癌 (gastric type) は悪性腺腫に限らず、臨床病理学的にも悪性腺腫に類似し、通常の内頸部型粘液性腺癌に比して、予後不良であることが明らかとなった (AJSP, 2007 May; 31(5): 664-72)。



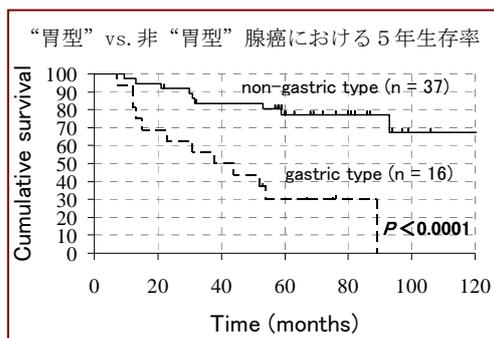
Endocervical adenocarcinoma (usual-type)



Endocervical adenocarcinoma (gastric-type)



“胃型”腺癌 HE HIK1083



こういった胃幽門腺型は腺癌の約 20%、すなわち総子宮頸癌の 4% を占め (日本の年間新規子宮頸癌数は約 5000 例であり、少なくとも 200 例に上ると推定される)、有効な診断、治療方法の開発が望まれている。また、高リスク型 HPV 感染と強く相関すると報告されている p16 の過剰発現率においても、このタイプでは通常の頸部腺癌に比して低率であり、HPV 非依存性の発癌が関与している可能性が高い。以上より、我々は悪性腺腫のみならず胃幽門腺型の形質を有する腺癌の発癌には LKB1 遺伝子変異が関与しているものと推察した。

一方、共同研究者の三好らは、LKB1 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、胃腸管に過誤腫性ポリープ (hamartoma) を発生すること、また、稀な肝細胞がん (HCC) を発生することを確認し、これらの腫瘍についての解析をすすめていた。この LKB1 遺伝子ノックアウトマウスにおいて、週齢 80 程度の 4 例の子宮頸部のサンプリングを行ったところ、脈管侵襲および傍結合織浸潤をとまう高分化腺癌の形成を 1 例に認め、免疫組織化学的にも胃幽門腺特異的である HIK1083 が陽性であるなど、ヒトの胃幽門腺型の粘液を産生する腺癌に類似したものであった。

2. 研究の目的

LKB1 遺伝子の子宮頸部腺癌発癌に関する関与について解析を行い、モデルマウスとしての有用性を検討すること。

3. 研究の方法

【LKB1 ノックアウトマウス】

すでに、共同研究者の三好らが報告した LKB1 ノックアウトマウスを用いた。マウスは番号識別を施したのちに尾より組織採取を行い、DNA 抽出を行った。マウスのジェノタイプは PGKR (5' -CTA AAG CGC ATG CTC CAG ACT-3') と E6R (5' -TAC AGG CCC GTG GTG ATG TTG T-3') とのプライマーを用いて PCR 法にて行った。

【組織学的検討】

マウスの子宮頸部は 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋後 4 μm の厚さで切片を作成したのちに HE 染色を行って形態学的な構築について光学顕微鏡下に観察を行った。

4. 研究成果

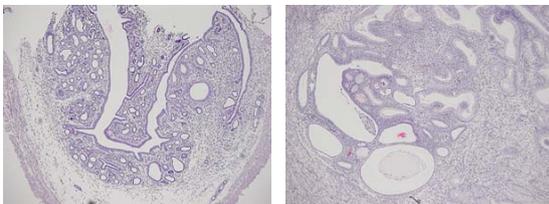
【予備実験】

共同研究者より譲りうけた、週齢 80 週程度の雌性 LKB1 ヘテロノックアウトマウス 4 匹について、子宮に対して 2 例は短軸方向に標本作製、残り 2 例は長軸方向に標本作製して検討を行った。

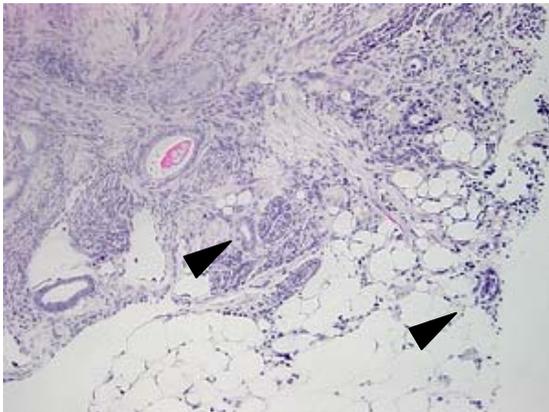
1 例で子宮頸部～体部にかけて腫大を認め、同一倍率において明らかな細胞サイズの増大と腺腔の迂曲・拡大などが観察され、細胞質および腺腔に著明な粘液貯留を認めた。

脈管侵襲および傍結合織浸潤も伴い、高分化ながらも浸潤性の子宮頸部粘液性腺癌と診断された。

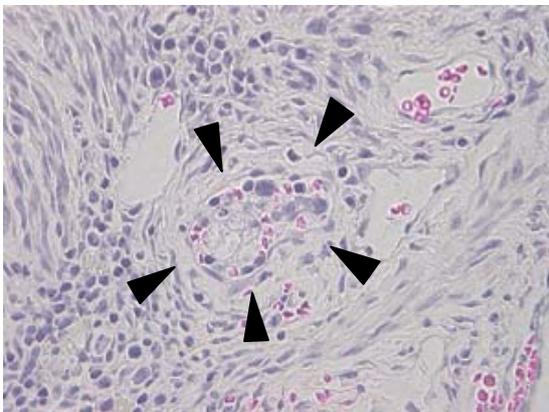
腫瘍で観察された粘液は、胃幽門腺粘液に対する HIK1083 抗体で陽性が確認され、胃型腺癌と考えられた。



子宮頸部【LKB1 (+/+)】 子宮頸部【LKB1 (+/-)】



子宮傍結合織に腺癌組織の浸潤を認める



静脈内にも粘液を有する腫瘍細胞が観察される

【本実験】

科学研究費獲得後に、マウスの繁殖を開始した。KBI 遺伝子ヘテロノックアウト (+/-) マウスを交配・繁殖させることで、80 匹の LKB1 (+/-) マウスを飼育し、30-40 週、40-50 週、50-60 週、60 週を経時的に 20 匹ずつ安楽死させ、雌性生殖器を採取する予定とした。まずは、予備実験にて 80 週のマウスに目的となる腫瘍を発生していたことから、80 週程度の LKB1 (+/-) マウス 20 匹から雌性生殖器を採取することを目的として繁殖を続けたが、当施設で繁殖した LKB1 (+/-) マウスでは 80 週以上の生存が難しく、はじめの 10 匹においては、生存期間は 55-79 週 (中央値: 72 週であった)。

また、現在まで解析可能であった LKB1 (+/-) マウス 11 匹 (週齢: 45-79) は、長軸方向に標本作製して観察を行った。

肉眼的には 3 匹に子宮腫大を、3 匹に子宮の軽度腫大を認めており、5 匹では通常の大さであった。

顕微鏡的には、2 匹に悪性所見を認めたが、予備実験で観察されたような高分化型粘液性腺癌ではなかった。また、3 匹では粘液化生を認め、一部に異型を伴っていたが、形態学的に悪性といえる所見ではなかった。長軸方向による観察では子宮内腔および傍結合織と増生腺管との関係把握が困難であり、局在はやや不明瞭となるが、短軸方向で観察する必要があるのかもしれない。

現在、これらの結果を踏まえて、まずは老化マウスの雌性生殖器採取の目標週齢を 70-72 週とするとともに、短軸方向での観察を検討している。

また、この方法で検討数を増やしても、粘液性腺癌が発生しない際には、(1) LOH 解析を行い、LOH 例でターゲットの腫瘍が発生するようであれば adeno-cre の導入を考慮、(2) ヒトでは胃型で p53 の変異がみられるため、double knockout mouse の作成を考慮、の二点につき検討する。

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. Kojima A, Mikami Y, Sudo T, Yamaguchi S, Kusanagi Y, Ito M, Nishimura R. Gastric morphology and immunophenotype predict poor outcome in mucinous adenocarcinoma of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol*. 2007 May;31(5):664-72. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1. Kojima A, Mikami Y, Sudo T, Yamaguchi S, Kusanagi Y, Obayashi C, Ito M, Nishimura R: P53 expression is highly correlated with gastric morphology in mucinous adenocarcinoma of the uterine cervix. IGCS 12th Biennial Meeting 2008/10/25-28 Bangkok, Thailand
2. 小島淳美、山口聡、大木規義、宮原義也、橋口裕紀、須藤保、武木田茂樹、伊藤昌春、西村隆一郎: 血清 CA19-9 値の子宮頸部「胃型」粘液腺癌再発マーカーとしての有用性 第 44 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 2008/07/17-19 名古屋
3. 小島淳美、須藤保、山口聡、草薙康城、伊藤昌春、西村隆一郎: 子宮頸部腺癌の卵巣転移の診断における p16INK4a の有用性とピットフォール 第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会 2008/04/12-15 横浜
4. 小島淳美、三上芳喜、須藤保、山口聡、草薙康城、伊藤昌春、西村隆一郎: 子宮頸部内頸部型粘液腺癌の臨床病理学的再検討—胃型腺癌の提唱 第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会 2007/04/14-17 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 昌春 (ITO MASAHARU)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10136731

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者