

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591845

研究課題名（和文） 子宮頸部腺癌の診断技術改良と siRNA を用いた新たな治療戦略

研究課題名（英文） New diagnostic and treatment techniques for cervical adenocarcinomas

研究代表者

藤井 多久磨 (FUJII TAKUMA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10218969

研究成果の概要：

子宮頸癌の診療技術の改良に役立つ方法を研究した。診断では子宮頸癌をリアルタイムに診断する方法としてラマンコルポスコプの開発に着手した。従来にない斬新的なアプローチで再現性のあるデータを得ることができた。細胞診では従来、炎症所見の一つといわれている amphophilia が HPV18 型感染に特徴的な細胞像であることがわかった。細胞診検体を利用し、P16 細胞免疫染色、HPV 型判定、および HPV の DNA に対する in situ hybridization を施行し、分子生物学的にハイリスク症例を抽出することが可能となった。BAC マイクロアレイにより遺伝子異常をゲノムワイドに網羅的に解析し、新たな癌関連候補遺伝子領域をみつけた。

一方、治療では HPV18 型に対する siRNA を用い、HPV E6, E7 遺伝子発現を制御し癌細胞の増殖を抑制することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

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：子宮頸癌、細胞診、コルポスコプ、siRNA、BAC ライブラリー、P16, in situ hybridization, パピローマウイルス

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は若年者において罹患率が上昇しており、早期診断が妊孕性温存には重要である。さらに、癌検診では抽出が困難な腺癌の罹患率も増加している。子宮頸部腺癌は扁平上皮癌と比較すると化学療法や放射線治療に抵抗性を示すことから新たなアプローチによる治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 子宮頸癌早期発見ツールを開発すること、(2) 分子生物学的な解析を行い、癌関連遺伝子を同定すること、(3) 新たな腺癌に対する分子標的治療の基礎的な研究を行い、臨床応用の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) ラマン分光法を応用してラマンコルポス

コープの開発を行い腺癌におけるラマンスペクトルパターンの解析を行った。

(2)細胞診検体からDNAを抽出し、PCR法にてHPV型判定を行い、ハイリスク型HPVの同定をした。その解析結果と細胞診の形態学的変化の解析を行い、HPV型による形態変化の解析を行った。

(3) 前癌病変患者から発癌リスク患者を抽出する補助診断法を開発するため、液状細胞診検体(LBC)から、HPV型判定とin situ hybridization, P16免疫細胞染色を施行し、病変との相関を解析した。

(4)子宮頸癌組織からDNAを抽出し、ヒトゲノムBACマイクロアレイCGHを用いて子宮頸癌の網羅的遺伝子解析を行った。

(5)腺癌に多く見られるHPV18型のE6,E7領域を標的としたsiRNA作製し、子宮頸癌由来培養細胞株における抗腫瘍効果を解析した。siRNAとアテロコラーゲン複合体を作製し、ヌードマウス皮下腫瘍における抗腫瘍効果について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 高感度ラマン分光装置を小型システム化しコルポスコープに搭載するシステムを開発した。レーザー波長は785nm,出力は40mW,波長は500-11700cm⁻¹であり一箇所につき3秒で計測した。癌部では測定条件を変えてもラマンスペクトルパターンが近似していることから再現性あると考えられた。一方で腺癌は肉眼的観察において困難な場合があるため、癌部と非癌部の測定部位の適正化を検討する必要があることが判った。

(2)HPV18型はHPV16型と同様ハイリスク型に分類されるが、HPV18型の感染は細胞形態所見に乏しいことが知られている。そのため、細胞診検査による見逃しが問題となっていた。我々は細胞像の中で細胞質変化の一つであるamphophiliaの所見がHPV18型に多いことを明らかにした。amphophiliaは一般に炎症性変化として捉えられるが、好中球出現などの炎症性背景所見に乏しくamphophiliaの目立つ細胞像はHPV18型感染も考慮にいれるべきと考えている。

(3)LBC検体からHPV型判定と同時にHPVのDNA組み込みパターンを解析した。さらにP16免疫細胞染色を行い、これらのコンビネーションアッセイによりCIN2以上の病変が検出できる感度は89%、特異度92.6%となることを明らかにした。HSILでHPV遺伝子が組み込まれているのは14%(9/57)であり、HPV16,51,52,58型であった。P16免疫細胞診はASCUS, LSIL, HSILで25%, 44%, 93%の陽性率であり細胞診の感度とほぼ同等の検出率であった。HPVの遺伝子が組み込まれていない状態では73%が陽性となるが組み込まれると100%の陽性率を示した。ハイ

リスク型が感染している細胞ではHSILで92%、LSIL以下では29%の陽性率を示し、P16免疫染色法はハイリスク患者抽出に有効な方法と考えられた。

(4) ヒトゲノムBACマイクロアレイCGHの解析では現在のところ、腺癌特有の遺伝子変化は見られていない。扁平上皮癌、腺癌合わせての解析結果では3q,11q, 5p, 6pで各々、75%, 65%, 45%, 40%の変化を認めた。遺伝子増幅は3q26.3, 5p15.2, 5p15.33, 5p13.1に見られ、遺伝子欠失は6q26-27, 11p12-14に見られた。6qの遺伝子変化は従来の報告にないことから興味深い。

(5)子宮頸癌由来培養細胞株SKG-II, HeLaはHPV18型DNAのウイルスが組み込まれている。これらの細胞株にHPV18型のE6-E7領域のsiRNAをトランスフェクションしたところ、E6,E7遺伝子発現が30%まで抑制され、ウエスタンブロット法にてE7蛋白質の発現低下とRb蛋白質の発現上昇が認められた。-Gal陽性細胞が増加したこと、P53蛋白質の発現に変化はなかったことから、我々の作製したsiRNAはウイルスE6,E7遺伝子発現を抑制し、老化を誘導して細胞増殖が抑制されると考えられた。siRNA・アテロコラーゲン複合体をヌードマウス皮下移植腫瘍に局注したところ、移植腫瘍の増殖抑制が観察された。摘出腫瘍ではKi67発現低下を認めており、細胞増殖能低下が示唆された。以上よりsiRNA・アテロコラーゲン複合体は新たな分子標的治療の候補となると考えられた。

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6件)

Fujii T, et al, 1st (10), ancillary testing of liquid-based cytology specimens for identification of patients at high risk of cervical cancer. Virchows Arch, 463, 545-555, 2008, 査読有

Okuda S, Fujii T, et al, 6nd (8), Semiquantitative assessment of MR Imaging in prediction of efficacy of gonadotropin-releasing hormone agonist for volume reduction of uterine leioma. Radiology, 248, 917-924, 2008, 査読有

Nishimura S, Fujii T, et al, 18th (12), Can ABCF2 protein expression predict the prognosis of uterine cancer? Br J Cancer, 99,1651-1655, 2008, 査読有

Fujii T., et al, 1st (12), Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol*, 29, 541-548, 2006, 査読有

Ishikawa M, Fujii T., et al, 2nd (10), overexpression of P16 ink4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia, *Int J Gynecol Cancer*, 16, 347-353, 2006, 査読有

Matsumoto K, Fujii T., et al, 4th (12), IgG antibodies to HPV16, 52, 58 and 6 L1-capsids and spontaneous regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer letters*, 231, 309-313, 2006, 査読有

[学会発表](計 19 件)

藤井多久磨 : human papillomavirus 感染とその関連分子を指標にした子宮頸部腫瘍の補助診断法の評価. 第 46 回日本癌治療学会総会, 名古屋国際会議場・愛知, 2008 年 10 月 30 日 - 11 月 1 日

Ohno A, Fujii T., et al, 2nd (6): Detections of Genomic Alterations in Uterine Cervical Cancer Using BAC Microarray. 67th Annual meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya congress center, Nagoya, Japan, October 28-30, 2008

藤井多久磨 : コルポスコピーにおける NBI システムの有用性の検討. 第 44 回日本婦人科腫瘍学会学術集会, 名古屋国際会議場・愛知, 2008 年 7 月 17 日 - 19 日

Fujii T., et al, 1st (1): New trend of molecular and optical tools to analyze CIN and cervical cancer. 3rd conference of Asia Oceania research organization on Genital Infections & Neoplasia, Seoul, Korea, May 29-31, 2008

Nakamura M, Fujii T., et al, 2nd (9): Anatomical structures of the vesicouterine ligament and the paracolpium in nerve-sparing radical hysterectomy. 39th Annual meeting on women's cancer, Tampa convention center, Tampa, Florida, U.S.A., March 9-12, 2008

Fujii T., et al, 1st (12): Combination of HPV alpha 9 species and p16 overexpression predicts progression of CIN1. 24th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, Beijing, China, November 3-9, 2007

Murakami I, Fujii T., et al, 2nd (8): Association between the physical status of HPV DNA and overexpression of the p16 protein in liquid-based cytology specimen. 24th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, Beijing, China, November 3-9, 2007

藤井多久磨 : 子宮頸癌 I、II 期の正確な術前評価に基づく治療法選択肢の提示. 第 45 回日本癌治療学会総会, 京都, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル 京都, 2007 年 10 月 24 - 26 日

Fujii T., et al, 1st (1): Cone biopsy for pregnant women. 6th Japan-Korea Gynecologic Cancer Joint Meeting, Hokkaido, Japan, August 17, 2007

Fujii T., et al, 1st (1): Combination of HPV alpha 9 species and p16 overexpression predicts progression of CIN1. HPV Workshop, Tokyo, Japan, June 13, 2007

Fujii T., et al, 1st(8) .: Japanese Society of Clinical Cytology Satellite Meeting Molecular cytology for uterine cervical neoplasia. 16th International Congress of Cytology, Vancouver, Canada, May 13-17, 2007

Fujii T., et al, 1st (10): A case report : Advantage for laparoscopic approach to resect a paraovarian tumor of borderline malignancy and adrenal gland carcinoma in a young woman. 16th Annual Congress of International Society for Gynecologic Endoscopy, Osaka, Japan, March 18-21, 2007

Fujii T., et al, 1st (9): Recent laparoscopic surgery in department of gynecology, Keio University Hospital. 16th Annual Congress of International Society for Gynecologic Endoscopy, Osaka, Japan, March 18-21, 2007

Fujii T., et al, 1st (12): Use of cadavers to contemplate radical hysterectomy. The 16th Annual Review Course on Gynecologic Oncology and Pathology, Kyoto, Japan, February 7-10, 2007

Hayashi S, Fujii T. et al, 2nd (9): Pretreatment Evaluation of Cervical Cancer Using High-resolution Magnetic Resonance Imaging. The 16th Annual Review Course on Gynecologic Oncology and Pathology, Kyoto, Japan, February 7-10, 2007

藤井多久磨 : 子宮頸部液状細胞診の特徴と細胞診断における注意点. 第 15 回日本婦人科がん検診学会学術集会, 東京・都市センターホテル, 2006 年 11 月 4 日

Nakamura M, Fujii T., et al, 2nd (11): P16INK4a immunohistochemistry as a predictive marker for cervical intraepithelial neoplasia. 23rd international papillomavirus conference, Prague, Czech Republic, September 1-7, 2006

Fujii T., et al, 1st(6): Intratumor injection of small interference RNA targeting human papillomavirus 18E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. 23rd international papillomavirus conference, Prague, Czech Republic, September 1-7, 2006

藤井多久磨 : 子宮頸部細胞診と HPV 感染との関わりからみた Molecular Cytology. 第 47 回日本臨床細胞学会総会春期大会, 横浜・パシフィコ横浜, 2006 年 6 月 9 -11 日

[図書] (計 4 件)

仲村勝、藤井多久磨、平尾薫丸、青木大輔 : 悪性腫瘍 - 子宮頸癌. 「産婦人科学テキスト」倉智博久、吉村泰典編集, pp.174 -199, 中外医学社, 2008.5

Fujii T. et al, 1st (10) Molecular diagnosis for cervical neoplasia. In Cervical Cancer Research Trends, NOVA Science Publishers, 111-135, 2007

仲村勝、藤井多久磨、2nd(2)：産婦人科系
基礎解剖学 ・産婦人科系おさえどころ・
子宮筋腫から見た解剖・子宮頸癌から見た
解剖・帝王切開から見た解剖・疾患から見
た解剖学．相磯貞和編集,PP.208 -217、メ
ジカルビュー社 ， 2007.12

平尾薫丸、藤井多久磨、2nd(6)：D.妊娠初
期 4 子宮頸部円錐切除既往妊婦．産婦人
科 専門医に聞く最新の臨床（中外医学
社），PP.388 -391， 2007.4

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 多久磨(FUJII TAKUMA)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10218969

(2)研究分担者

浅川 修一(Asakawa shuichi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30231872

田代 英夫(Tashiro Hideo)
理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・
客員主管研究員
研究者番号：90124370

(3)連携研究者

なし