

平成21年2月12日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591924

研究課題名（和文）分子生物学的予後因子による子宮頸癌の至適治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the optimal therapeutical approach of uterine cervical cancer based on the molecular markers.

研究代表者

鹿沼 達哉 (KANUMA TATSUYA)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：90241885

研究成果の概要：子宮頸癌の抗がん剤感受性に関わる分子生物学的因子を探索し、分子標的治療やテーラーメイド医療に結びつけるため、抗がん剤暴露によるアポトーシス関連蛋白の発現解析を行った。pAkt および pmTOR の2つのアポトーシス抑制系蛋白の発現が抵抗性細胞では有意に高い発現を示していた。治療前の子宮頸癌生検組織を用いた免疫染色の解析で、pAkt および pmTOR の治療前組織での高発現は、独立した予後不良因子であることが判明した。mTOR 阻害剤を併用した化学療法が、予後不良の子宮頸癌治療の至適治療となる可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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、抗がん剤感受性、予後因子、pAkt、mTOR、ラパマイシン

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は、先進国では減少傾向にあり、生活の欧米化に伴って増加しつつある子宮体癌とは対照的である。しかし、本邦では増加傾向にあり2010年には死亡率第4位に増加すると予測されている。特に10代20代の若年層の上皮内癌を含めた子宮頸癌は増加傾向にあり、性に関する考え方の変化は、従来35歳以降に急激に増加する進行子宮頸癌が、35歳未満で急増してきている。これら若年層の進行癌では、化学療法反応性は良好であり画像診断上は部分寛解や完全寛解とな

っても、その予後は35歳以上の層に比較し、極めて不良であることが指摘されている。臨床病理学的解析では、年齢因子以外にこの差を説明できるものは無い。既存のリスクファクターからは推定できない何か独立した因子が、若年子宮頸癌には存在することが推察されるが、手術、放射線、化学療法併用放射線治療など様々なオプションから、最適な治療法を選択するに足るエビデンスが存在しない。高齢者では放射線障害の副作用を患者さんに与えない抗癌剤治療と手術療法も、若年者では逆に予後を悪くする可能性が欧米

では指摘され、抗がん剤併用放射線療法が推奨されている。しかし、本邦では広汎全摘術の適応拡大のメリットも捨てきれず、術前化学療法を行うことも許容され、前向き比較試験も実施されている。

そこで、抗がん剤や放射線に対する感受性を治療開始前に予測し、最適な治療方法を個別化することが可能となれば、進行子宮頸癌の治療成績の向上および副作用による患者さんのQOL低下を減少させることにつながることは明らかである。子宮頸癌の治療法は、欧米での報告に示されるほど確立していないと判断されるので、translational studyとしてこの研究を行う意義があると考えた。

2. 研究の目的

子宮頸癌は先進国では減少傾向にあることから、研究のモチベーションが低く、意外にこの分野の研究報告が少ない。放射線でも手術と同等あるいはそれ以上の効果が期待できる癌と考えられ、それで不十分なら抗がん剤併用放射線療法で足りるとする臨床サイドの考えが、研究の乏しさにつながっているように思われる。しかしながら、若年子宮頸癌の予後不良は以前から経験的には指摘されていたが、それを裏付けるデータに乏しく顧みられなかった。また、近年の若年進行子宮頸癌の増加さらには放射線抵抗性の腺癌や腺扁平上皮癌の増加により、妊娠合併進行子宮頸癌や乳幼児を抱えた女性の子宮頸癌死亡に遭遇する頻度も増加し、この分野の研究が急務であると考えられる。

癌とアポトーシスについては、婦人科悪性腫瘍では、化学療法が主たる治療となる卵巣癌での研究が多い。子宮頸癌においては、BaxやBcl-2など数少ないアポトーシス関連遺伝子についての解析があるが、明確な臨床へのフィードバックはなされていない。また放射線感受性については、p53の発現やKi-67などと放射線感受性についての報告があり、放射線治療による予後を予測できる、との報告がある。アポトーシス誘導経路と抑制経路とは複雑なネットワークを形成しており、対象遺伝子の同定には、これらを網羅的に解析し、まずキーとなる分子を同定することにある。

3. 研究の方法

I preliminaryな研究結果から、子宮頸癌におけるアポトーシス回避メカニズムは、2つのアポトーシス誘導系の異常によるのではなく、アポトーシス抑制系の活性化が主たる要因であると考えられたが、結論とするには、さらに多くの蛋白についての解析が必要であり、また結果を普遍化するためには、細胞株だけでなく臨床サンプルの解析も重要である。

(1) 子宮頸癌細胞株を用いて化学療法剤感受

性試験を行い、感受性株と耐性株を同定する
(2) 感受性株と耐性株における、HPVタイプ、Rb、p53の状態をNorthern、Westernなどで調べる

(3) Apoptosis 関連遺伝子、Bax、Bcl2、Caspase-3、9、XIAP、Akt2、3、NF κ Bについて発現を調べる

(4) 抗がん剤耐性株に於ける異常が、Mitochondria 経路あるいは細胞内経路のどちらのApoptosis 誘導経路にあるのか、それともAkt 経路やNF κ BなどのApoptosis 抑制系に異常があるのかを明らかにする

(5) 明らかになった経路について、既存の遺伝子の異常を調べ、Key Molecule を同定する

(6) 平行して、化学療法薬添加・非添加における耐性株からのmRNAを抽出し、Differential Display法により、添加培養条件で発現する遺伝子のsubcloningを行う。

また、これらの遺伝子群が抗がん剤感受性株ではどうなっているかを観察し、解析する

(7) これらsubcloningした遺伝子について、臨床検体での解析を行い、治療抵抗性、高再発危険群の予見が可能かどうか検討する。

Western Blotによる解析

Apoptosis 誘導に関わる蛋白 TP53、Caspase-8

Apoptosis 抑制に関わる蛋白 PI3K、PTEN、Hsp90、TOR、Bad、14-3-3 σ 、4E-BP1、e1F4E

ECL detection キットを用いる

一次抗体(上記)、二次抗体などが必要である

追加細胞株

若年女性由来の子宮頸癌細胞株 C-4 I、MS751

高齢者対象細胞株 C33-A、HEC-1

ATCC から入手可能な細胞株である

MTT Assay with or without Paclitaxel

96 well 細胞培養系でMTT assay キットを用いて行う

Paclitaxel 濃度を、0、0.5、2.5、5、10、25 μ M で振る

24 から 96 時間培養する

Paclitaxel は、進行再発子宮頸癌に、CDDP との併用で、最も新しく有効性の証明された(2004年8月JCO) 抗がん剤であり、今後多用されることが予想される。和光純薬より入手可能である

Differential Display 法

32P-dATP 取り込みによるPCR法により、変性ポリアクリルアミドゲルへの2次元展開により行う

Differential Display に用いる Ambulatory Primer および NN-poly T プライマーは、Gene Hunter 社のキットを用いる

Imaging には BAS-1800 II を、Subcloning には

pGEM ベクターを用いる
400bp 以上の長い cDNA を得ることが、その後
の実験の成否大きく影響するので、最近
Roche から発売された RNaseH 含有の reverse
transcriptase を用いる予定である

Real Time PCR 法

ABI7000 を用いた Competitive PCR により、
Differential Display 法によって得られた、
fragments が本当に発現の差を有するもので
あるかを確認する

発現の多い mRNA については Northern Blot
にても確認することとする

II 患者さんの病理組織検体を使用し、遺伝子
発現解析を行う実験を行う場合には、院内
に設置された臨床試験審査委員会 (IRB) に、
自主臨床試験計画書を提出し、倫理委員会を
含めた審査を受け、承認された上で研究を開始
する。当該診査基準として、患者さんへの
インフォームドコンセントを紙面で確認し、
手術検体の一部を遺伝子発現解析に使用する
承諾を得た上で使用する。その決定は患者
さんに任せられ、実験への提供を拒否した場
合でも患者さんへの不利益はないことを説明
していること、などの要件が加味されている
臨床材料での確認

現在、IRB で承認されたプロトコールに則り、
手術時摘出子宮から、幅 3mm の短冊状に、子
宮頸癌組織および正常間質組織を含む標本
を、摘出後直ちにコンパウンドに包埋後、ド
ライアイスにて凍結し保存している。

これらの組織を用いて免疫染色を行う
対象は、細胞株を用いて、抗癌剤抵抗株と感
受性株とに差のあった蛋白とする。

また、Differential Display 法により
subcloning された、遺伝子については、既知
で抗体のあるものであれば Western Blot 法
で、未知ないしは抗体の入手不可能なものに
ついては、RNA 合成ベクターに cloning し、
RNA probe を作成し、これを用いて in situ
hybridization を行う

発現に差のある遺伝子の同定を行う
細胞への導入による抗癌剤耐性の獲得、増殖
能、転移能獲得などの確認

遺伝子として同定されているが機能不詳の
遺伝子も多く、これらの遺伝子が、子宮頸癌
における抗癌剤反応性や予後因子として同
定された場合には、機能も確認することが必
要である

塩基配列既知の遺伝子であれば RT-PCR 法に
より ORF を subcloning することは可能であり、
これを哺乳動物発現ベクターに導入し、
細胞内発現させ、その機能解析を行うことが
可能である

細胞への RNAi 導入による抗癌剤感受性能の
喪失などの確認

未知遺伝子や上記で全長クローニング不可
能は遺伝子の機能解析には、RNAi 用いる予定

である

高再発性や長期予後との関連の解析
臨床的に悪性度が高いか否かは再発や 5 年
生存率が同様組織、同臨床進行期の平均的再
発率や予後と比較して初めて知ることがで
きるので、最近の試料だけでは解析が不可能
である

当科では、7 年前から臨床材料を個人を同定
できない状態で体細胞変異遺伝子解析に用
いることについての患者さんからの同意を
得ており (紙面での承諾)、これらパラフィ
ン包埋組織を用いて、免疫染色することは、
可能である。抗体のない未知遺伝子につい
ては、約 2 年間の同様な同意を得て集積した前
記凍結材料を用いた in situ hybridizations
による発現の差を検討する。

4. 研究成果

In vitro の実験系においては、4 種類の子
宮頸癌細胞を用い、様々な濃度のパクリタキ
セル含有液で培養し、MTT アッセイによる感
受性測定、フローサイトメトリーによる細胞
増殖および細胞のサブ G1 集積解析、DNA の断
片化観察によるアポトーシス解析、ウエスタ
ンプロット法によりアポトーシス誘導経路
および抑制経路に存在する各種蛋白の発現
解析を行った。

パクリタキセルに対する感受性が最も高
かったのは HeLa 細胞で、最も低かったのは
CaSki 細胞であった。HeLa 細胞および CaSki
細胞を 5 μ M のパクリタキセル含有培養溶液
中で培養すると、24 時間で細胞周期 G2/M に
おける分裂停止、48 時間から 72 時間でサブ
G1 集積が増加した。高感受性の HeLa 細胞で
は、DNA 断片化の増加がより早期に明瞭とな
った。抵抗性の CaSki 細胞では、Akt の下流
にある mTOR が活性化され、mTOR の活性化を
抑制するラパマイシンで前処置すると、パク
リタキセルに対する感受性が有意に増幅され
た。

感受性株に比較し抵抗性株で有意に高い
発現を示していた蛋白は pAkt および pmTOR
の 2 つのアポトーシス抑制系蛋白であった
ので、治療前の子宮頸癌生検組織を用いた免
疫染色によりこの 2 つの蛋白の発現解析を
行ったところ、これらの高発現は従来の予後
因子とはまったく独立した予後因子である
ことが判明し、pAkt および pmTOR の治療前組
織での高発現群では低発現あるいは無発現
群に比較し、5 年生存率で約 40 ポイントも
の差が認められた。

子宮頸癌細胞に対する抗腫瘍効果はアポ
トーシスを誘導することにより発揮され、
mTOR を標的とするラパマイシンはパクリタ
キセル抵抗性の子宮頸癌細胞をパクリタキ
セル感受性に変えることが明らかとなり、子
宮頸癌の化学療法は、mTOR 高発現群には無効

あるいは有害であり、ラパマイシンとの併用により感受性が亢進し、予後の改善につながる可能性が示唆された。

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1件)

- ① Faried LS, Faried A, Kanuma T, Aoki H, Sano T, Nakazato T, Tamura T, Kuwano H, Minegishi T.

Expression of an activated mammalian target of rapamycin in adenocarcinoma of the cervix: A potential biomarker and molecular target therapy.

Mol Carcinog. 2008 Jun;47(6):446-57
査読有

[学会発表] (計8件)

- ① Leri S. Faried, Tatsuya Kanuma, Tomoko Nakazato, Tomohoro Tamura, Takashi Minegishi

Predictive and prognostic rple of activated Akt/mTOR in cervical cancer treated with cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy.

第59回日本産科婦人科学会学術講演会、2007.4.16 京都

- ② 青木 宏、村田知美、平川隆史、中村和人、鹿沼達哉、峯岸 敬

当院における子宮頸癌に対する術前化学療法(NAC)の検討

第59回日本産科婦人科学会学術講演会、2007.4.16 京都

- ③ 鹿沼達哉、峯岸 敬、杉原志朗、関本 弘、家坂利清、井上 浩

シンポジウム2「子宮頸癌検診システムにおけるHPV-DNA検査の役割」

子宮頸癌検診システムにおける自己採取型HPV-DNA検査の試み

第48回日本臨床細胞学会総会(春期大会) 2007.6.8 千葉

- ④ Tatsuya Kanuma, Leri S. Faried, Tomoko Nakazato, Tomohiro Tamura, Hiroshi Aoki, Takashi Minegishi.

mTOR/pAKT; Prognostic factor of the uterine cervical cancer.

4th Canada-Japan Bilateral Workshop of Reproductive Biology.

2007.7.31 Hirosaki

- ⑤ Tatsuya Kanuma, Leri S. Faried, Takashi Minegishi, Hiroshi Aoki, Tomoko Nakazato

Predictive and prognostic role of activated Akt/mTor in cervical cancer

treated with Cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy.

XXth Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynaecology.

2007.9.21 Tokyo

- ⑥ 鹿沼達哉、峯岸 敬、杉原志朗、関本 弘、家坂利清、井上 浩

子宮頸癌検診システムにおける自己採取型HPV-DNA検査の意義

シンポジウム: HPV検査を併用した子宮がん検診の実際

第16回日本婦人科がん検診学会

2007.11.10, 東京

- ⑦ 鹿沼達哉、齊藤貴之、関本研一

臓器別がん診療手帳を用いた地域連携の試み

ワーククショップ8 がん診療連携拠点病院と地域ネットワーク

第46回日本癌治療学会総会 2008.11.1 名古屋

- ⑧ 渡利英道, 鹿沼達哉, 大田陽子, 三田村卓, 加藤達矢, 保坂昌芳, 藤堂幸治, 首藤聡子, 武田真人, 蝦名康彦, 峯岸敬, 櫻木範明

術前化学療法を施行した子宮頸癌症例におけるアポトーシス抑制蛋白clusterinの発現と治療反応性および予後因子との関連

第46回日本癌治療学会総会 2008.10.31 名古屋

[図書] (計2件)

- ① 青木 宏、鹿沼達哉

「産婦人科外来ベストナビゲーション ここが聞きたい105例の対処と処方」

V. 腫瘍 リンパ浮腫

92. 広汎性子宮全摘術後早期に、リンパ浮腫、リンパ管炎、下肢蜂窩織炎が発症した患者です

93. 広汎性子宮全摘術を受けた患者です。再発もなく順調に経過していましたが、2年過ぎてから片側下肢の著明なリンパ浮腫(疼痛はない)が発生しました。

癌性疼痛

94. コデイン経口投与で十分な除痛ができない終末期の患者です。

臨床婦人科産科 特集号 61(4):616-621, 2007.4 医学書院

- ② 青木 宏、中村和人、鹿沼達哉、峯岸 敬

子宮頸癌に対する術前化学療法の意義 特集「子宮頸部の病変とその対策」

産婦人科治療 95(3):287-291, 2007 永井書店

[その他]

[参考論文] (計3件)

- ① Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Sakurai S, Fukuda T, Nakajima T.
Immunochemical analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in liquid-based cytology samples from uterine cervical lesions.
Cancer. 2008 Apr 25;114(2):83-8.
- ② Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Sakurai S, Fukuda T, Nakajima T.
Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions.
Int J Gynecol Cancer. 2008 18(1):121-7.
- ③ Nakamura K, Aoki H, Hirakawa T, Murata T, Kanuma T, Minegishi T.
Compartment syndrome with thrombosis of common iliac artery after gynecologic surgery.
Obstet Gynecol. 2008 112:486-488

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿沼 達哉 (KANUMA TATSUYA)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：90241885

(2) 研究分担者

峯岸 敬 (MINEGISHI TAKASHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00209842