

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670727

研究課題名(和文)新規蛍光プローブの化学的ナビゲーションを応用した子宮頸癌円錐切除範囲の決定

研究課題名(英文) Determination of the range of resection in conization of the cervix with chemical navigation of novel fluorescent probe

研究代表者

岩井 加奈 (Iwai, Kana)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60588531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では子宮頸癌の前癌病変に特徴的な酵素活性を同定し、蛍光プローブ分子を用いて頸部前癌病変の可視化を実証し、将来の頸癌前癌病変の術中蛍光診断(化学的ナビゲーションシステム)の臨床応用を目指している。本研究においてCIN1からCIN3、微少浸潤扁平上皮癌においてGGTの染色強度が強い傾向を認めたと、現時点では有意差を認めなかった。これは、実験手技に起因する可能性を考えている。今回、GGTの特異的な発現亢進の可能性を明らかにできた。今後の蛍光プローブへの研究につなげたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is the clinical application of surgical navigation system for determination of the range of resection in conization. We revealed that the staining intensity in the immunohistochemistry for GGT in microinvasive cancer was strong. But there was no significant difference between CIN1 and microinvasive cancer. We could revealed the possibility that GGT expressed increasingly in microinvasive cancer. We want to realize chemical navigation system with novel fluorescent probe in conization.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸癌 GGT 円錐切除術 前癌病変

### 1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌予防ワクチンが普及しつつあり、将来的に子宮頸癌罹患数の減少は期待されるが、前癌病変である異型成病変や上皮内癌に対しては適切な予防や治療法がいまだに確立していないのが現状である。gamma-glutamyltransferase (以下 GGT) は グルタチオンなどの  $\gamma$ -グルタミルペプチドを加水分解し、他のペプチドやアミノ酸に  $\gamma$ -グルタミル基を転移する酵素で、生体に広く分布する酵素であるが、がん細胞の細胞膜に過剰発現しており、肝臓癌や甲状腺癌の発癌過程で、前癌細胞においてその酵素活性が亢進していることが報告されている。子宮頸癌では、患者血清中の GGT 蛋白濃度が前癌病変と比較し浸潤癌では有意に高いことが報告されており、子宮頸癌においても発現または酵素活性が亢進している可能性がある。

従来、前癌病変に対しては妊孕能温存目的に円錐切除手術が行われてきたが、切除後の遺残のリスクが常に問題となる。微小初期癌の場合、MRI や PET 等の画像検査でも検出不可能であり、病変をよりの確に可視化する新たな検査法の開発が望まれてきた。近年、癌細胞表面に発現する酵素に反応して初めて発色する新規アミノペプチダーゼ反応性蛍光プローブが開発された。この新規蛍光アミノペプチダーゼ結合プローブを用いて子宮頸癌の前癌病変を的確に可視化し治療成績の一層の向上を図る蛍光発色検出法が確立すれば、頸部摘出手術中に用いることで、リアルタイムに正確に病変範囲を確認でき、術中蛍光診断により遺残なく的確に切除範囲を決定できることが期待できる。

### 2. 研究の目的

子宮頸癌は乳癌より罹患ピークが若く、しかも近年 20 代後半から 30 代にかけて急増している。浸潤癌に進展すればいまだ予後不良な疾患であり、未婚者や未産婦における子宮温存も当然困難となる。この世代の多くは子育てやあらゆる分野に社会進出しており、まさに現在の日本社会を支える現役世代である。したがってこの世代の子宮頸癌治療を、妊孕能を担保しつつ確実に根治することは、少子化対策だけでなく、医療経済面においても多大な社会的利益につながる。この点で子宮頸癌治療の成績向上は、他の肺癌や前立腺癌など比較的高齢者に多い癌よりもより一層重要であり、喫緊の課題であるといえる。

これまで前癌病変や初期癌に対し、妊孕能温存のために行われてきた円錐切除術では、病変が生じる扁平上皮-円柱上皮移行部を複方ヨードグリセリンで染色する程度しか方法がなく、実際ががん細胞を視認することは困難であった。このためしばしば不完全切除による遺残や再発、あるいは過剰切除に伴う頸管短縮や頸管狭窄、不妊症や流早産等の周産期合併症が臨床上的重大な合併症となってきた。

したがって本研究により術中にリアルタイムに正確に病変範囲を検出する診断法が確立すれば、今後頸癌の診断治療に画期的な進展と与えるものと予測される。

### 3. 研究の方法

本研究で使用する新規アミノペプチダーゼ反応性蛍光プローブ ( $\gamma$ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green : gGlu-HMRG) は、がん細胞表面の GGT との接触により投与後数分で活性化される蛍光イメージングプローブである (Urano Y, et al. Sci Transl Med. 23; 3: 110ra119, 2011)。gGlu-HMRG プローブは親水性のため細胞膜を透過しないが、癌細胞表面の GGT により加水分解されて HMRG となると蛍光を発し、疎水性となるため細胞膜を透過して細胞内のリソソームに蓄積する。アミノペプチダーゼにより加水分解される (開環になる) と、可視光の蛍光を発する。

微小癌病変を可視化するために蛍光プローブは有用なツールである。蛍光プローブは、標的物質の非存在下では蛍光を発せず、標的物質と反応して初めて蛍光性に変化する有機分子である。低濃度の標的物質が検出可能で、生体組織や臓器内に存在する微小標的物質を高感度に可視化できることから、多方面で主に研究試薬として利用されているが、活性化までの時間が数時間から数日を要し、検出時間が長いことが臨床応用へ普及しにくい理由であった。gGlu-HMRG プローブはこの問題点を一気に解決するものである。婦人科がんでの応用を目指す動きはまだ無い。

アミノペプチダーゼ反応性蛍光プローブを用いて子宮頸癌の前癌病変や癌病変の臨床検体や生体でのリアルタイムイメージングが可能となれば、将来的には早期診断だけでなく、子宮温存手術の際に術中蛍光診断 (化学的ナビゲーションシステム) により遺残なくまた必要最小限な切除範囲を把握しつつ手術を継続でき、これまでの頸癌治療に画期的な進展をもたらすものと期待される。

まず、臨床検体を用いた子宮頸部前癌病変および初期微小浸潤癌病変における GGT 特異的過剰発現の実証を行う。

#### i) 病理組織検体を用いた癌病変の GGT 発現確認

当院で生検および円錐切除術を施行した病理組織検体を用いて頸部前癌病変および初期微小浸潤癌病変の GGT 発現確認を行う。

具体的には、正常および子宮頸部異形成 (軽度、中等度、高度)、上皮内癌および微小浸潤癌と診断された組織を対象とし、パラフィン包埋組織および凍結組織検体における GGT 蛋白酵素の発現の有無を抗 GGT 抗体を用いて免疫組織染色法により確認する。

#### ii) 血清サンプルを用いた血中 GGT 濃度の検討

病理組織診における癌病変の GGT 発現の異形成の程度により差を認めた場合は、血清における血中 GGT 濃度の差を認めるか明らかにする。

正常女性、子宮頸部異形成（軽度、中等度、高度）、上皮内癌および微小浸潤癌患者より採取した血清サンプルより、血清中の GGT 蛋白の発現の有無を ELISA 法により確認する。可能であれば正常女性の 90 パーセントイル値を算出し、将来的には前立腺における PSA のような健診に利用できるマーカーとするための予備データとする。

#### 4. 研究成果

子宮頸癌の前癌病変である、CIN1 と CIN3 症例、さらに微小浸潤癌と診断された組織に対して、パラフィン包埋組織および凍結組織検体における GGT 蛋白酵素の発現の有無を抗 GGT 抗体を用いて免疫組織染色法により確認した。

CIN1 症例は、子宮腔部の生検のパラフィン包埋組織に対して GGT 蛋白酵素の発現をみた。HE 染色では、上皮層 1/3 に腫大した核を認め、CIN1 相当の像である。また、背景には koilocytosis の像を伴っていた。GGT 染色では異型細胞と一致する部位に弱い GGT 蛋白酵素の発現を認めた（図 1）。

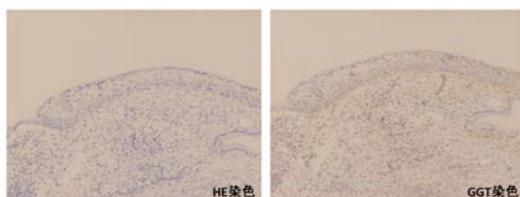


図 1 CIN1 における GGT の発現

CIN3 症例は、子宮腔部円錐切除標本のパラフィン包埋組織に対して GGT 蛋白酵素の発現をみた。HE 染色では、核腫大、核クロマチン増量、極性の乱れを呈する異型細胞が下 2/3 層を超えて増殖しており CIN3 の像である。GGT 染色では異型細胞と一致する部位に GGT 蛋白酵素の発現を認めた（図 2）。CIN1 症例と比べて染色強度は高かった。



図 2 CIN3 における GGT の発現

micro invasive 症例は、子宮腔部円錐切除標

本のパラフィン包埋組織に対して GGT 蛋白酵素の発現をみた。HE 染色では、充実胞巣状構造の異型扁平上皮細胞が浸潤増殖していた。縦軸方向の広がり 5mm で浸潤の深さは 1.5mm であることから微小浸潤扁平上皮癌の像である。GGT 染色では扁平上皮癌と一致する部位に GGT 蛋白酵素の発現を認めた（図 3）。染色強度は、CIN1、CIN3 症例と比べて高い傾向があった。

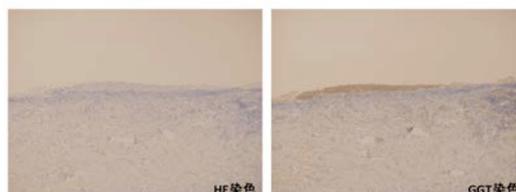


図 3 micro invasive における GGT の発現

子宮頸癌では、患者血清中の GGT 蛋白濃度が前癌病変と比較し浸潤癌では有意に高いことが報告されており、子宮頸癌前癌病変においても活性が亢進していると考えられた。本研究において、CIN1、CIN3、微小浸潤扁平上皮癌における GGT の活性を免疫組織染色で検討した。CIN1 から CIN3、微小浸潤扁平上皮癌において染色強度が強い傾向を認めたが、発現に現時点では有意差を認めなかった。

蛍光プローブを頸部上皮に局所投与を行い、酵素活性によりプローブを発色させ、蛍光内視鏡でリアルタイムでの可視化を実証するためには、子宮頸癌の前癌病変に特徴的な酵素活性を同定する必要がある。さらに、CIN1 から CIN3、微小浸潤癌につれて酵素活性が強いものが理想的である。特徴的な酵素活性の候補のひとつとして、gamma-glutamyltransferase (以下 GGT) を想定していた。本研究では、GGT 活性が前癌病変の進行に伴い強くなる傾向を見いだしたが、統計的に有意差を認めるまでは至らなかった。これは、実験手技に起因する可能性を考えている。免疫組織染色には至適な濃度・時間の設定が必須であるが、これまで子宮頸癌前癌病変の染色に対する報告がほとんどないためその設定に難渋した。

GGT の特異的な発現亢進の可能性を明らかにできた。今後の蛍光プローブへの研究につなげたいと考えている。

#### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

山田有希、岩井加奈、新納恵美子、森岡佐知

子、伊東史学、重富洋志、棚瀬康仁、川口龍二、小林浩 超音波メスを用いた子宮頸部円錐切除術の治療成績 第68回日本産婦人科学会学術講演会 2016年4月24日 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩井加奈 (IWAI KANA)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60588531

### (2) 研究分担者

金山清二 (KANAYAMA SEIJI)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10423914

棚瀬康仁 (TANASE YASUHITO)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20423915

古川直人 (HURUKAWA NAOTO)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50347556

川口龍二 (KAWAGUCHI RYUJI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50382289