

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本産科婦人科学会東北連合地方部会誌 (2004.03) 51号:105～107.

婦人科癌治療の新たなアプローチ
—発生学から見た癌浸潤転移の解析と内視鏡手術—

山下 剛

婦人科癌治療の新たなアプローチ — 発生学から見た癌浸潤転移の解析と内視鏡手術 —

旭川医科大学

山下 剛

地域中核都市における医科系大学の存在のあり方が問われている現在、当大学のような医科大学臨床系講座での医学研究の取り組み方として、どのようなものがふさわしいのであろうか。特色ある研究テーマという点からみると多くの代表的な研究機関で行われているような研究課題に対する取り組みとはやや角度の異なる、多様な視点からの臨床研究あるいは基礎研究への取り組みが重要視されても良いと考えられる。このような観点にたち旭川医科大学産婦人科講座では、従来から臨床応用の可能性を考慮した基礎研究、あるいは臨床研究の一部分としての基礎理論の構築に力点を置いた研究を行ってきた。今回これらの2つの観点から、基礎オリエンテッドなテーマとして個体発生を制御するホメオボックス遺伝子が婦人科癌浸潤転移に及ぼす影響について、臨床オリエンテッドなテーマとして、子宮頸癌のセンチネルリンパ節の同定と広汎子宮全摘出術への腹腔鏡の適応～低侵襲縮小手術適応への可能性～の2点について報告する。

1. ホメオボックス遺伝子の機能と婦人科癌

ホメオボックス遺伝子群はハエの胚発生を制御する遺伝子として発見された。ホメオボックスによりコードされるホメオドメインと呼ばれる共通の蛋白構造をもち、この機能ドメインが標的 DNA に結合することにより転写制御を行い、初期発生に必要な関連蛋白の時間的空間的発現調節を行っている。この遺伝子群は種を越えて存在しており、ヒトでは 39 個の遺伝子群が 4 つの染色体上にクラスター配列され、中枢神経においてはその遺伝子の配列とは逆方向に頭部から尾部にかけて発現していることが知られており、個体発生においてヒトでもハエと類似の機能を担っていることが報告されている。in vitro およびノックアウトマウスの研究などから、ホメオボックス遺伝子蛋白群は蛋白複合体を作り機能し、初期発生において各種臓器組織などの構造体を構成する細胞群に対して、構造体を形成する個々の細胞の固有の位置を決定するため情報の伝達を担いボディパターンの形成を行っていることが

明らかになってきた。

最近このホメオボックス遺伝子群（主として HOX 遺伝子）が癌細胞においても何らかの役割を果たしている可能性があることが乳癌、肺癌、大腸癌などの上皮性腫瘍で報告され始めている。すなわち癌細胞では、発生時ボディパターン形成に利用したこれらの遺伝子群を再発現、あるいは消失させ、細胞群の位置情報の乱れを誘発し、また血管新生を制御することで癌浸潤および転移に深く関わっている可能性がある。事実、癌浸潤転移において重要な遺伝子と考えられている細胞外マトリックス分解酵素 MMP の上流遺伝子である ETS-1, ETS-2 を制御する機能をもつ可能性があることが報告されている。分子レベルでは遺伝子の構造異常による蛋白分子の正常機能からの逸脱が考えられ、また HOX 遺伝子のような、グロスター構造をとり多数の遺伝子群の時間的空間的発現が様々な器官臓器形成を制御する遺伝子では、その構造機能異常のみならず発現プロファイルの違いも表現型の異常には重要であると考えられる。

婦人科癌の領域では、近年子宮体癌および卵巣癌の患者数増加が顕著であり、これらの疾患が局所病ではなく早期から転移しやすい全身病として考えられていることは重要である。これらの癌では様々な治療法が開発されているにもかかわらず進行転移例では予後が不良であるため、長期間にわたり化学療法等を受けている患者が多いが、その中にはこのような治療法が不必要あるいは不適当な患者も相当数いると思われる。これは原発巣が初期相当の進行度でありながらその段階での転移などが希ではないことや、一度臨床的緩解に到達しても高頻度で再発してくるため、再発例の予測や再発例に対する正確な早期診断、追加治療に対する判断の困難性が一因となっているからと考えられる。従って医療資源の効果的な投資の観点からも、患者数の増加が懸念される癌での、特に再発の可能性、再発部位の推定、予後の推定に言及できる診断法の開発は必須で、ホメオボックス遺伝子のもつ初期発生時の細胞移動とその関連情報を標的にした転移浸潤に対す

る癌診断治療法の可能性を探ることで、再発監視を重点的に行うべき、また再発に対する治療を必要とすべき患者の個別化を行えることができればその臨床意義も大きいと考えられる。現在まだ進行中の研究ではあるが、このような研究上のエンドポイントを持って代表的なホメオボックス遺伝子である HOX 遺伝子の卵巣癌、子宮体癌における発現解析と機能解析を行っている。

2. HOX 遺伝子の卵巣癌および子宮体癌での発現プロフィール

今回の検討では癌細胞として卵巣癌株 5 種類 (ES-2, SMOV-2, JHOC-6, SKOV-3, CAOV-3) および子宮体癌株 5 種類 (AN3CA, KLE, ISHIKAWA, HEC1A, HEC1B, RL-95) を用いた。正常対照としては、当附属病院倫理委員会の承認後、インフォームド consent のもとで得られた良性 (子宮筋腫, 卵巣嚢腫など) 手術時に採取された各正常子宮内膜 (分泌期および増殖期), 卵巣上皮組織を使用した。培養細胞はフラスコにて培養しコンプレント時にトリプシンを用いて細胞を回収した。手術検体は採取後直ちに液体窒素にて凍結された検体を使用した。RNeasy Protect Kit (QIAGEN) を用いて各検体から抽出した total RNA の濃度を $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整した後これを用いて cDNA を作成し、その後 39 個の HOX 遺伝子の特異的プライマーをそれぞれ作成し PCR (SmartCycler, Cepheid) が行われた (realtime-RT-PCR)。これらの遺伝子産物の配列が目的の HOX 遺伝子産物の塩基配列であることは nested PCR および/あるいは sequence 法を用いて確認した。 β -actin を用いて再度発現量の補正をした後、内部標準曲線から計算された各検体での目的遺伝子の発現量を、正常対照の発現量を 1 とした相対比に換算し詳細に検討した。その結果卵巣癌における HOX 遺伝子発現異常については、39 個中 14 個の遺伝子に、およそ 2 倍から 10 倍の過剰発現を認めた。また正常では全く発現せず癌のみで発現しているものもあった。この過剰発現は 4 つのクラスターのうち HOXB クラスターに集中して認められた。また、それ以外のクラスターでは主としてハエの腹部形成 abdominal-hox ホモログである HOX7 以下に認められた。特に HOX13 は 3 つのクラスターで過剰発現が認められ、HOX 遺伝子異常と卵巣癌の進展に関連があることが示唆された。発現の減弱についても多くの遺伝子で認められたが、詳細な検討については今後の課題とした。子宮体癌における HOX 遺伝子発現異常についても同様に検討した結果、39 個中 2 個の遺伝子に過剰発現が認められたが、卵巣癌とは

異なりむしろ発現の減弱を比較的多数の遺伝子に認めた。これらの減弱は卵巣癌とは異なり癌細胞でほとんど発現が消失してしまうものであり、卵巣癌と子宮体癌の癌進展における HOX 遺伝子の役割の違いを示唆しているものと考えられた。またこれらのプロフィールが癌細胞の浸潤転移能の違いを示している可能性があると考えられた。

3. HOX アンチセンス導入と癌浸潤転移抑制の検討

子宮体癌と卵巣癌に共通して過剰発現が認められた HOXB クラスターおよび HOX13 パラログの結果から、HOXB13 遺伝子の過剰発現の抑制が癌細胞の浸潤能にどのように影響するかを検討した。アンチセンス作成のため HOXB13 遺伝子の全長シークエンスより、翻訳開始点近傍で他の HOX 遺伝子とのホモロジーが低い部分を選択し、ここに特異的プライマーを作成し PCR を行った。作成した PCR 産物はシークエンスによりその塩基配列を確認した後、reverse 方向にベクター (pcDNA3.1) に挿入し、再度シークエンスにてベクター上の塩基配列に異常がないことを確認後直線化し癌細胞への遺伝子導入用ベクターとした。導入用の癌細胞には子宮体癌細胞では AN3CA 細胞、卵巣癌では SKOV3 細胞を使用した。遺伝子導入に当たっては、 2.6×10^6 個の細胞に対するエレクトロポレーション法を用いた。導入後 48 時間の培養の後、G418 を用いて導入細胞の選別を行い、さらに 5 日間の再培養後、細胞の一部を回収しアンチセンス遺伝子の導入発現をベクター配列および HOXB13 配列のプライマーを用いて RT-PCR 法にて確認した。HOXB13 アンチセンス導入癌細胞の浸潤能が非導入細胞に対して低下しているかどうかを確認するため、確立した 3 つの導入細胞系列を用いてマトリジェルアッセイを行った。 5×10^6 個の細胞をマトリジェルチャンバーに乗せ、そのままあるいはファイブロンectin をケモアトランクタントとして添加後、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、72 時間各細胞系列を培養し、非導入細胞およびベクターのみ導入細胞を対照として、それぞれの細胞系列でマトリジェルを通過しメンブレンに固着した細胞のカウントを行った。その結果子宮体癌細胞と卵巣癌では異なる変化を示した。子宮体癌細胞ではアンチセンス導入細胞において完全に浸潤能が消失し、最大 72 時間の培養にても浸潤が認められなかったが、卵巣癌細胞では導入細胞では 36 時間培養までは時間毎の浸潤能の低下が観察されたが、それ以降も培養を続けると 48 ないし 60 時間で非導入細胞のそれと同等となった。ベクターのみ導入細胞では浸潤能に変化はなかった。これらの結果から、子宮体癌株および卵

巢癌株の双方で、過剰発現している HOXB13 遺伝子のアンチセンス導入によりその浸潤能が抑制されることが確認されたが、卵巣癌では HOXB13 の浸潤能に対する効果は redundant である可能性が示唆された。

これらの結果から 2 つの癌においてホメオボックス遺伝子はその転移浸潤に大きな役割を持っているだけでなく HOX 遺伝子そのものが子宮体癌、卵巣癌の転移浸潤を直接制御している遺伝子の一つであることを示唆していると思われた。従って HOX 遺伝子の過剰発現を直接制御することによりこれらの婦人化癌の浸潤転移を抑制できる可能性が示された。

4. 子宮頸癌における腹腔鏡下広汎子宮全摘出術の適応とセンチネルリンパ節ナビゲーション法の併用による子宮頸癌縮小手術への基礎的検討

子宮体癌や卵巣癌と比較し、子宮頸癌は比較的局所進行の疾患であると考えられている。進行子宮頸癌の標準的治療法は手術療法、放射線療法、化学療法、およびそれらの組み合わせが一般的であるが、1b 期の治療は現在日本では手術療法が主流を占めている。1b 期においては通常広汎子宮全摘術が適応されるが、開腹手術による手術侵襲は小さくはなく、とりわけ下腹神経、骨盤神経の切断された症例では外科的侵襲の大きさのみならず、排尿機能の低下喪失による機能障害の副作用も無視できない。実際には 1b 期であれば癌の直接的な子宮外進展はないので基幹部を広汎に切除する理由の大きな要因は基幹部血管群を摘出することのみならず基幹部リンパ節を完全に郭清することにあることが考えられる。しかしながらまた、このようなリンパ節郭清においては郭清後のリンパ浮腫も患者を苦しめる要因の一つにあげられるのは周知の事実である。米国ではこのような進行期の患者に対しても放射線化学療法同時療法が選択の一つとされており、その治療法自体の副作用はあるにしても上述したような手術による障害は残らず、患者の治療法選択の機会としても重要である。これらの諸問題を解決し、術後補助療法の不必要な患者に対する術後 QOL を向上させ手術療法に対するアドバンテージを高めるため、当科では子宮頸癌における腹腔鏡下広汎子宮全摘術とセンチネルリンパ節ナビゲーション法の併用による子宮頸癌低侵襲縮小手術への基礎的検討を行っているので報告する。

通常子宮頸癌の進行期の決定には画像診断を持ち込

まず、参考意見とすると取り扱い規約にあるが、当科では進行期の決定自体については規約どおりであるが、手術方法の決定には MRI 診断を積極的に取り入れている。すなわち MRI 上子宮外進展のないことが明らかであるものについてこの内視鏡下広汎子宮全摘術を適応している。このような症例においては手術器具の改良により現在では開腹手術に比較し遜色のない広汎性の摘出範囲が確保され、現時点では再発率などにも差がないことから術式として適当であると考えている。最近ではさらに神経温存手術を積極的に取り入れつつある。当科では現在 2 期以上の症例に対しては原則として放射線化学療法同時療法を施行しているが、倫理委員会の承認を経て特に患者の同意を得られたケースでは、主治療前に内視鏡下センチネルリンパ節ナビゲーション法によるリンパ節転移診断への試みも行っている。Sentinel node は腫瘍からのリンパ流を最初に受けるリンパ節と定義される。従って癌細胞がまず Sentinel node へ転移成立後そこからさらに拡大するという仮説が成立すれば、Sentinel node を sampling することによりリンパ節転移の状況を把握することができると考えられる。乳癌手術等では Sentinel node に転移が無ければリンパ節郭清を省略できる可能性が報告されており、婦人科領域においても子宮頸癌においてこの理論が成立するかどうかは重要である。いずれ Sentinel node 摘出による転移診断の適切性が確認されれば、現在行われている広汎なリンパ節郭清を省略し縮小手術が可能と考え症例の積み重ねを行っている。さらに将来的には内視鏡下広汎子宮全摘(神経温存法)を組み合わせることで、現時点で考えられる最も侵襲の低くかつ成績の良い手術療法が完成できると考えている。Sentinel node の同定方法はまず、適応のある症例に対しては術前にアイソトープの子宮腔部への注入による Lymphoscintigraphy を行い、骨盤リンパ節における Sentinel node の予備的検討を行っておく。術当日には術前にアイソトープの再注入(ガンマプローブ法)と術中に色素であるリンファズリンを注入し(目視法)、両法の併用により Sentinel node を同定する。以前は開腹手術時にセンチネルリンパ節同定を行っていたが、最近では通常はこれらの同定を内視鏡を使用して行っており、引き続き広汎子宮全摘に移行している。これらの方法により得られた結果について詳細を報告し、この方法がもつ課題と今後の方向性について言及したい。