

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:19～25.

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

旭川医科大学産婦人科

山下 剛

Abnormal function of homeobox containing genes, HOX genes, in gynecologic cancers and laparoscopic surgery in gynecologic malignancies as minimum invasive surgery

Tsuyoshi Yamashita

Gynecology and Obstetrics, Asahikawa Medical College

Abstract HOX genes are homeobox containing transcription factors that regulate movement of the cells for establishing embryonic body pattern. Recent studies demonstrate that HOX genes provide information of cells position in the tissue forming organs, suggesting HOX genes play important role in invasion and metastasis of cancer cells. In fact, abnormal HOX function has been reported in a variety of cancers including gynecologic cancers. Thus, we investigated abnormal HOX expression in ovarian and endometrial cancers by real-time RT-PCR. It revealed that in 32 out of 39 HOX genes examined in this study, 17 out of 32 genes strongly overexpressed in ovarian cancer compared to that in normal ovarian tissue. In contrast, only 3 of them showed overexpression in endometrial cancer. To clarify that these overexpressions involve directory with the invasion and metastasis of these cancers, antisense DNA of HOX B13, that is overexpressed in both ovarian and endometrial cancers, was introduced into each ovarian and endometrial cancer cells (SKOV-3 and AN3CA cell lines) and chemo-invasion assay (matrigel assay) was performed. In ovarian cancer cells, invasion rate of transfected cells with HOX B13 antisense showed 50% reduction compared to that in original cells. However, in endometrial cancer cells, almost all cells showed negative invasion ability. These data suggest that abnormal HOX genes may contribute to function of invasion/metastasis in these gynecologic cancers.

As a recent surgical treatment of cervical cancer, we have applied laparoscopic approach. Laparoscopic surgery is considered as minimum invasive surgery and feasible for early stage cervical cancer. On the basis of the concept, laparoscopic sentinel navigation surgery (pelvic lymphadenectomy) and following laparoscopic assisted radical hysterectomy are applied in my facility under permission of the ethical committee. So far, 26 patients with cervical cancer have undergone sentinel navigation surgery and detection rate of sentinel lymph nodes was 88.5%. Sixteen patients have undergone laparoscopic assisted radical hysterectomy including total pelvic lymphadenectomy of post-sentinel surgery except 2 cases showing severe pelvic adhesion by endometriosis. There is no recurrence of the disease up to now (~ 4.2 years) and post-

operative QOL was adequate for application of the technique.

Key words: HOX・Homeobox・Invasion and metastasis・Laparoscopic surgery・Radical hysterectomy・Sentinel navigation surgery

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。これらの遺伝子産物は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とが知られている(1)。この遺伝子群は種を越えて存在し、ヒトでは39個の遺伝子が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染色体上の配列方向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特徴で、進化上遺伝子重複や染色体倍加などの現象により遺伝子の機能が強化され個体の形態形成に重要な遺伝子として、現在まで基本遺伝子として生き残っていると考えられている。従っ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(2)。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。

婦人科臓器は一般に発生学的に中胚葉由来の臓器であり、これらの中胚葉細胞は胎生初期に primitive streak から外胚葉細胞が Epithelial-mesenchymal transformation (3) といわれる形態機能変化を経て発生し、と同時に細胞の移動が始まり、細胞の適切な位置移動により以後の形態形成およびそれらの機能の発現が正しく行われる。これらの中胚葉形成にもホメオボックス遺伝子は中心的な役割を果たしていることが発生学の分野では数多くの報告がなされてきた。

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(4)。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。このような現象は単に癌細胞の浸潤転移のみならず、良性疾患である子宮内膜症で認められる浸潤転移あるいは生殖細胞の移動や受精卵の着床にも少なからず関与していることが報告されている。

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。このような疾患での、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 (real time-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 17 個の遺伝子に、2 倍以上の、そのうち

6 個の遺伝子に 5 倍以上の過剰発現を認めた。これらのうち 4 個の遺伝子では正常では全く発現せず癌のみで発現していた。この過剰発現は 4 つのクラスターのうち HOXA および B クラスターに集中して認められた。パラログでは特に 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 (図 1, 2)。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 3 個の遺伝子に 2 倍以上の、そのうち 2 個

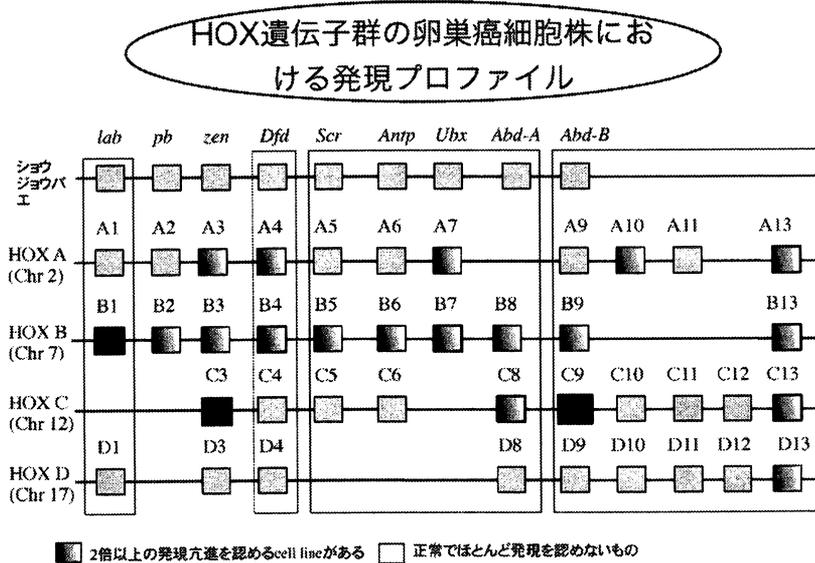


図 1.

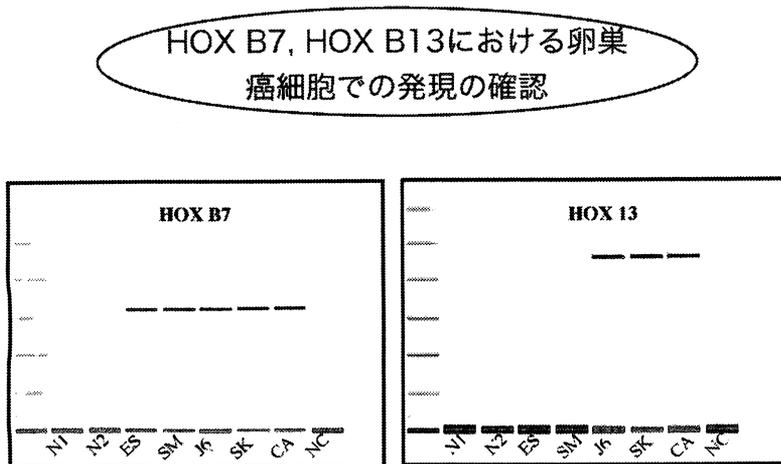


図 2.

HOX遺伝子群の子宮体癌細胞株における発現プロファイル

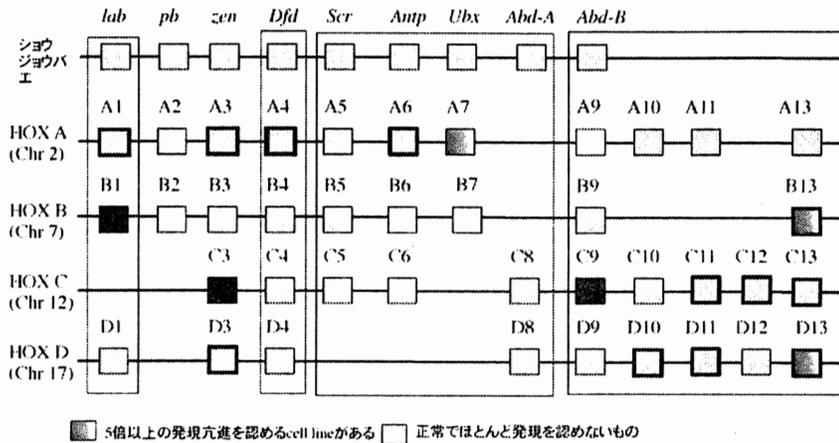


図3.

に5倍以上の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 (図3)。またこれらのプロファイ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

このような HOX 遺伝子の過剰発現が、癌化に伴う結果なのか、あるいは浸潤転移機構に直接影響を与えているものなのかを検討するため、子宮体癌と卵巣癌に共通して過剰発現が認められた 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 法にて確認した細胞を 3 系統作成した (図4)。またベクターのみを導入した mock も同時に作成し対照として使用した。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パー上に乗せ、ファイブロンectin をケモアトランクトとして添加後、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間各細胞系列を培養し、非導入細胞および mock 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 2 時間培養以降も培養を続けると明らかに浸潤能の低下を示し、16 時間で非導入細胞の約 50% 減となったがその後も浸潤機能自体は消失しなかった (図5, 6)。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巣癌株の双方で、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

エレクトロポレーションによる遺伝子導入と
RT-PCRによる導入細胞の確認

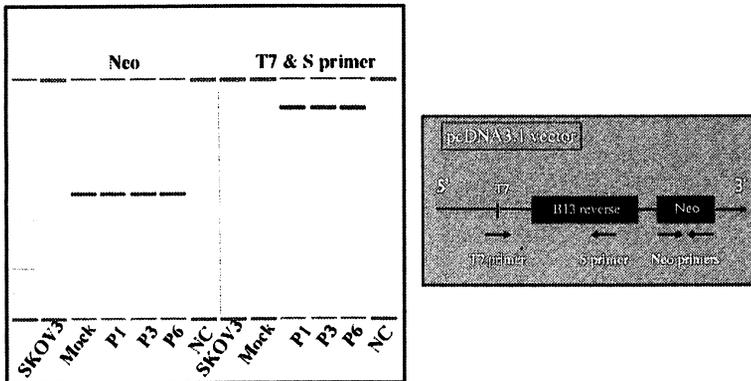


図 4.

% invasion(%In) と Invasion Index(I.I.)

$$\% \text{ in} = \frac{\text{Mean\# of cells invading through MG insert membrane}}{\text{Mean\# of cells invading through control insert membrane}} \times 100$$

$$\text{I.I.} = \frac{\% \text{ invasion of PV or P1 or P3 or P6}}{\% \text{ invasion of SKOV3}}$$

Time of culture	2hr	4hr	8hr	16hr
Cell type	%In : I.I	%In : I.I	%In : I.I	%In : I.I
SKOV3	24.5 : 1	147.9 : 1	299.8 : 1	358.8 : 1
PV	27.3 : 0.87	111.1 : 0.84	227.9 : 0.98	300.27 : 0.9
P1	14.0 : 0.66	27.3 : 0.37	71.8 : 0.37	135.7 : 0.44
P3	18.2 : 0.89	66.1 : 0.53	95.3 : 0.51	133.5 : 0.48
P6	18.2 : 0.89	53.3 : 0.48	95.2 : 0.47	140.5 : 0.44

SKOV3に比し、antisense HOXB13 introduced cellでは最終的に元の50%程度のindexを示した。

図 5.

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. 初期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

HOXB13遺伝子の導入による子宮体癌細胞浸潤能への影響

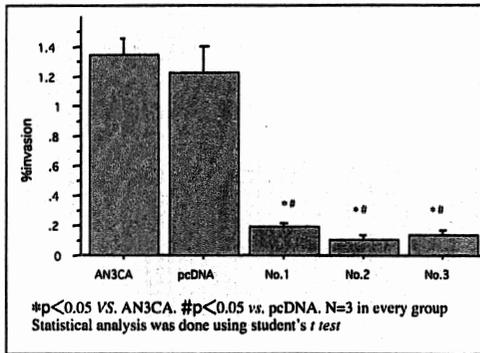


図 6.

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期であれば理論上癌の子宮外直接浸潤はないので、基靭帯を広汎に切除する理由の大きな要因は基靭帯血管群を摘出することのみならず基靭帯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、初期子宮頸癌のような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、当科では初期子宮頸癌における内視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。

当科では現在、MRI 上子宮外進展のないことが明らかであるもの、すなわち術後追加療法の可能性のない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。これはこのような患者に最もこの術式のメリットがありかつ、安全性が確保されると考えているからである(5-7)。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、現時点では当科で経験した14症例の追跡調査でも再発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よりベネフィットの高いもの

にする努力をしている。

術式としてはセンチネルナビゲーション法と同時に進んでおり、その方法を簡単に述べる。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(6)。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られる。さら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、術前日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(色素法)、両法の併用によりSentinel nodeを同定する。通常はこれらの同定を内視鏡を使用して行っており、陽性リンパ節をセンチネル節として摘出したあと、骨盤リンパ節の全郭清を内視鏡下に行っている。そのうち広汎子宮全摘に移行する。現在までにセンチネル節の同定では26例に施行し検出率88.5%であり、そのうち最近1b1期の1症例でセンチネルリンパ節のみ陽性例を経験した。転移陽性全例でセンチネル節陰性で他のリンパ節陽性例は存在しなかった。これらの結果からは子宮頸癌においても外陰癌同様センチネルコンセプトが成立する可能性が高く、引き続き検討する価値があると考えられた。内視鏡下広汎子宮全摘術においては14例中現在のところ再発症例は認めていない。また平均出血量は開腹手術に比較し、1/4以下となり輸血が必要となった症例は1例も存在しない。手術時間が1時間ほど延長するが、術後の離床や、歩行、食事開始などの術後回復も早く導入のメリットは明らかと考えられる。ただし、技術的に難易度が高いので十分な安全性を確保できた後に施行すべきであり、また追加治療の頻度の点から技術的には可能であっても適応進行期としては1b1期までに限定するのが現在の時点では妥当ではないかと考えられた。そうすることで腹腔鏡に求められている治療上のエンドポイントが明確になりベネフィットが十分理解され、癌治療に対す

る個別化としての治療法の提示,あるいは選択につながると思われる。

Reference

1. Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet.* 1986; 20: 147-73.
2. Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R. The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell.* 1989 May 5; 57(3): 367-78.
3. Hay. E.D. An over view of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Acta Ant,* 154, 8-20, 1995.
4. Cillo. C., Cantile M, Faiella A et al. Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cellular physiol.* 188, 161-169, 2001
5. Spirtos NM, Schlaerth JB, Kimball RE et al. Laparoscopic radical hysterectomy (type III) with aortic and pelvic lymphadenectomy. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 Jun; 174(6): 1763-7.
6. Kim DH, Moon JS. Laparoscopic radical hysterectomy with pelvic lymphadenectomy for early, invasive cervical carcinoma. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1998 Nov; 5(4): 411-7.
7. Spirtos NM, Eisenkop SM, Schlaerth JB et al. Laparoscopic radical hysterectomy (type III) with aortic and pelvic lymphadenectomy in patients with stage I cervical cancer: surgical morbidity and intermediate follow-up. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Aug; 187(2): 340-8.
8. GOULD EA, WINSHIP T, PHILBIN PH, KERR HH. Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. *Cancer.* 1960 Jan-Feb; 13: 77-8.