

子宮頸癌における c-myc の発現とその予後因子としての 有用性に関する検討

新潟大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 田中憲一教授)

呉 洪 軍

The Expression of c-myc Protein in Uterine Cervical Cancer : A Possible Prognostic Indicator

Hong Jun Wu

Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University School of Medicine, Niigata
(Director : Prof. Kenichi Tanaka)

概要 新潟大学医学部産科婦人科学教室において取扱った子宮頸癌 I~IV 期48例を対象に, その生検標本あるいは手術摘出標本を用いて免疫染色法により c-myc 遺伝子産物の発現を調べ, 予後因子との関連について検討した。その結果 I 期 9 例中 4 例 (44%), II 期 32 例中 9 例 (28%), III 期 5 例中 3 例 (60%), IV 期 2 例中 1 例 (50%), 症例全体では 48 例中 17 例 (35%) に c-myc の過剰発現がみられた。c-myc 過剰発現と予後との関連を解析したところ, c-myc 過剰発現を認めた 17 例における 5 年生存率は 51% であり, 過剰発現を認めない 31 例における 5 年生存率 86% に比べて有意に低かった。また, 対象症例 48 例中治療により臨床的および組織学的に癌を認めなくなった症例は 45 例あり, そのうち 10 例 (22%) に再発を認めたが, これを c-myc 過剰発現の有無により比較すると, c-myc 過剰発現 (+) 群では 15 例中 7 例 (47%) に再発を認め, c-myc 過剰発現 (-) 群の 30 例中 3 例 (10%) の再発に比べ有意に頻度が高かった。これらの結果より子宮頸癌において c-myc 過剰発現がみられた症例に予後不良例が多く, 予後推測因子としての c-myc 遺伝子産物の発現解析の有用性が示唆された。

Synopsis Forty-eight cases of human uterine cervical cancer were examined for the expression of c-myc protein by immunohistochemical staining. The overexpression of c-myc was detected in 17 of 48 cases (35%), which is consistent with previous reports. The frequency of c-myc overexpression was not associated with the clinical stage. Relapse was observed in 7 of 15 cases (47%) which had overexpression of c-myc (mean follow-up period : 35 months), whereas relapse was observed in only 3 of 30 cases (10%) which did not overexpress c-myc (mean follow-up period : 33 months). The five-year survival rate was significantly lower in the cases overexpressing c-myc than in those not overexpressing it. This indicates that the overexpression of c-myc may be associated with a high risk of relapse and poor prognosis. We also analysed the correlation between lymph node metastasis, cervical stromal invasion and c-myc overexpression, and did not find any correlation between them. These results suggest that the overexpression of c-myc in cervical cancer may be a prognostic indicator for predictive testing.

Key words : Cervical cancer • c-myc • Relapse • Immunohistochemistry • Prognosis

緒 言

近年の発癌のメカニズムに関する分子生物学的研究により, 癌は遺伝子の変化によって起こるものであることが明らかにされた。さらに癌化の過程において, 癌遺伝子, 癌抑制遺伝子など, 細胞の増殖, 分化に関わる遺伝子の異常が多段階に積

み重なっていく姿が解明されつつあり, これを利用した癌の遺伝子診断が臨床に用いられ始めようとしている。

子宮頸癌においては, これまで ras, p53, RB, c-myc, EGFR, c-erbB-2 といった遺伝子の関与が報告されている¹⁾。特に HPV 16, 18 型感染例にお

いては、その遺伝子産物である E6, E7がそれぞれ癌抑制遺伝子産物 p53, RB タンパクに結合し分解することによってそれらを不活化することが知られている^{2)~4)}。また、c-myc が過剰発現している子宮頸癌組織より抽出した DNA において 8 番染色体上の c-myc 座の近傍に HPV DNA が integrate されているとの報告もあり⁵⁾⁶⁾ HPV 感染例では HPV の組込みによる c-myc の転写の活性化も示唆されている。

子宮頸癌患者における HPV 陽性率は、80%あるいは90%ともいわれており、これら p53, RB, c-myc は子宮頸癌のかなりの症例に関与していると推測されるが、それらの遺伝子異常と予後との関連についての報告は少ない。本研究では、c-myc に関してその過剰発現と予後因子との関連について検討し、有用な prognostic indicator となりうるかどうかを考察した。

研究対象および方法

当科において1989~1994年の間に診断および治療がなされ、その後当科腫瘍予後外来で管理された子宮頸癌 I~IV 期症例48例を対象とした。発症年齢は29~84歳で平均58.5歳であった。臨床進行期は、I 期9例、II 期32例、III 期5例、IV 期2例。組織型は、扁平上皮癌44例(92%)、腺癌4例(8%)で腺癌はI 期1例、II 期3例であった。

臨床進行期の決定および治療は、日本産科婦人科学会子宮頸癌取り扱い規約⁷⁾に準じて行われた。I, II 期は原則として手術療法が行われ、術後病理組織学的評価にて追加治療が必要な症例には、放射線療法、化学療法がなされた。高年齢あるいは、合併症で手術が行われなかった症例は、I, II 期41例中4例ありこれらは、放射線単独治療がなされた。III, IV 期症例においては、放射線単独あるいは化学療法との併用がなされた。

対象各症例について H & E 染色標本にて病理組織学的に腫瘍細胞が十分含まれた生検あるいは手術摘出標本を選び、それらのパラフィンブロックより5 μ m の厚さの切片を切り出し、抗 c-myc 抗体を用いて免疫染色を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィン、加水処理、0.1%トリプシン/PBS (Phosphate-Buffered

Saline) にて37°Cで30分間処理、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するため 1% H₂O₂/PBS を添加し室温にて15分間処理、さらに正常ウマ血清を用いて blocking 反応を行った後、一次抗体を加え 4°Cで12時間インキュベーションした。その後 ABC 法にて二次抗体、アビジンビオチン複合体と反応させ、DAB (Diamino-benzidine substrate) + H₂O₂ 発色液を用いて着色した。一次抗体は、抗 c-myc マウスモノクローナル抗体 (Oncogene science 社 c-myc, ab-1) を2 μ g/ml の濃度で用い、ABC 法は、Vector 社、Vectastain ABC キットを使用した。また一次抗体のコントロールとして正常マウス IgG (DAKO 社) を用いた。

c-myc 発現の強さは以下のごとく判定した。正常子宮頸部上皮組織15例および対象症例の腫瘍組織48例についてそれぞれの標本を40倍の視野で無作為に 5 視野観察し、その中で核の染色されている細胞の個数の割合を%で表わした。50%以上を(++)、10~50%を(++), 5~10%を(+), 1~5%を(±)とした。コントロールとした正常子宮頸部上皮組織15例中3例において1~2%の細胞に低レベルの核染色が認められたが、他の12例では染色は認められなかった。このことから正常の c-myc 発現レベルは、この免疫染色の系では検出されないと判断され、対象症例の腫瘍組織において、核が染色された細胞の割合が5%以上のもの、すなわち(+)以上を c-myc 過剰発現と判定した。

予後の評価は、Kaplan-Meier の累積生存曲線で示し、その検定は、Cox-Mantel test にて行った。

結 果

表3における症例3, 4の免疫染色の結果を写真1~3に示した。写真1, 2は症例4の腫瘍部分を抗 c-myc 抗体(写真1)およびコントロール正常マウス IgG (写真2)を用いて染色した標本で、写真1では約60%の細胞に核染色がみられ、写真2の陰性コントロールでは染色されなかった。写真3は症例3の免疫染色標本で、約55%の細胞に c-myc の発現を認めた。c-myc 過剰発現がみられた症例は48例中17例(35%)で、(+++) 4例、(++) 7例、(+) 6例であった。過剰発現がみら

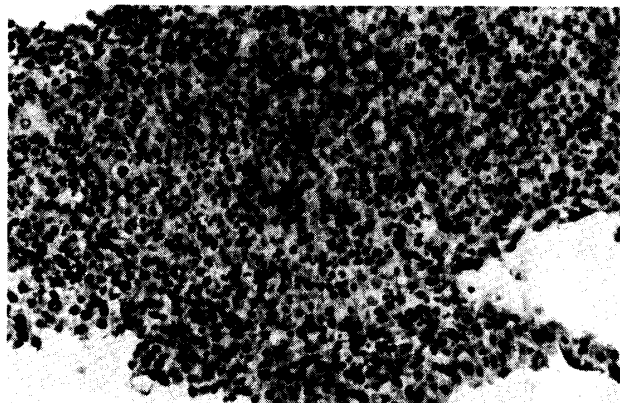


写真1 抗 c-myc 抗体を用いた免疫染色 (×60)
症例4. 子宮頸癌 IVb 期, 扁平上皮癌

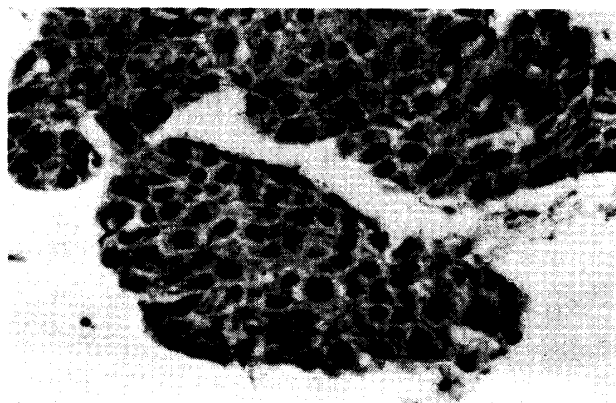


写真3 抗 c-myc 抗体を用いた免疫染色 (×100)
症例3. 子宮頸癌 IIIb 期, 扁平上皮癌

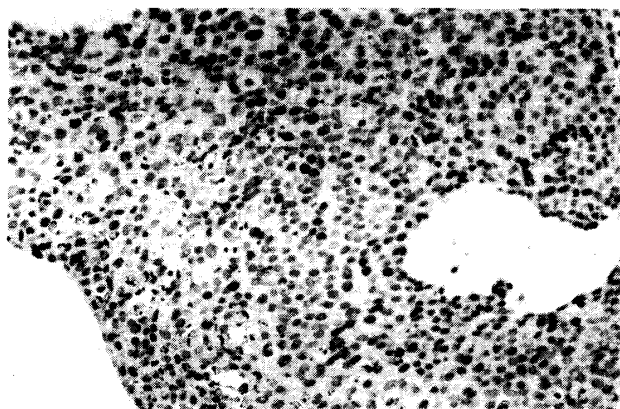


写真2 正常マウス IgG を用いた陰性コントロール (×60)
症例4. 子宮頸癌 IVb 期, 扁平上皮癌

表1 臨床進行期と c-myc 過剰発現

臨床進行期	I	II	III	IV	I~IV
c-myc 過剰発現	4/9 (44%)	9/32 (28%)	3/5 (60%)	1/2 (50%)	17/48 (35%)
(++)	1	1	1	1	1
(+)	0	5	2	0	7
(+)	3	3	0	0	6

れた17例の平均発症年齢は60.2±15.3歳。過剰発現のみられなかった31例の平均発症年齢は57.5±11.9歳で両群間に有意差はみられなかった。臨床進行期別では、I期9例中4例(44%)、II期32例中9例(28%)、III期5例中3例(60%)、IV期2例中1例(50%)に c-myc 過剰発現がみられ、臨床進行期と過剰発現率との間には相関は認められなかった(表1)。

対象48例中、根治的手術施行例あるいは放射線治療後の組織生検にて癌の残存を認めなくなった症例は45例あり、このうち10例が再発を来した。これら10例はいずれも肺、Virchow 等の遠隔再発で、このうち1例は局所再発を伴っていた。c-myc 過剰発現と再発との関連をみると、c-myc 過剰発現のみられた症例は45例中15例(平均観察期間

35.4カ月)でこのうち再発は7例(47%)であった。過剰発現の認められなかった30例(平均観察期間33.3カ月)における再発は3例(10%)であり、c-myc 過剰発現群で再発率が有意に高い結果を得た。これはいずれの進行期においても一貫した結果であった(表2)。c-myc 過剰発現群の再発例7例はすべて、肺、肝、Virchow 等への遠隔再発で、局所再発を伴った症例が1例あった。その予後は、7例中5例が原病死、1例が他病死、1例が生存中である(表3)。また45例の解析例で、c-myc 過剰発現の有無と治療後再発が認められるまでの無病生存期間を Kaplan-Meier 累積生存曲線を用いて比較すると、治療後5年無病生存率は c-myc 過剰発現(+)群で59.3%、過剰発現(-)群で86.1%と両群間に有意差を認めた(図1)。対象48例中、治療にて癌の消失を認めなかった3例については、いずれも残存癌の再燃を来して原病死しているが、このうち2例に c-myc 過剰発現を認めた。

対象48例全例について c-myc の過剰発現の有無と生存率との関係をみると、c-myc 過剰発現例

表2 c-myc 過剰発現と再発

臨床進行期	c-myc 過剰発現	症例数	年 齢	観察期間	再発症例数(率)
I	+	4	55.8±18.6	25.0± 8.2	1(25%)
	-	5	51.6± 7.2	32.4± 4.6	0(0%)
II	+	9	56.1±13.8	41.2±10.4	4(44%)
	-	23	57.2±12.0	34.0±18.0	3(13%)
III, IV	+	2	72.0± 4.0	30.0± 7.0	2(100%)
	-	2	71.5± 7.5	27.0± 9.0	0(0%)
I~IV	+	15	58.1±17.8	35.4±12.4	7(47%)
	-	30	57.2±11.7	33.3±15.6	3(10%)

* p<0.05

表3 c-myc 過剰発現症例

症例	発症年齢	臨床進行期	組織型	c-myc 発現	再発(部位)	予後(死因)	観察期間(月)
1	79	Ib	SCC	++	-	死亡(白血病)	22
2	78	IIb	SCC	++	+(脳, 胃, 肺)	死亡(老衰)	40
3	76	IIIb	SCC	++	+(肝, 大動脈リンパ節)	死亡(原病死)	23
4	68	IVb	SCC	++	残存癌再燃	死亡(原病死)	10
5	58	IIb	adeno ca.	++	-	生存	41
6	49	IIb	SCC	++	+(肺)	生存	62
7	72	IIb	SCC	++	-	生存	48
8	65	IIb	SCC	++	-	生存	49
9	49	IIb	SCC	++	+(Virchow)	死亡(原病死)	30
10	68	IIIb	SCC	++	+(肺, 皮膚)	死亡(原病死)	37
11	84	IIIb	SCC	++	残存癌再燃	死亡(原病死)	16
12	40	Ia	SCC	+	-	生存	31
13	35	Ia	SCC	+	-	生存	34
14	69	Ib	SCC	+	+(骨)	死亡(原病死)	13
15	38	IIb	SCC	+	-	生存	40
16	72	IIb	SCC	+	-	生存	37
17	73	IIb	adeno ca.	+	+(Virchow, 局所)	死亡(原病死)	24

SCC: Squamous cell carcinoma, adeno ca.: adenocarcinoma

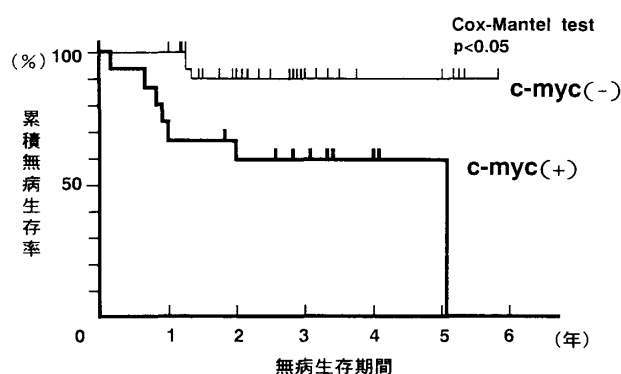


図1 c-myc 過剰発現と治療後無病生存率

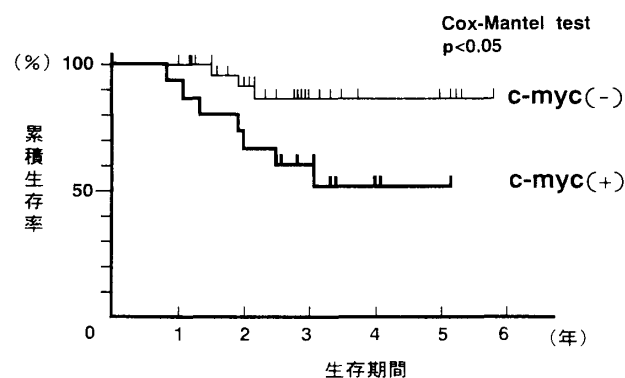


図2 c-myc 過剰発現と生存率

17例の5年生存率は51%でc-mycの過剰発現を認めない症例31例の5年生存率86%に比べて有意

に低く、予後不良を示す結果であった(図2).
現在の子宮頸癌の臨床進行期は術前に決定され

表4 I, II期手術施行例における c-myc 過剰発現とリンパ節転移の有無

臨床進行期	c-myc 過剰発現	症例数	リンパ節転移(+)	
			症例数	(率)
I	+	3	1	(33%)
	-	5	2	(40%)
II	+	7	2	(29%)
	-	22	7	(32%)
計	+	10	3	(30%)
	-	27	9	(33%)

表5 I, II期手術施行例における c-myc 過剰発現と筋層浸潤度

c-myc 過剰発現	筋層浸潤	I 期	II 期	計
+	α	2	0	2
	β	0	0	0
	γ	0	3	3
	δ	1	4	5
-	α	2	0	2
	β	2	0	2
	γ	1	7	8
	δ	0	15	15

 α : 癌が子宮筋層内膜側1/3にとどまるもの β : 癌が子宮筋層中央1/3まで及ぶもの γ : 癌が子宮漿膜側1/3まで及ぶもの δ : 癌が子宮壁を超えて子宮傍結合織に及ぶもの

るもので、必ずしも術後の所見を反映していない可能性がある。今回解析した48例のうち手術施行例37例について、手術前後で進行期が食い違った症例が1例あり、この症例は術前I期の診断で手術が施行されたが、術後診断はII期に相当するものであった。そこで術後の組織学的検索による癌の進行度として、リンパ節転移の有無および子宮筋層内浸潤度と c-myc 過剰発現の有無について検討した。I, II期で手術が施行され、リンパ節転移の有無が検索された症例は37例あった。これらの症例において c-myc の過剰発現とリンパ節転移の有無について検討してみると、c-myc の過剰発現が認められた10例中リンパ節転移のあった症例は3例(30%)、過剰発現のみられなかった27例中でもリンパ節転移は9例(33%)にみられ両者の間に有意差は認められなかった(表4)。また手術施行症例において組織学的な癌の子宮筋層内浸

潤度と c-myc 過剰発現の間にも相関は認められなかった(表5)。

考 察

c-myc タンパクは細胞増殖を調節する癌原遺伝子の一つとして細胞核内で作用しており、そこで、増殖に必要な細胞遺伝子の発現の調節に転写レベルに関わっていると考えられている。c-myc 遺伝子は、細胞の悪性化の過程で遺伝子増幅によって活性化され、その結果 m-RNA およびタンパクレベルでの過剰発現が観察される。ヒトの悪性腫瘍では、肺小細胞癌において過剰発現が高頻度にみられ⁸⁾、また、バーキットリンパ腫では染色体相互転座により活性化されることが知られている⁹⁾¹⁰⁾。c-myc の過剰発現は子宮頸癌においても、癌化に関与する遺伝子異常のうちの一つと考えられている。これまでの報告では、子宮頸部浸潤癌における c-myc の mRNA あるいはタンパクの過剰発現の頻度は6~100%と報告によりばらつきはあるがおおよそ30~60%とされている。今回の我々の免疫染色の結果でも c-myc タンパクの過剰発現は35%にみられ、これまでの報告と矛盾せず、癌化への関与を示唆している。

細胞の悪性化にはさまざまな癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常の蓄積が必要であること(癌化の多段階説)が知られている¹¹⁾。近年、こういった遺伝子の異常をみつけ出すことにより癌の早期発見、進行度の診断、予後の推測等に役立てようとする遺伝子診断が行われ始めており、近い将来、臨床応用されるものと思われる。子宮頸癌において、これまで c-myc 過剰発現は臨床進行期の進んだ症例ほど高頻度にみられるといった報告や¹²⁾、c-myc 過剰発現例の生存率が正常発現例に比べ有意に低いといった報告があることから^{13)~15)}、c-myc の遺伝子診断が子宮頸癌の進行度の診断あるいは予後の推測因子として役立つ可能性が示唆されてきた。今回の私どもの成績からは c-myc 過剰発現と癌の進行度との間には相関は認められなかったが、c-myc 過剰発現例では過剰発現のみられない例に比べ再発率が有意に高いこと、また5年生存率が有意に低いことから、予後推測因子となりうることを示唆された。乳癌において、臨床

的に c-erbB-2 の遺伝子増幅と予後不良との間に相関が認められることはよく知られている¹⁶⁾。実験的にも受容体型セリン・スレオニンキナーゼレセプターである c-erbB-2 には転移能誘導活性があることが示されており¹⁷⁾¹⁸⁾、c-erbB-2 が転移関連遺伝子として作用していることが強く示唆されている。

核内タンパクである c-myc に関しては、臨床的には肺小細胞癌や神経芽細胞腫の浸潤に相関していることが示されているが⁸⁾¹⁹⁾、実験的には転移能の発現は証明されておらず、他の癌遺伝子産物との相互作用が推察されている。今回の結果からも、c-myc 過剰発現と再発との相関が認められ、しかも c-myc 過剰発現群の再発例 7 例中全例が遠隔再発であったものの、c-myc 過剰発現とリンパ節転移との関連は認められず、子宮頸癌における c-myc の転移関連遺伝子としての作用にはまだ不明な点も多い。子宮頸癌における prognostic indicator としての c-myc 発現解析の臨床応用には、今後の基礎研究の進展および臨床データの積重ねが必要であると思われた。

文 献

1. 八重樫伸生, 矢嶋 聡. カレントレビュー 4. 腫瘍. b. 発ガン 子宮頸癌. 日産婦誌 1993; 45: 925—935
2. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76—79
3. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129—1136
4. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934—937
5. Couturier J, Sastre-Garau X, Schneider-Maunoury S, Labib A, Orth G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol* 1991; 65: 4534—4538
6. Hori T, Ichimura H, Minamihisamatsu M, Takahashi E, Yamauchi M, Hama Y, Kurimura O, Yamasaki M, Kurimura T. Chromosomal insertion and amplification of human papillomavirus 16 DNA sequences in a cell line of argyrophil small cell carcinoma of the uterine cervix. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 371—375
7. 日本産科婦人科学会・日本病理学会・日本医学放射線学会編. 子宮頸癌取り扱い規約 東京: 金原出版, 1987
8. Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 1983; 306: 194—196
9. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7824—7827
10. Neel BG, Jhanwar SC, Chaganti RS, Hayward WS. Two human c-oncogenes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7842—7846
11. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759—767
12. 谷本博利, 永井宣隆, 藤本英夫, 太田さなえ, 大浜紘三. 子宮頸癌における c-myc 遺伝子 mRNA 過剰発現に関する分子生物学的検討. 日産婦誌 1992; 44: 566—570
13. Iwasaka T, Yokoyama M, Oh-uchida M, Matsuo N, Hara K, Fukuyama K, Hachisuga T, Fukuda K, Sugumori H. Detection of human papillomavirus genome and analysis of expression of c-myc and Ha-ras oncogenes in invasive cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1992; 46: 298—303
14. Pinion SB, Kennedy JH, Miller RW, Maclean AB. Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 1991; 337: 819—820
15. Riou G, Le MG, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Orth G. Human papillomavirus negative status and c-myc gene overexpression: Independent prognostic indicators of distant metastasis for early stage invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1525—1526
16. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177—182
17. Yusa K, Sugimoto Y, Yamori T, Yamamoto T, Toyoshima K, Tsuruo T. Low metastatic

- potential of clone from murine colon adenocarcinoma 26 increased by transfection of activated c-erbB-2 gene. *J Natl Cancer Inst* 1990 ; 82 : 1633—1636
18. *Yu D, Hamada J, Zhang H, Nicolson GL, Hung MC.* Mechanisms of c-erbB-2/neu oncogene-induced metastasis and repression of metastatic properties by adenovirus 5 E1A gene products. *Oncogene* 1992 ; 7 : 2263—2270
19. *Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM.* Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984 ; 224 : 1121—1124
- (No. 7760 平 8 ・ 4 ・ 19受付)
-