

## シンポジウム1 子宮頸癌の発生と進展—その制御を目指して—

## 子宮頸癌の発生に関与する癌関連遺伝子の同定とその臨床応用

大阪大学助手 榎 本 隆 之

## 目 的

子宮頸癌の発生に悪性型 HPV が関与していることは、明らかになっている、しかし、CIN I の 50 % の症例は病変が消失していくこと、悪性型 HPV が高頻度に検出される CIN3 でも進行癌となる症例は 30~50% に過ぎないことより、従来の形態学的な観察あるいは HPV のタイピングだけでは悪性化していく上皮内病変を同定できないと考えられる。これまで、子宮頸癌に第 3 番染色体短腕 (3p14~22) のヘテロ接合性の消失、第 3 染色体長腕 (3q27) の増幅が高頻度に検出されることより、同部位に子宮頸癌の発生に関与する重要な遺伝子が存在すると考えられているが、子宮頸癌の発生・進展に伴う癌関連遺伝子の異常についてはほとんど明らかになっていない。そこで、①子宮頸部上皮内病変の予後を決定する分子生物学的マーカーを開発し上皮内病変の診断・治療に応用すること、②子宮頸部扁平上皮癌の発生・進展に関与する癌関連遺伝子を同定することを目的とした。また、子宮頸部悪性腺腫は子宮頸部腺癌の一亜型に分類され、他の腺癌組織型に比し予後不良とされているが、悪性腺腫が高分化型腺癌の単なる一亜型なのか、両者は全く異なった病態であるかについてはいまだ明らかではない。悪性腺腫の約 10 % が Peutz-Jeghers syndrome (PJS) の家系に発生することが報告されており、PJS と悪性腺腫の関連性が示唆される。PJS の原因遺伝子として同定された *LKB1* 遺伝子は第 19 染色体短腕 (19p13.3) に存在し悪性腺腫でヘテロ接合性の消失が高頻度にみられる部位と一致する。そこで、③悪性腺腫および高分化型腺癌における *LKB1* 遺伝子の異常を同定し、分子マーカーによる両病変の鑑別診断法を確立することを目的とした。

## 方 法

①子宮頸部上皮内病変の予後を決定する分子生

物学的マーカーの開発：子宮頸部上皮内病変が腫瘍としての性格のひとつであるモノクローナルな (単一細胞由来の) 増殖をしているかどうかを検定するために、X 染色体の不活化のパターンを利用したクロナリティー解析を行った。子宮頸部上皮内病変より病変部を LM200LCM system (Arcturus Engineering 社製) を用いて切り出し、DNA を抽出後、制限酵素 *HhaI* にて処理し、X 染色体上に存在する Androgen 受容体の、exon1 に存在する CAG のタンデムリピート領域を PCR 増幅し ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer 社製) にて解析した。また上皮内病変におけるテロメレース活性およびテロメレースのコンポーネントである hTERT、hTR の発現を検討した。また、異形成と診断後、治療をせずに経過観察していた症例について、経時的にクロナリティー解析を行い、クロナリティーと予後の相関を検証した。②-i 子宮頸部扁平上皮癌における癌関連遺伝子の異常の検索：さまざまなヒト腫瘍で異常が報告されている癌関連遺伝子の頸癌における異常について検討した。また、3p14 に位置する *FHIT* 癌抑制遺伝子、および 3q27 に存在する *TSC403* 癌遺伝子の子宮頸癌および前癌病変における異常を検討した。子宮頸癌の実験モデルとして水晶体特異的に扁平上皮癌を発生する SV40T 抗原発現トランスジェニックマウス ( $\alpha$ -T) を作成しているが、新たに *TSC403* 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス ( $\alpha$ -TSC403) を作成し  $\alpha$ -T と交配実験を行い *TSC403* 遺伝子の機能を検討した。②-ii 子宮頸部扁平上皮癌のトランスクリプトームの解析：子宮頸癌の発生に関与する遺伝子を同定するために、DNA チップ (GeneChip; Affymetrix 社製) を用いて頸癌の発現プロファイルを解析した。②-iii 子宮頸部扁平上皮癌のプロテオームの解析：子宮頸癌の発生に伴って、発現量の変化して

いる蛋白質を同定するために、子宮頸癌および子宮頸部正常扁平上皮より蛋白を抽出、さまざまなケミカルチップシステムにサンプルを添加後、プロテインチップシステム(Ciphergen社製)にて蛋白の発現プロファイルを解析した。③悪性腺腫の発生に関与する遺伝子異常の同定：形態学的所見およびHIK1083抗体の免疫染色の結果から悪性腺腫あるいは悪性腺腫の早期病変が疑われた症例より、異常腺管のみをLM200LCM systemを用いて回収し、*LKB1* 遺伝子の異常を同定した。

### 成 績

①-i 子宮頸部病変のクロナリティー解析：アンドロゲン受容体のメチル化のパターンを利用したクロナリティー解析の結果、正常扁平上皮はポリクローナルな組織であるのに対し、軽度異形成の50%、中等度異形成の75%がモノクローナルな(単一細胞由来)病変であることがわかった。また、モノクローナルな軽度・中等度異形成の多くは中等あるいは高リスクのHPVに感染していた。高度異形成、上皮内癌、浸潤癌はいずれもモノクローナルな病変であった。CIN3の診断の下、円錐切除後12分割した標本より病変部を切り出しクロナリティー解析を行った結果、連続して存在する病変のクロナリティーは同じであったが、2つ以上の病変が不連続に存在する際、互いのクロナリティーが異なる症例があった。また、子宮頸部異形成の診断の下経過観察した症例のクロナリティー解析では、ポリクローナルな異形成は経過とともに病変が比較的早期に消滅する症例が多かったのに対し、モノクローナルな異形成は病変が持続・進行する症例が有意に多かった。①-ii テロメラーゼ活性をTRAP法で検出したところ、子宮頸部正常扁平上皮ではほとんどテロメラーゼ活性を認めなかったが、軽度異形成の約60%、中等度異形成以上の病変ではほぼ100%の症例にテロメラーゼ活性を認めた。なお、軽度異形成では

テロメラーゼ活性を示す病変の多くはモノクローナルな病変であった。②子宮体癌や卵巣癌で異常が高頻度に検出される*p53*や*K-ras*の点突然変異は子宮頸癌では*p53*が6%、*K-ras*が4%と稀であった。また、*p16*の不活化は点突然変異が10%、欠失が10%、プロモーター領域のメチル化が3%、mRNAの発現の消失が26%であった。*FHIT*の正常サイズのmRNAの発現の消失は浸潤癌の29%に認められたがCINでは全く認めず、*FHIT*の不活化は発癌過程のlate eventとして起こっていると考えられた。*TSC403*癌遺伝子の過剰発現は子宮頸部扁平上皮癌の約50%にみられたが頸部腺癌や体癌、卵巣癌では約10%と稀で、頸部扁平上皮癌の発生に特異的に関与していた。② GeneChipを用いた頸部扁平上皮癌と頸部正常扁平上皮との比較検索により、両軍の間で発現に明らかに差があった遺伝子がスクリーニングした約3万の遺伝子中約50遺伝子選出された。また、プロテインチップシステムを用いて扁平上皮癌に特異的に発現している蛋白を検出した。③ *LKB1* 遺伝子の点突然変異を典型的な悪性腺腫の約67%に認めたがその他の頸部腺癌では稀であり、*LKB1*が悪性腺腫の診断の分子マーカーになることが示された。

### 結 論

子宮頸部扁平上皮癌の発生に際しては、悪性型HPVの感染によって、感染した細胞のテロメラーゼが活性化されるとともに、モノクローナルな増殖をはじめ、このモノクローナルな増殖は子宮頸部に多中心性に起こりうるが、生物学的悪性度の高い病変が次第に子宮頸部を占拠し、子宮頸癌が発生する。生物学的悪性度を決める遺伝子はいまだあまり明らかではないが*FHIT*や*TSC403*、*p16*が関与している可能性が高い。また、頸部腺癌のなかの特殊な組織型である悪性腺腫の発生に*LKB1*の異常が関与している。