

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

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学

榎 本 隆 之

Molecular Analysis of Cervical Carcinoma

Takayuki ENOMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Osaka University, Osaka

Key words : Clonality analysis · p16INK4 · FHIT · STK11 · TSC403

緒 言

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、CIN1 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 番染色体長腕 (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、HPV 感染による宿主細胞の変化をみる指標として子宮頸部前癌病変のクロナリティー解析を行った。また、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解析を行った。癌関連遺伝子としては、癌抑制遺伝子としてさまざまなヒト癌において異常が報告されている *p53* 癌抑制遺伝子及び *p16* 癌抑制遺伝子、子宮頸癌に高頻度にヘテロ接合性の消失がみられることが報告されている第 3 番染色体短腕 (3p14-22) から単離された *FHIT* 癌抑制遺伝子、また、悪性腺腫の原因候補遺伝子として

STK11 (LKB1) 遺伝子について検索した。癌遺伝子としてはやはり多くのヒト癌において点突然変異による活性化が報告されている *ras*、また子宮頸癌で増幅がみられる第 3 染色体長腕から単離された *TSC403* 癌遺伝子について検索した。

研究方法と成績

1. 子宮頸部病変のクロナリティー解析

女性の体細胞には父親由来及び母親由来の 2 本の X 染色体があるが、X 染色体のいずれか一方は胎生期にランダムに不活化し、不活化した X 染色体上の遺伝子は発現されなくなる。不活化した側の X 染色体は細胞分裂を経ても不活化を保持している。正常組織あるいは非腫瘍組織では父親由来の X 染色体が不活化した細胞と母親由来の X 染色体が不活化した細胞が混在している。これをポリクローナルという。これに対して癌あるいは腫瘍がひとつの体細胞由来、すなわちモノクローナルな病変であれば、個体中の癌細胞はすべて父親由来または母親由来の同一の X 染色体が不活化されていることになる。ところで、X 染色体の不活化には DNA のメチル化が関与していることが知られている。筆者らは X 染色体上に存在するアンドロゲン受容体遺伝子のメチル化のパターンを利用したクロナリティー解析法を開発し、この手法を用いて正常子宮頸部扁平上皮や正常子宮内膜はポリクローナルな組織であるのに対し、子宮頸

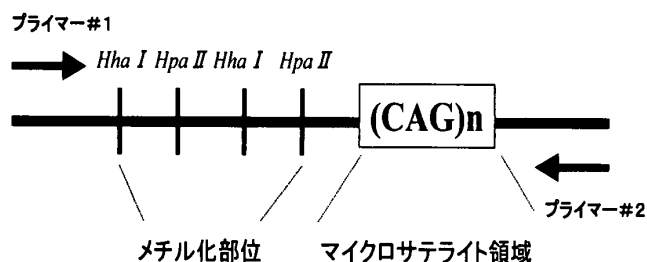


図1 (A) アンドロゲン受容体 exon1 の構造
X 染色体に存在するアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の exon 1 には 90% のヘテロ接合性を示す CAG の繰返し配列 (マイクロサテライト領域), 及びその上流にメチル化を受けやすい CpG 領域があり, この領域には制限酵素 *Hha* I, *Hpa* II 認識部位が存在している. PCR のプライマーをこの両領域を増幅するように設定する.

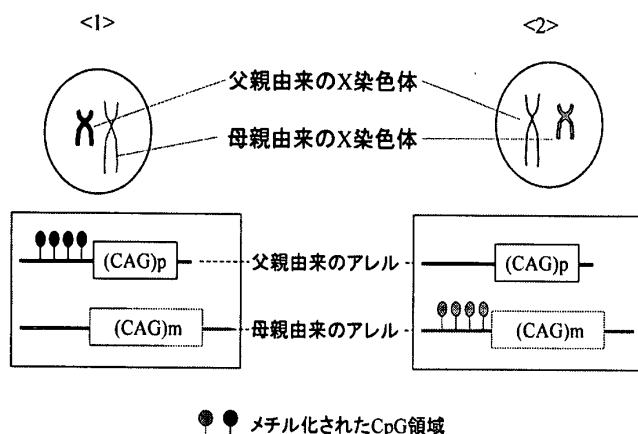


図1 (B) X 染色体の不活化とメチル化
X 染色体の不活化は, X 染色体上の遺伝子がメチル化されることによって起こる. <1> の細胞では父親由来の X 染色体が, <2> の細胞では母親由来の X 染色体が不活化されているが, <1> の細胞では父親由来の AR 遺伝子のアレルの CpG 領域が, <2> の細胞では母親由来の AR 遺伝子のアレルの CpG 領域がメチル化されていることを示している. 父親由来と母親由来のアレルは CAG の繰返し配列の長さが異なっている.

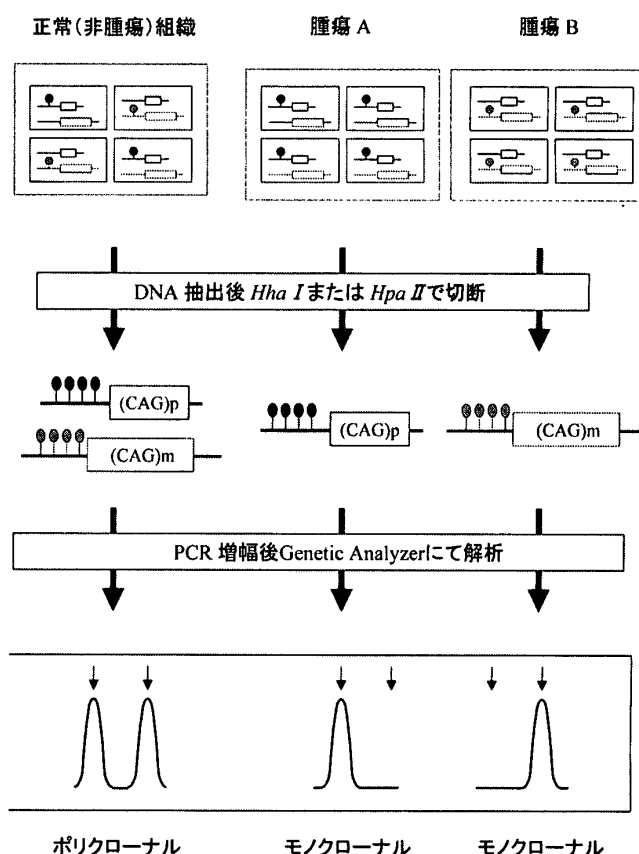


図1 (C) アンドロゲン受容体を利用したクロナリティー解析

正常組織あるいは非腫瘍組織は母親由来のアレルがメチル化されている細胞と父親由来のアレルがメチル化されている細胞が混在している (ポリクローナル). しかし, 腫瘍はもともと 1 個の細胞に由来している (モノクローナル) ので, 組織中のすべての細胞では同側のアレルがメチル化によって不活化されている. 腫瘍 A では父親由来のアレルが, 腫瘍 B では母親由来のアレルがすべての細胞においてメチル化によって不活化されていることを示す. 組織より DNA を抽出後, 制限酵素 *Hha* I または *Hpa* II で処理すると, 不活化 (メチル化) されていないアレルは制限酵素で切断されるが, 不活化 (メチル化) されている側のアレルは制限酵素では切断を受けない. したがって, 制限酵素で処理した鋳型 DNA を PCR 増幅すると, 不活化されている側のアレル由来の PCR 産物のみができる. PCR 産物を電気泳動すると, 正常組織あるいは非腫瘍組織では, 母親由来のアレルがメチル化されている細胞と父親由来のアレルがメチル化されている細胞が混在しているために, 両親由来の 2 本のバンドが検出される. しかし癌のようなモノクローナルな細胞集合では父親由来あるいは母親由来のアレルのみが増幅され 1 本のバンドが検出される. 腫瘍 A では父親由来の分子量の小さいアレルのみが, 腫瘍 B では母親由来の分子量の大きいアレルのみが増幅されていることを示している.

癌, 子宮体癌, 卵巣癌などの婦人科腫瘍はモノクローナルな病変であることを示した¹⁾.

ところで, 子宮頸癌はその前癌病変である子宮頸部異形成を経て癌化すると考えられている. しかし, 癌の本質のひとつであるモノクローナルな増殖が前癌病変のどの段階で起こっているのかはこれまで明らかにされていなかった. そこで, 子

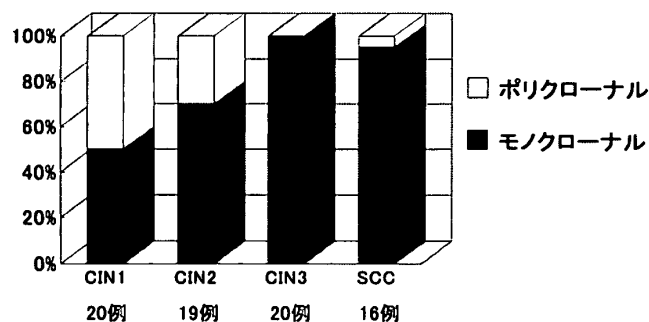


図2 子宮頸部病変のクローナリティー解析

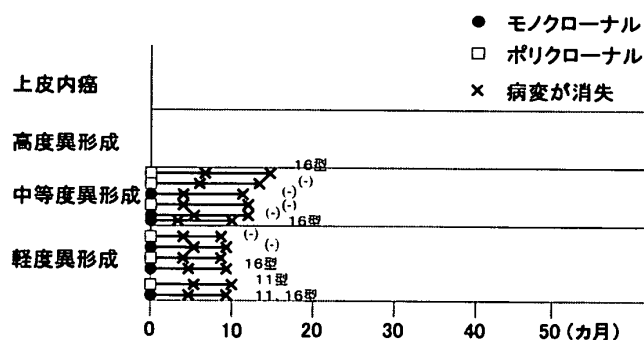
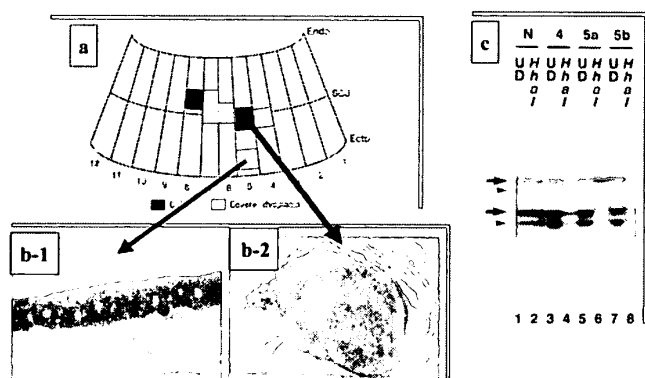
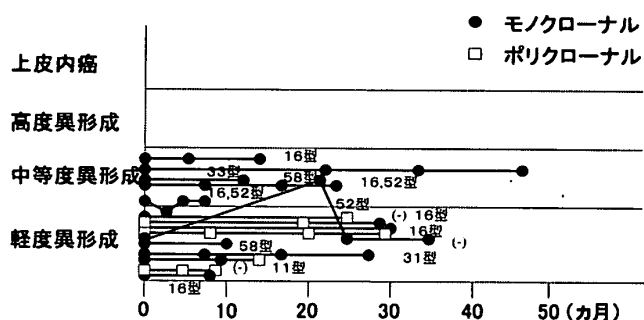
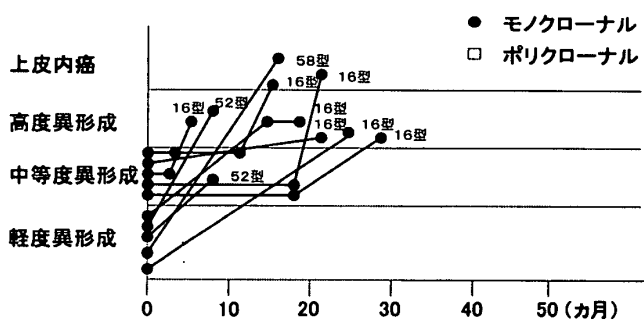
図4a Follow-up study of CIN1&2
〈消失症例〉

図3 円錐切除標本のクローナリティー解析

CIN3の診断の下、子宮頸部円錐切除術を施行した症例。摘出標本を12分割したところ(a), SCJ上に4時から8時にかけて頸管侵襲を伴うCIN3が存在した(b-1)。5時には腔断端側にSCJの病変とは独立して高度異形成が存在した(b-2)。それぞれの病変についてクローナリティー解析を行った(c)。正常組織(lane N)ではHhaI未処理(UD)も処理後も矢印で示す2本のバンドを認めたが(ポリクローナル), 4時から8時のSCJ上の病変ではHhaI処理後、上の分子量の大きいバンドが検出されなかった(lane 4: 4時, lane 5b: 5時)。5時の腔断端側の病変ではHhaI処理後、下の分子量の小さいバンドが検出されず(lane 5a), SCJ上の病変とはクローナリティーが異なることが示された。(Enomoto et al. Int J Cancer 1997; 73: 339—344より改変)

図4b Follow-up study of CIN1&2
〈持続症例〉図4c Follow-up study of CIN1 & 2
〈進行症例〉

宮頸部上皮内腫瘍より病変部をLM200 LCM 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アンドロゲン受容体のエクソン1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²⁾ (図1)。また、HPVのタイピングをPCR-RFLP法にて行った³⁾。

その結果、CIN1の20例中10例の50%, CIN2の19例中13例の68%, またCIN3の20例全例がモノクローナルな病変で腫瘍としての性格をすでにもっていることが示された(図2)(上田 豊, 尾崎圭一郎ら 未発表データ)。

また、CIN3の診断の下、子宮頸部円錐切除術を行った症例に対し12分割した標本より病変部のみを切り出しクローナリティー解析を行った⁴⁾。ある症例では11時から4時に連続してCIN3が存

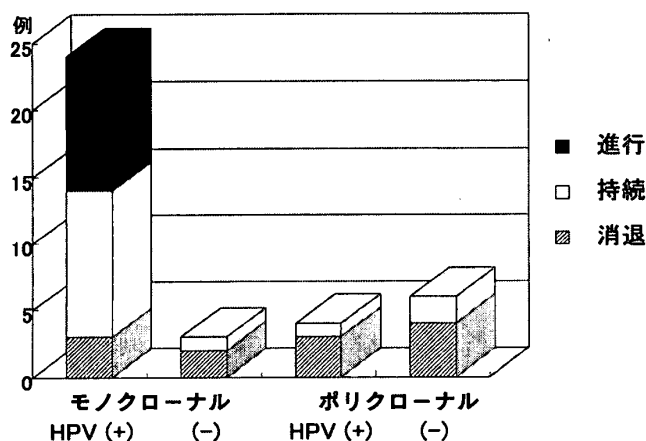


図5 HPV感染・クローナリティーとCIN1,2の転帰

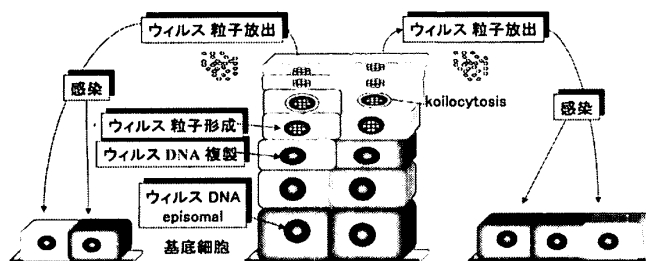


図6a HPVの感染とポリクローナルな病変

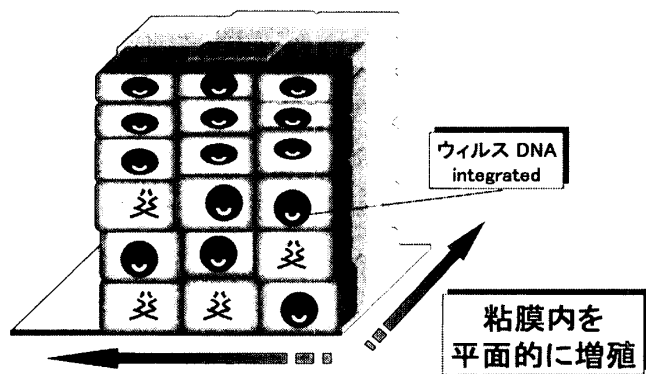


図6b HPVの感染とモノクローナルな病変

在したが、この症例ではすべての切片上の病変が同じ不活化のパターンを示し、単一細胞由来のCINが広がって形成された病変であることが示された。同様に6例の円錐切除した症例について連続する病変のクローナリティー解析を行ったところ、連続した病変はすべて同じ不活化のパターンを示した。しかし、ある症例では2つのCIN3病変が不連続に存在していた。両病変よりHPV16が検

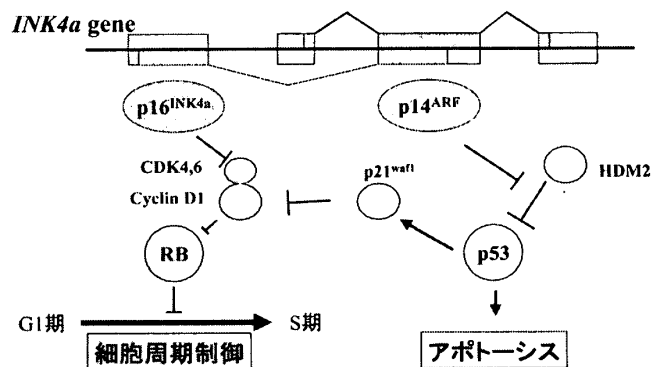


図7a 正常組織

$p16^{INK4a}$ はCDK4,6に特異的に結合し、CDK4,6がRB蛋白をリン酸化するのを阻害する。したがって、細胞周期の負の調節因子である。 $p14^{ARF}$ は $p16^{INK4a}$ と遺伝子座を共有し、 $p16^{INK4a}$ のexon 1と $p15^{INK4b}$ のexon 2の間に存在する $p16^{INK4a}$ のexon 1 β 、及び $p16^{INK4a}$ のexon 2と3からなる遺伝子である。 $p14^{ARF}$ はMDM2と直接結合し、p53の分解を抑制する。

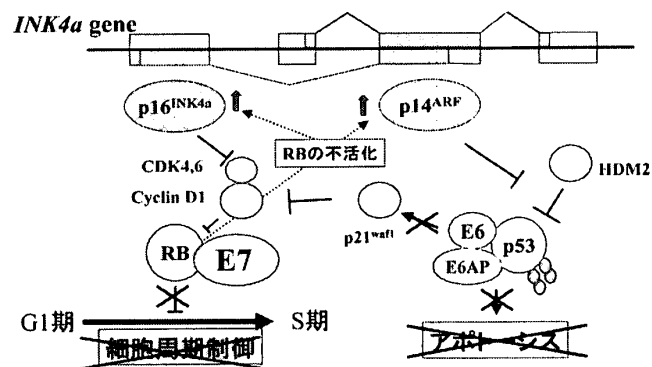


図7b HPV陽性子宮頸癌

悪性型HPVに感染した子宮頸癌では $p16^{INK4a}$ 及び $p14^{ARF}$ の過剰発現がみられる。悪性型HPVに感染するとE7はRBと結合しRBを不活化させ、RBとE2Fの複合体からE2Fを放出させる。E2Fは $p14^{ARF}$ を誘導し、p53を蓄積することによって、アポトーシス誘導遺伝子群を活性化しアポトーシスを誘導しようとする。また、p21^{waf1}を介して細胞周期を停止しようとする。しかし、p53はE6-E6AP複合体と結合することにより分解が促進されるため、結果的に細胞周期の制御もアポトーシスの誘導もできない。 $p16^{INK4a}$ の過剰発現がみられる理由は不明であるが負のフィードバック機構が働いているのではないかと考えられる。

出された。それぞれの病変のクローナリティー解析を行ったところ、不活化のパターンは互いに異なっていた(図3)。このことよりCIN3の多くは悪性型HPVの感染によりひとつの細胞から発生し、

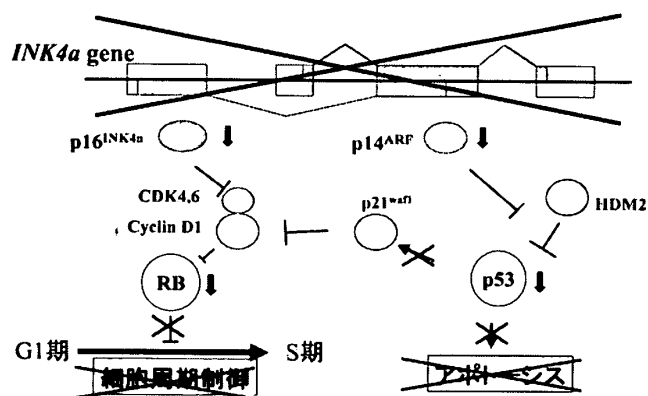
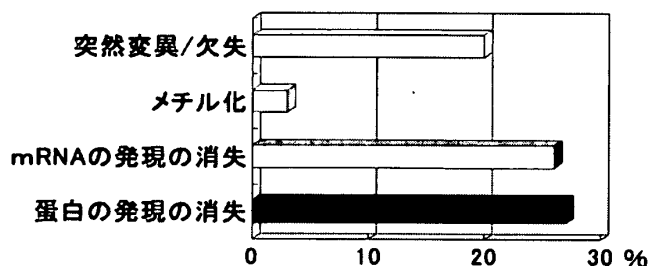


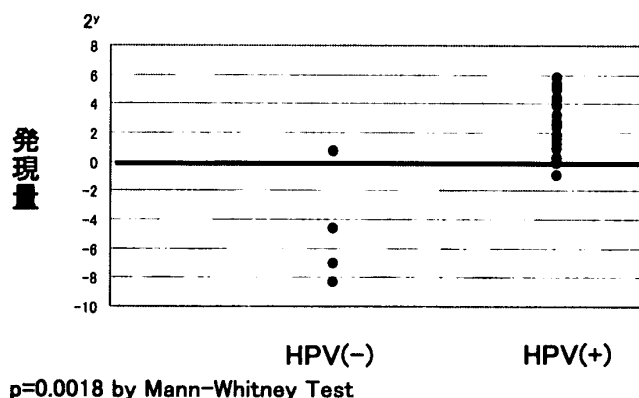
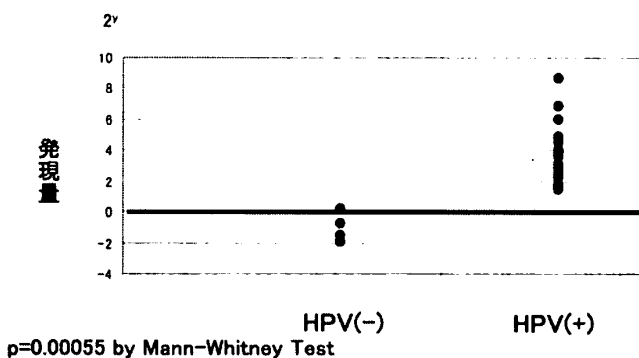
図 7c HPV 陰性子宮頸癌

HPV に感染していない子宮頸癌では、INK4a 遺伝子座が欠失や突然変異によって不活化し、 $p16^{INK4a}$ -RB 経路及び $p14^{ARF}$ -p53 経路ともに不活化され癌化が起ると考えられる症例が多いと考えられる。

図 8 子宮頸癌における $p16^{INK4a}$ の異常

コルポスコピーで認められるような広がりをもった病変に進展するが、なかには多中心性に発生する症例があることが示された。

次に CIN のクロナリティーと転帰との関係について考察した (上田 豊, 宮武 崇ら 未発表データ). 症例は 1997 年から 2001 年にかけて当科にてコルポスコピー下の狙い組織診にて CIN1 または 2 と診断後しばらく外来にて経過観察した症例で、CIN1 が 21 例、CIN2 が 16 例である。追跡期間は 7 から 48 カ月で平均追跡期間は 27.6 カ月であった。3 カ月ごとに細胞診及びコルポスコピーを行い異常所見を認めた際にはコルポスコピー下狙い組織診を行った。追跡期間中に採取した病変についてはクロナリティー解析を行い、初診時のクロナリティーと比較した。なお、細胞診所見、コルポスコピー所見及び組織所見の間に解離がみられる症例は解析から除外した。初診時に CIN1

図 9a 子宮頸癌における HPV 感染と $p16^{INK4a}$ の発現の相関図 9b 子宮頸癌における HPV 感染と $p14^{ARF}$ の発現の相関

または 2 と診断後、病変が消失した例は CIN1 が 6 例、CIN2 が 6 例あったが、モノクローナルな病変は CIN1 が 6 例中 3 例、CIN2 が 6 例中 3 例であった (図 4a)。初診後病変が持続した症例では CIN1 が 10 例、CIN2 が 5 例あったが、CIN1 の 10 例中 6 例、CIN2 の 5 例全例がモノクローナルな病変であった (図 4b)。CIN と初診後病変が進行した症例では CIN1 が 5 例、CIN2 が 5 例あったが、全例がモノクローナルな病変であった (図 4c)。

CIN1, 2 における悪性型 HPV の感染の有無と転帰との関係を検討した。悪性型 HPV に感染していない CIN1, 2 計 9 例中 6 例の 67% は病変が消失した。逆に、悪性型 HPV に感染している CIN1, 2 計 28 例中 22 例の 79% は病変が持続あるいは進行した。したがって悪性型 HPV の感染の有無と転帰とは有意に相関した ($p=0.0036$)。これは Remmink et al. の報告とほぼ一致する⁵⁾。

正常 mRNA の発現の消失と異常 mRNA の出現 扁平上皮癌

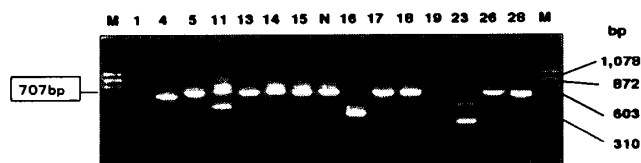


図 10a 子宮頸部病変における *FHIT* の異常
FHIT 遺伝子の exon 3-10 の 707bp を RT-PCR 法にて増幅した。正常扁平上皮 (N) 及び子宮頸部扁平上皮癌の症例 5, 13, 15, 17, 18, 26, 28 では正常サイズの 707bp の mRNA が検出された。症例 19 では mRNA はまったく検出されず、症例 1, 4, 13, 16, 23 では正常サイズの mRNA は検出されずに異常サイズの mRNA のみが検出された。(Yoshino et al. Int J Cancer 1998; 76: 176—181 より改変)

Immunohistochemistry

扁平上皮癌

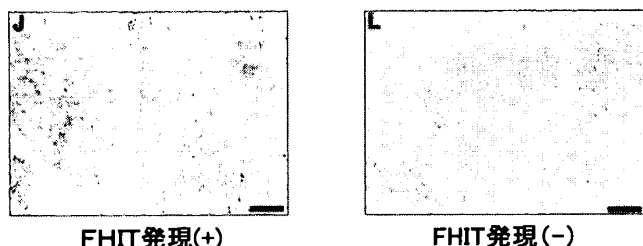


図 10b 子宮頸部病変における *FHIT* の異常
子宮頸部扁平上皮癌における *FHIT* 蛋白の発現を免疫染色法にて検出した。抗体はラビット抗 *FHIT* ポリクローナル抗体 (Zymed 社) を用いた。J: *FHIT* 陽性例。癌の細胞質が染色されているが間質は染色されない。L: *FHIT* 陰性例。腫瘍、間質ともに発現を認めない。スケールは 200 μ m (Yoshino et al. Int J Cancer 2000; 85: 6—13 より改変)

また、CIN1, 2 におけるクロナリティーと転帰の関係について検討したところ、モノクローナルな病変 27 例中 22 例の 81% が進行・持続したが、ポリクローナルな病変 10 例中 7 例の 70% は病変が消失し、進行した症例はなかった。したがってクロナリティーと転帰とは有意に相関した ($p=0.0031$)。病変が進行した症例 10 例のすべて、及び病変が持続した症例 15 例中 11 例は悪性型 HPV に感染しかつモノクローナルな CIN であった (図 5)。

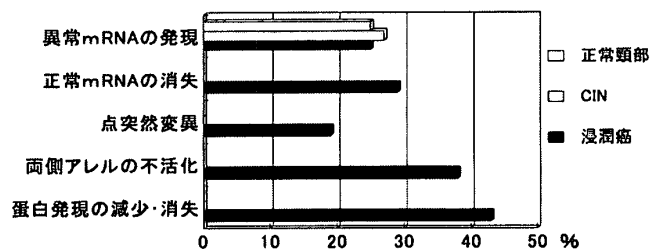
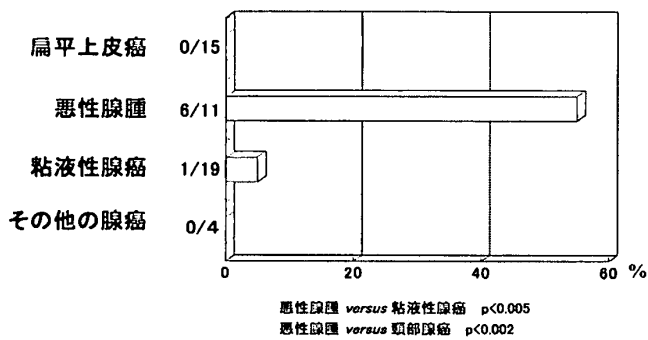


図 11 子宮頸癌における *FHIT* の異常

以上の結果より、悪性型 HPV に感染した CIN はモノクローナルな病変を形成することが多く、また病変が持続・進行する可能性が高いこと、非悪性型の HPV に感染した際はモノクローナルな病変を形成する可能性が少ないこと、ポリクローナルな CIN は、病変が消失する傾向が高いことが示された。同じ悪性型 HPV の感染を認める CIN 病変でも、どうしてポリクローナルな病変を形成し消退していく症例と、モノクローナルな病変を形成して持続・進行していく病変が存在するのだろうか。これまでの、子宮頸癌における HPV の physical status に関する研究によると、浸潤癌の 70~80% に悪性型 HPV が宿主 DNA に組み込まれている、いわゆる integrate された状態で存在することが報告されている。それに対し、子宮頸部上皮内腫瘍においては CIN3 では HPV は宿主 DNA に組み込まれているが CIN1 では episomal に存在しているという報告と、CIN1, 3 ともに、episomal に存在しているという報告がある⁶⁾⁷⁾。HPV16 型の感染を認めた CIN 病変に対して HPV の physical status を E2 と E6 のコピー数を real-time PCR 法にて定量化し、その比で検討したところ、モノクローナルな CIN12 例では宿主 DNA に組み込まれた HPV と episomal に存在する HPV が mix した状態で感染しているのに対し、ポリクローナルな CIN5 例のうち 3 例は HPV が episomal に存在し 2 例は HPV が mix した状態 (integrated + episomal) で感染していた。以上の点より HPV に感染した場合、HPV は最初 episomal に存在し、扁平上皮の分化に伴って、ウィルス DNA が複製され、ウィルス粒子を形成する。表層の細胞より放出された HPV は周囲の扁平上皮に感染

図 12 子宮頸癌における *STK11* の突然変異

するが、周辺の上皮はポリクローナルな細胞集団であるのでポリクローナルな病変を形成する (図 6a)。それに対し、悪性型 HPV に感染した細胞の一部では HPV が宿主 DNA に integrate することにより、細胞は制御されない増殖を開始し、モノクローナルな、腫瘍的性格をもった病変を形成し、やがて粘膜面を平面的に進展しコルポスコピーで認められるような広がりをもった病変へと進展すると思われる (図 6b)。

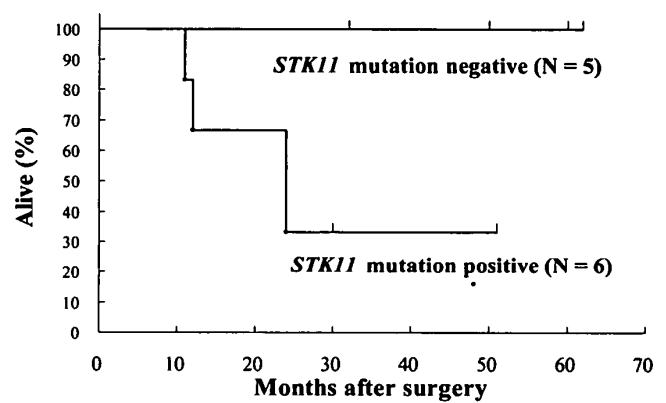
2. 発癌に関与する癌関連遺伝子の同定とその応用

2—①癌抑制遺伝子

2—①—i *p53* 癌抑制遺伝子

p53 癌抑制遺伝子は子宮体癌⁸⁾・卵巣癌⁹⁾をはじめさまざまなヒト癌で点突然変異による不活化が証明されている。悪性型 HPV の癌遺伝子の E6 はユビキチンリガーゼのひとつである E6AP (E6-associated protein) と複合体をつくると *p53* に対する結合能を獲得し E6AP の働きにより *p53* をユビキチン化してプロテアゾームによる *p53* の分解を促進する¹⁰⁾¹¹⁾。子宮頸癌細胞株では HPV に感染していない細胞株に *p53* の点突然変異がみられたことより、*p53* の E6 によるあるいは点突然変異による不活化が頸癌の発生に必要であると報告された¹²⁾。しかし、手術・生検材料を用いて *p53* の点突然変異を検討したところ、*p53* の点突然変異は HPV 陽性 29 例中 2 例に認めたのみで、HPV 陰性 7 例ではまったく認めず、子宮頸癌では HPV 感染の有無にかかわらず *p53* の点突然変異による不活化は稀であることが示された¹³⁾。

2—①—ii *p16^{INK4a}* 遺伝子, *p14^{ARF}* 遺伝子

図 13 悪性腺腫における *STK11* の異常と転帰

p16^{INK4a} は *p15^{INK4b}* と同様第 9 染色体短腕 (9p21) から単離された癌抑制遺伝子で脳腫瘍、白血病、膵癌を含む種々の癌に高頻度に遺伝子異常が報告されている¹⁴⁾。*p16^{INK4a}* は CDK4, 6 に特異的に結合し、その活性を阻害する (図 7a)。したがって細胞周期の負の調節因子である。子宮頸癌では *p16^{INK4a}* の点突然変異あるいは欠失による不活化を 20% に認めたが、プロモータ領域のメチル化による不活化は 3% と稀であった¹⁵⁾。点突然変異や欠失、プロモータ領域のメチル化の結果生じたと考えられる mRNA の発現の消失、蛋白の発現の消失は約 25% に認めた (図 8)。*p14^{ARF}* は *p16^{INK4a}* と遺伝子座を共有し、*p16^{INK4a}* の exon 1 と *p15^{INK4b}* の exon 2 の間に存在する *p16^{INK4a}* の exon 1β、及び *p16^{INK4a}* の exon 2 と 3 からなる遺伝子である¹⁶⁾¹⁷⁾ (図 7a)。*p14^{ARF}* は HDM2 と直接結合し、*p53* の分解を抑制する働きがある。また、*p14^{ARF}* の転写が E2F によって亢進することも知られている。*RB* 経路に異常が起こると E2F の転写活性が亢進し、細胞周期を正常にコントロールできなくなるが、E2F は *p14^{ARF}* の発現を誘導し *p53* 経路を活性化することにより癌化を防いでいると考えられる。子宮頸癌における *p16^{INK4a}* と *p14^{ARF}* の mRNA の発現量を real-time PCR 法にて定量し、HPV 感染との相関について検定した (金尾祐之ら 未発表データ)。HPV 陽性の子宮頸癌では正常子宮頸部扁平上皮と比較して *p16^{INK4a}* 及び *p14^{ARF}* の発現量の亢進している症例が有意に多かった (図 9a, b)。また、HPV 陰性の子宮頸癌では 4 例中 3 例に

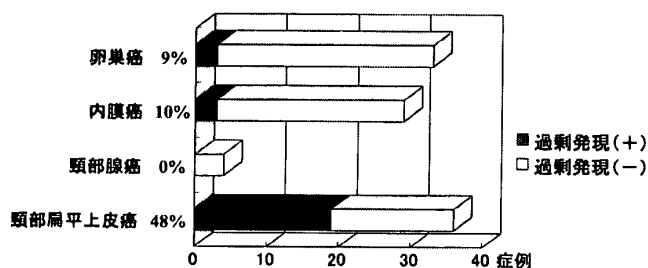


図 14 婦人科腫瘍における TSC403 の過剰発現

$p16^{INK4a}$ の発現の著明な減少がみられた(図 9a). すなわち HPV 陽性の子宮頸癌では E7 により RB の不活化が起こるため E2F の転写活性が亢進し, その結果 $p14^{ARF}$ の発現が亢進していると考えられる(図 7b). HPV 陽性の子宮頸癌において $p16^{INK4a}$ の発現の亢進している理由は不明だが, E7 によって RB 経路が不活化されていることに対する負のフィードバック機構が働いているのではないかと考えられている. これに対し HPV 陰性の子宮頸癌は INK4a 遺伝子座の欠失あるいは点突然変異により $p16^{INK4a}$ -RB 経路及び $p14^{ARF}$ -p53 経路ともに不活化され癌化が起こると考えられる.

2—①—iii FHIT 癌抑制遺伝子

第 3 染色体短腕は子宮頸癌において高頻度にヘテロ接合性の消失がみられることが報告されている. 例えば, 13p14.2 は CIN2, 3 の 20% に, 浸潤癌の 55% にヘテロ接合性の消失がみられる¹⁸⁾. FHIT は第 3 染色体短腕 13p14.2 より同定された癌抑制遺伝子である¹⁹⁾.

FHIT 遺伝子の mRNA707bp を RT-PCR 法にて検出すると, 子宮頸癌の 48 例中 14 例 (29%) に正常の大きさの 707bp のフラグメントが検出されなかった²⁰⁾ (図 10a). また, 707bp 以外の大きさのフラグメントを認める症例を 48 例中 12 例の 25% に認めた. この異常サイズの mRNA は CIN 22 例中 6 例 (27%), 正常子宮頸部扁平上皮でも 40 例中 10 例 (25%) に認めたが, 正常サイズの mRNA は CIN, 正常子宮頸部扁平上皮では必ず発現していた. また, 点突然変異を浸潤癌 48 例中 9 例 (19%) に認め, 結果的に FHIT の両側のアレルが不活化していると考えられる症例を 48 例中 18 例 (38%) に認めた. 免疫組織学的検討では

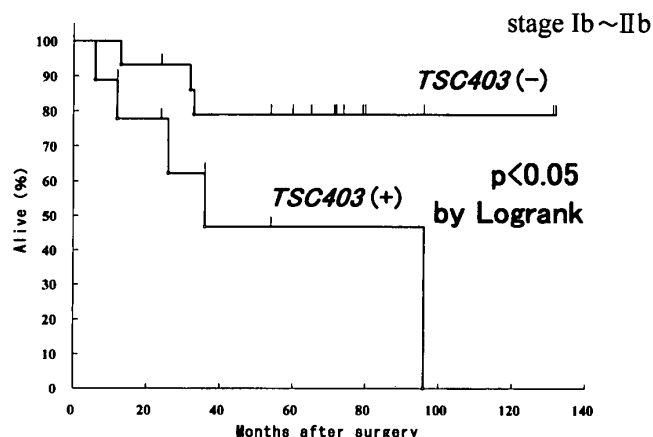


図 15 子宮頸癌における TSC403 の発現と転帰

FHIT 蛋白の発現の減弱消失を 30 例中 13 例 (43%) に認めた²¹⁾ (図 10b). FHIT の両側アレルの不活化による蛋白発現の消失は浸潤癌では高頻度に認めるが, CIN ではまったく認めない(図 11). 子宮体癌でも, 前癌病変の異型子宮内膜増殖症には FHIT の不活化は認めず, 低分化型類内膜癌に高頻度に認めること²²⁾, 卵巣漿液性腫瘍でも, 腺腫や境界悪性腫瘍では FHIT の不活化は認めないが漿液性腺癌に高頻度に不活化を認めること²³⁾より FHIT の不活化は癌化の晩期変化として起こっているのではないかと考えている.

2—①—iv STK11 癌抑制遺伝子

子宮頸部悪性腺腫 (adenoma malignum) は minimal deviation adenocarcinoma と呼ばれ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, 両者はまった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²⁴⁾. PJS の原因遺伝子として同定された STK11 (LKB1) 遺伝子は第 19 染色体短腕 (19p13.3) に存在し²⁵⁾ 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²⁶⁾. そこで, 悪性腺腫の原因遺伝子が STK11 (LKB1) 遺伝子であるかどうかについて検討した.

STK11 (LKB1) 遺伝子の点突然変異は PJS の家

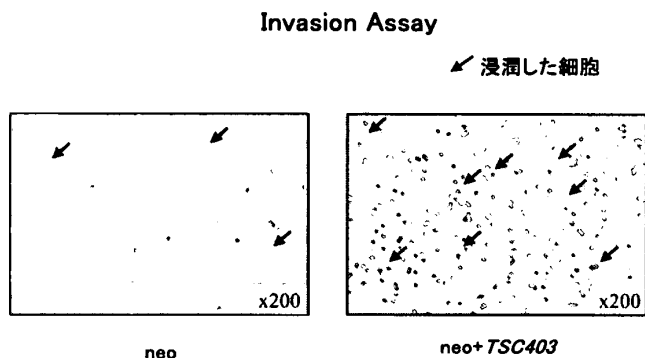


図 16a *TSC403* の子宮頸癌細胞株 (TCS) への強制発現

TSC403 遺伝子を発現していない子宮頸癌細胞株 TCS に, *TSC403* を neo 遺伝子下流に組み込んだベクターを transfect 後 G418 にて selection した (neo + *TSC403*). コントロールとして親株に neo 遺伝子のみを transfect した (neo). 8 μ m の孔を有するポリカーボネイトフィルターをメンブレンとし, メンブレンとディバイスが一体化したケモタキセル (クラブウ) にマトリゲルを chamber あたり 25 μ g コートし, 遺伝子導入した細胞を 1×10^6 個/200 μ l の濃度で chamber にまき, chamber 下にフィブロネクチン 20 μ l/ml を含むケモアトラクタント溶液 (1.1ml) を加え 24 時間培養し, メンブレン下に浸潤している細胞を 0.4% トリパンブルーにて染色した.

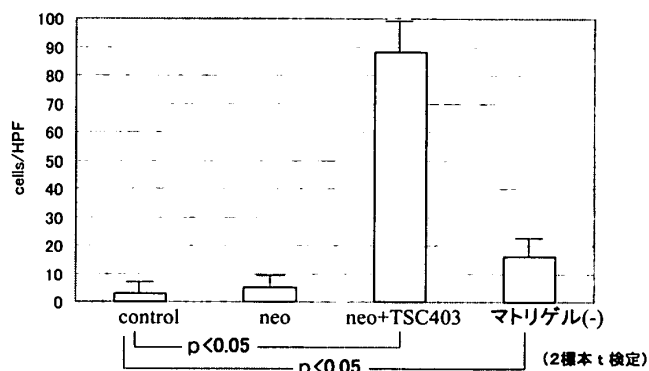


図 16b *TSC403* の子宮頸癌細胞株 (TCS) への強制発現による浸潤能の獲得

メンブレン下に浸潤した細胞数を 200 倍率にてカウントし 5 視野の平均値を示した. それぞれの群につき 3 回実験を行った. control: TCS 親株, neo: neo 遺伝子のみを導入した TCS, neo + *TSC403*: *TSC403* を導入した TCS, マトリゲル (-): マトリゲルをコートしていないケモタキセル上に TCS 親株をまいた. メンブレンにマトリゲルをコートすることにより, 浸潤する細胞が 20~30 細胞/視野から 0~10 細胞/視野と有意に減少し, マトリゲルが浸潤のバリアーとしての働きを担っていることが示されている. TCS 細胞に *TSC403* 遺伝子を導入することによってメンブレンを浸潤する細胞が 0~10 細胞/視野から 80~100 細胞/視野と有意に増加した.

系でない悪性腺腫の 11 例中 6 例 (55%) に認めたが粘液性腺癌では 19 例中 1 例 (5%) のみに点突然変異を認めただけで, その他の組織型の腺癌 4 例や扁平上皮癌 15 例には点突然変異を認めなかった (図 12) (倉垣千恵ら 未発表データ). したがって, *STK11* (*LKB1*) 遺伝子は悪性腺腫の発生に深く関与していることが示唆された. 悪性腺腫における *STK11* (*LKB1*) 遺伝子の異常の有無と転帰について考察した. *STK11* (*LKB1*) 遺伝子に変異をもつ症例は変異をもたない症例より有意に予後不良であった (図 13). 悪性腺腫は細胞異型がほとんどないため, 悪性腺腫類似の腺管が頸部の比較的浅層にあった場合悪性腺腫の初期病変か否かを形態学的に判別するのは難しい. 免疫組織学的には悪性腺腫は胃幽門腺粘液に対する抗体 HIK 1083 に強染し, ミュラー管由来の腺管に発現しているエストロゲン受容体, プロゲステロン受容体や CA125 は発現していない²⁷⁾²⁸⁾. 悪性腺腫類似の腺管が頸部の比較的浅層のみに存在する症例の中

には悪性腺腫と同様の免疫染色性を示す症例があり, このような病変は悪性腺腫の初期病変ではないかと考えられている. 免疫組織学的に悪性腺腫の初期病変を疑う症例 5 例について *STK11* 遺伝子の異常を検索したところ, 遺伝子異常は 1 例も認めなかった. また, クロナリティー解析が可能であった 3 症例はすべてポリクローナルであった. したがって, このような病変は悪性腺腫の初期像というよりは子宮頸管腺が胃幽門腺化生を起こした病変で腫瘍性病変ではないと考えられる. 今後 *STK11* 遺伝子異常を検索することにより, 悪性腺腫か否かの遺伝子診断, 予後診断が可能になると考える.

2—② 癌遺伝子

2—②—i K-ras 癌遺伝子

K-ras の exon 1 の codon 12, 13 の点突然変異による活性化はさまざまなヒト癌で報告されている. 婦人科腫瘍でも子宮体癌の 31% に卵巣癌では粘液性腺癌の 67% に K-ras の点突然変異を認め

る^{29)~31)}。しかし、子宮頸癌では *K-ras* の点突然変異は 23 例中 1 例 (4%) と極めて稀であり、癌化に関与していないことが示唆された³¹⁾。

2—②—ii *TSC403* 癌遺伝子

TSC403 癌遺伝子は第 3 染色体長腕 3q27 から単離された遺伝子で正常肺組織に特異的に発現しているが、卵管癌・乳癌・大腸癌・肝癌由来の細胞株で発現の増強がみられる。*TSC403* 遺伝子がコードする蛋白は 416 アミノ酸からなり lysosome-associated membrane glycoprotein 1, 2 (*lamps*) と 30% 以上の相同性を示す³²⁾。*lamps* は sialyl-lewis X が結合する蛋白で、通常は lysosome 膜上に発現するが高転移性大腸癌細胞株において発現の増強がみられることが報告されている。*TSC403* 遺伝子は NIH3T3 細胞をトランスフォームすること、トランスフォームした細胞は軟寒天培地で増殖することより癌遺伝子であると考えられている。

RT-PCR 法にて婦人科腫瘍における *TSC403* 遺伝子の発現を検討した。*TSC403* の発現の増強を認めた症例は子宮頸部扁平上皮癌では 36 例中 20 例の 56% であったが子宮体癌では 29 例中 3 例の 10%、卵巣癌では 33 例中 3 例の 9% にすぎず、子宮頸部腺癌 4 例には発現の増強を認めなかった³³⁾ (図 14)。したがって、*TSC403* 遺伝子の発現の増強は子宮頸部扁平上皮癌に特異的に関与していることが示された。また real-time PCR 法にて正常子宮頸部扁平上皮と扁平上皮癌で発現量を検討したところ、癌化に伴って発現量が増えていることが示された (金尾祐之ら 未発表データ)。子宮頸部扁平上皮癌で *TSC403* 遺伝子の発現量の増強の有無と予後を検討したところ、発現量が増強している症例のほうが有意に予後不良であることが示された (図 15)。*TSC403* 遺伝子の機能はほとんどわかっていない。そこで、*TSC403* を発現していない子宮頸癌細胞株 TCS 及び NIH3T3 細胞株に *TSC403* 遺伝子を導入し、in vitro にて浸潤能を解析したところ、遺伝子導入によって浸潤能が増加することが示された (図 16a, b)。

考 察

これまで子宮頸癌の発生に悪性型 HPV が関与

していることはよく知られていたが、悪性型 HPV に感染後どの段階から腫瘍性病変が発生するのかに関しては明らかにされていなかった。本研究により、HPV に感染しても、HPV が episomal に存在する際にはポリクローナルな病変を形成し、このような病変は時間とともに消退する可能性が高いが、悪性型 HPV に感染すると、感染細胞の一部では宿主 DNA に HPV が組み込まれ、その結果モノクローナルな増殖を開始し、病変は粘膜上を平面的に発育し、やがて、コルポスコピーで認められるような広がりをもった病変に進展することが示唆された。

これまで子宮頸癌の発生・進展に関与する癌関連遺伝子についてはあまり明らかにされていなかったが、子宮体癌や卵巣癌で高頻度に異常が検出される *p53* や *K-ras* の点突然変異は子宮頸癌では稀であることを明らかにした。

また、HPV 感染と *p16^{INK4a}* 及び *p14^{ARF}* の発現量は相関すること、HPV 陰性の子宮頸癌では *INK4a* 遺伝子座の異常により *p16^{INK4a}-RB* 経路及び *p14^{ARF}-p53* 経路が不活化していると考えられた。

FHIT の不活化は頸癌の約 40% に認めたが、頸部上皮内病変ではほとんど認めず、癌の晩期変化であると考えられた。

新しい癌遺伝子である *TSC403* は、子宮頸部扁平上皮癌に特異的に関与していること、*TSC403* の発現の増強は予後因子であることを明らかにした。この遺伝子の癌化における機能についてはまったく知られていないが、浸潤能に関与している可能性が示唆された。

また、悪性腺腫の原因遺伝子が Peutz-Jeghers syndrome の原因遺伝子である *STK11* 遺伝子であること、*STK11* 遺伝子の異常は悪性腺腫の予後因子であることを示した。

ヒト癌の発生には数多くの遺伝子変化が関与していると考えられており、本研究により明らかにした遺伝子変化は、ほんの一部分に過ぎない。今回発表時間の都合上割愛した、テロメラーゼ関連遺伝子も子宮頸癌の癌化に関与していることが知られている^{34)~36)}。テロメラーゼ活性を TRAP 法にて検出すると、正常子宮頸部では活性をほとん

ど認めないが, CIN1 の 60%, CIN2 以上の病変のほぼ 100% にテロメラーゼ活性を認めた³⁶⁾. CIN1 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る. テロメラーゼの活性中心である *hTERT* を免疫染色法にて検出すると, *hTERT* は正常扁平上皮では傍基底細胞層しか染色されないが, CIN ではほぼ全層染色され, テロメラーゼ活性と相関した³⁶⁾.

癌化に関与する遺伝子を新たに同定する手法として正常子宮頸部と子宮頸癌の発現遺伝子の差を解析するために, Affymetrix 社の Genechip Human Genome U95 Set にて約 6 万の既知遺伝子及び EST の発現を解析した. そして, 癌化に伴い発現量が増加している遺伝子 20 個, 発現量が減弱している遺伝子 5 個を見出した. 現在これらの遺伝子が本当に癌化に伴って発現量に変化しているかについて real-time PCR 法にて検定を行っている. DNA チップはトランスクリプトームの解析であるが, プロテオームを解析する目的で Ciphergen 社のプロテインチップシステムにて子宮頸癌の発生に伴って発現量の変化している蛋白質の同定を試みている. 今後このような手法により, 子宮頸癌の癌化に関与する遺伝子がすべて同定され, 癌化の機構が明らかになり, 遺伝子情報をもとにした治療の選択がなされる時代がくると確信している.

共同研究者

大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学:

藤田征巳, 中野竜一, 吉野 潔, 倉垣千恵, 千森弘子,
中村隆文, 尾崎圭一郎, 孫 紅波, 上田 豊, 金尾祐之,
上野裕子, 宮武 崇, 吉崎達郎, 中嶋康雄, 村田雄二

遺伝医学:

野村大成

京都大学大学院医学系研究科 器官外科学:

藤井信吾

信州大学医学部 産科婦人科学:

小西郁生, 土岐利彦

研究協力者

平松恵三, 牛島由樹子, 西村奈夏

文 献

1. Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, et al.

- Analysis of clonality by amplification of short tandem repeats: carcinomas of the female reproductive tract. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 292—297
2. Sun H, Enomoto T, Shroyer KR, et al. Clonal Analysis and Mutations in the *PTEN* and the *K-ras* genes in Endometrial Hyperplasia. *Diagn Mol Pathol* 2002 (in press)
3. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, et al. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1991; 72: 1039—1044
4. Enomoto T, Haba T, Fujita M, et al. Clonal analysis of high-grade squamous Intra-epithelial lesions of the uterine cervix. *Int J Cancer* 1997; 73: 339—344.
5. Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: Natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995; 61: 306—311
6. Das BC, Sharma JK, Gopalkrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* 1992; 73: 2327—2336
7. Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallikad E, Krishna S. Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analyzed by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76: 2589—2593
8. Enomoto T, Fujita M, Inoue M, et al. Alterations of the *p53* tumor suppressor gene and its association with activation of the c-*K-ras*-2 protooncogene in premalignant and malignant lesions of the human uterine endometrium. *Cancer Res* 1993; 53: 1883—1888
9. Fujita M, Enomoto T, Inoue M, et al. Alteration of the *p53* tumor suppressor gene occurs independently of *K-ras* activation and more frequently in serous adenocarcinoma than in other common epithelial tumors of the human ovary. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 1247—1256
10. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129—1136
11. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM, et al. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 775—784
12. Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the *p53* and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5523—5527

13. *Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Iwamoto S, Enomoto T*. Alterations of the *p53* gene in human primary cervical carcinoma with and without human papillomavirus infection. *Cancer Res* 1992 ; 52 : 5323—5328
14. *Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al*. Deletion of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994 ; 368 : 753—756
15. *Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, et al*. Alteration of *p16* and *p15* genes in human uterine tumors. *Brit J Cancer* 1999 ; 80 : 458—467
16. *Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, et al*. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995 ; 83 : 993—1000
17. *Sharpless NE, Depinho RA*. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999 ; 9 : 22—30
18. *Wistuba II, Montellano FD, Milchgrub S, et al*. Deletions of chromosome 3p are frequent and early events in the pathogenesis of uterine cervical carcinoma. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 3154—3158
19. *Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al*. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t (3 : 8) breakpoint, is abnormal in digestive tract tumors. *Cell* 1996 ; 84 : 587—597
20. *Yoshino K, Enomoto T, Nakamura T, et al*. Aberrant *FHIT* transcripts in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Cancer* 1998 ; 76 : 176—181
21. *Yoshino K, Enomoto T, Nakamura T, et al*. FHIT alterations in cancerous and non-cancerous cervical epithelium. *Int J Cancer* 2000 ; 85 : 6—13
22. *Ozaki K, Enomoto T, Yoshino K, et al*. FHIT alterations in endometrial carcinoma and hyperplasia. *Int J Cancer* 2000 ; 85 : 306—312
23. *Ozaki K, Enomoto T, Yoshino K, et al*. Impaired *fhit* expression occurs commonly in serous carcinoma but rarely in no-serous carcinoma of the ovary. *Brit J Cancer* 2001 ; 85 : 247—254
24. *Gilk CB, Young RH, Aguirre P, DeLellis RA, Scully RE*. Adenoma malignum (minimal deviation adenocarcinoma) of the uterine cervix : a clinicopathological and immunohistochemical analysis of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 1989 ; 13 : 717—729
25. *Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al*. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998 ; 391 : 184—187
26. *Lee JY, Dong SM, Kim HS*. A distinct region of chromosome 19p13.3 associated with the sporadic form of adenoma malignum of the uterine cervix. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 1140—1143
27. *Toki T, Shiozawa T, Hosaka N, Ishii K, Nikaido T, Fujii S*. Minimal deviation adenocarcinoma of the uterine cervix has abnormal expression of sex steroid receptors, CA125, and gastric mucin. *Int J Gynecol Pathol* 1997 ; 16 : 111—116
28. *Ishii K, Hosaka N, Toki T, et al*. A new view of the so-called adenoma malignum of the uterine cervix. *Virchows Arch* 1998 ; 432 : 315—322
29. *Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, et al*. K-ras activation in neoplasms of the human female reproductive tract. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 6139—6145
30. *Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O, Rice JM*. K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. *Am J Pathol* 1991 ; 139 : 777—785
31. *Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO*. K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 5308—5314
32. *Ozaki K, Nagata M, Suzuki M, et al*. Isolation and characterization of a novel human lung-specific gene homologous to lysosomal membrane glycoproteins 1 and 2 : Significantly increased expression in cancers of various tissues. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 3499—3503
33. *Fujita M, Enomoto T, Kanao H*. Detection of *TSC403* gene expression in human gynecological tumors. *Brit J Cancer* 2002 (in press)
34. *Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Tanaka M, Inoue M*. Expression of telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 1558—1561
35. *Shroyer KR, Thompson LC, Enomoto T, et al*. Telomerase expression in normal epithelium, reactive atypia, squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Am J Clin Pathol* 1998 ; 109 : 153—162
36. *Frost M, Bobak J, Enomoto T, et al*. Localization of telomerase hTERT protein and hTR in benign mucosa, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Am J Clin Pathol* 2000 ; 114 : 726—734

Abstract

It is well established that infection of oncogenic HPV is the initial step for cervical carcinogenesis. However, it is not known when neoplastic growth starts after infection of high risk HPV. In addition, genetic alterations, including activation of proto-oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes involved in cervical carcinogenesis have not been well characterized yet. In the present study, patterns of X-chromosome inactivation were evaluated in cases of cervical intraepithelial neoplasia to determine the presence of potentially premalignant neoplastic versus polyclonal benign cell populations. Monoclonal composition was demonstrated in all 20 cases of CIN3 (100%), 13 of 19 cases of CIN2 (68%) and 10 of 20 cases of CIN1 (50%). In one uterine cervix, in which dysplastic lesions were present in 6 blocks, the pattern of X-chromosome inactivation was the same in all lesions, suggesting that these individual lesions were derived from a single cell, with intraepithelial extension within the cervical mucosa. By contrast, another uterus contained 2 discontinuous dysplastic foci with different patterns of X-chromosome inactivation, indicating that the two lesions developed independently from each other. Twenty-two of 27 (80%) CINs which were monoclonal in composition were either progressed or persisted. By contrast, 7 of 10 (70%) CINs which were polyclonal in composition were regressed. All 10 cases of CINs which progressed were positive for high risk HPV infection and monoclonal in composition. Clonal status and infection of high risk HPV were thus significantly associated with clinical outcome in CIN1 and 2. Inactivation of the tumor suppressor genes, *p53*, *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}* and *FHIT*, and activation of the *K-ras* proto-oncogene, were analyzed.

Inactivation of *STK11*, the gene responsible for Peutz-Jeghers syndrome, and activation of *TSC403*, which has been isolated from 3q27 where chromosomal gain is frequently observed in cervical carcinoma, were also studied. Inactivation of *p53* was rare irrespective of the presence or absence of HPV infection (2/29 versus 0/7). In contrast, expression of *p16^{INK4a}* and *p14^{ARF}* transcripts was significantly associated with the presence of HPV infection ($p = 0.0018$ and 0.000555 , respectively). Impaired expression of the *FHIT* gene product due to loss of normal *FHIT* transcript was detected in 13 of 30 (43%) invasive carcinoma of the uterine cervix but not in any 22 CINs, suggesting that inactivation of *FHIT* occurs as a late event in cervical carcinogenesis. Mutation in *STK11* was detected in 6 of 11 (55%) MDAs, not known to be associated with PJS, and 1 of 19 (5%) mucinous adenocarcinomas but not in 4 endometrioid adenocarcinomas or 15 squamous cell carcinomas. MDAs with *STK11* mutation had significantly poorer prognosis than MDAs without *STK11* mutation. Activation of *K-ras* by point mutation in codon 12 or 13 was detected in 17 of 57 (31%) endometrial carcinomas but only in 4 of 23 (4%) cervical carcinomas, suggesting that *K-ras* activation plays little role in cervical carcinogenesis. Overexpression of *TSC403* mRNA was significantly higher in cervical carcinomas (10/20, 50%), especially in squamous cell carcinomas (56%), compared with endometrial carcinomas (3/29, 10%) or ovarian carcinomas (3/33, 9%). Cervical carcinomas which showed *TSC403* overexpression had significantly poorer prognosis than those with normal level of *TSC403* expression. The cervical carcinoma cell line, TCS, and NIH3T3, both expressed low level of *TSC403* mRNA, acquired invasion activity in vitro significantly by induction of *TSC403*. The present study demonstrate that 1) Not only CIN3 but a majority of CIN1 and 2 are composed of a clonal neoplastic population of cells and such monoclonal CINs infected with high risk HPV are more likely to progress or persist compared with polyclonal CINs infected with low risk HPV, 2) inactivation of *p16^{INK4a}-RB* and *p53-p14^{ARF}* pathways, inactivation of *FHIT*, and activation of *TSC403* play an important role for the etiology of cervical carcinoma, and 3) mutation in the *STK11* may characterize the MDA as being distinct from other common types of adenocarcinomas of the uterine cervix.