

20050049/A

厚生労働省科学研究費補助金

がん 臨床研究事業

子宮頸癌術後リンパ節転移に対する治療法適正化の研究

(課題番号:H16-がん臨床-017)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 伊東 久夫

(千葉大学大学院医学研究院)

平成18(2006)年3月

目次

I. 総括的研究報告		
子宮頸癌術後リンパ節転移に対する治療法適正化の研究	-----	3
伊東久夫		
II. 分担研究報告		
1. 線維芽細胞の放射線感受性に関する検討	-----	9
伊東久夫、川田哲也		
2. 子宮頸部の腺扁平上皮癌の予後に関する臨床的検討 一腺癌ならびに扁平上皮癌との比較一	-----	15
西村 隆一郎		
3. siRNAとアテロコラーゲン複合体を用いた子宮頸癌に対する分子標的的治療	-----	21
野澤志朗、藤井多久磨		
4. 頸癌科学放射線療法におけるCDDP認容生に関する検討	-----	25
星合 昊、渡辺 洋		
5. 婦人科癌における遺伝子多型生	-----	27
植田政嗣、寺井義人		
6. 婦人科腫瘍の治療法改善に関する検討	-----	31
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	35
IV. 研究成果の刊行物・別冊	-----	37

子宮頸癌術後リンパ節転移に対する治療法適正化の研究

主任研究者 伊東 久夫 千葉大学大学院医学研究院放射線医学

研究要旨

本研究は子宮頸癌根治術後にリンパ節転移が診断された患者を対象とする。化学療法群と化学放射線療法群との2群による無作為臨床試験を行い、術後放射線治療の利益と損失を明確にして、治療法の適正化をはかることを目的とした。すなわち、従来から慣習的に行われてきた治療法が適正か否かを解明し、有用性の無い場合は中止して、患者の副作用軽減とQOL改善をはかるものである。

本研究課題には術後照射の意義を明確にすることであるが、治療法の改善と副作用の軽減には、同時に各種の付随した研究課題が必要になる。すなわち、子宮頸癌のリンパ節転移発生の機序解明や、リンパ節転移発生の危険性が高い患者の選別、再発時の至適な治療法の開発、扁平上皮癌以外の組織型における病態、正常組織の放射線障害予防又は軽減、等の研究である。

本年度の研究成果による結論は以下のように要約できる。

- (1) 子宮頸癌術後リンパ節転移患者に対する至適後療法を開発するため、術後照射の有用性を検討する臨床試験に患者登録を行ったが、十分な成果を上げられなかった。
- (2) 付随的研究として、i) 正常組織細胞の放射線感受性に関する研究、ii) 腺癌との比較からみた扁平上皮癌の特性、iii) 婦人科腫瘍に対する新たな化学療法剤、iv) ヒト遺伝子多形と疾患の特性解析、v) 術前化学療法の有用性、vi) 早期癌の検出法の研究、を行った。

分担研究者氏名・所属機関・職位

池田 恢・国立がんセンター中央病院・部長
植田 政嗣・大阪医科大学・助教授
梅咲 直彦・和歌山県立医科大学・教授
上坊 敏子・北里大学医療系研究科・助教授
竹内 正弘・北里大学薬学研究院・教授
西村隆一郎・兵庫県立成人病センター・部長
野澤 志朗・慶應義塾大学医学部・名誉教授
星合 昊・近畿大学医学部・教授
藤井多久磨・慶應義塾大学医学部・講師

A. 研究目的

子宮頸癌根治的手術後の病理学的検査で、(1)リンパ節転移、(2)子宮頸部の側方進展、(3)脈管侵襲、(4)腫瘍サイズ大、が診断されると予後不良である。これらの因子が陽性の患者は、一般的に術後骨盤部放射線治療が行われている。術後骨盤部放射線治療はリンパ節転移以外の予後不良因子に対して、有用性を示唆するエビデ

ンスがあるが、リンパ節転移に対しては治療による利益と損失の関係が不明瞭である。

本研究は子宮頸癌根治術後にリンパ節転移が診断された患者を対象とする。化学療法群と化学放射線療法群との2群による無作為臨床試験を行い、術後放射線治療の利益と損失を明確にして、治療法の適正化をはかることを目的とした。すなわち、治療成績の改善を目的とするものではなく、従来から慣習的に行われてきた治療法が適正か否かを解明し、有用性の無い場合は中止して、患者の副作用軽減とQOL改善をはかるものである。

本研究課題には術後照射の意義を明確にすることであるが、治療法の改善と副作用の軽減には、同時に各種の付随した研究課題が必要になる。すなわち、子宮頸癌のリンパ節転移発生の機序解明や、リンパ節転移発生の危険性が高い患者の選別、再発時の至適な治療法の開発、扁平上皮癌以外の組織型における病態、正常組織の放射線障害予防又は軽減、等の研究である。

これらの付随研究も積極的に行う。

B. 研究方法

上記目的を達成するため、全体で3年間の研究計画を立案した。

1) 臨床試験では初年度に実施計画書の作成と各施設のIRBの承認、2年目は患者の登録を促進し患者の集積につとめる。3年目は患者の登録を続けると共に、最終解析と結果の公表の準備をする、である。

研究2年目であるが、薬剤を併用した化学放射線同時併用療法の安全性にも危惧が示され、確認のための予備試験を行うこととした。そのため、当初の予定より臨床試験の実施が遅れ、2年目の登録患者集積が大幅に遅れた。2年目後半からはIRBの承認を受けた施設から、本格的臨床試験を開始すると共に、付随課題の研究を平行して行った。本年度は3年目にあたり、2年目の課題を引き続き研究し、結果を得ることとした。本年度の研究方法は以下のように要約できる。

1) 臨床試験に適した患者があれば、臨床試験に参加して貰うように積極的に働きかける。

2) 臨床試験に不随する研究課題としては、子宮頸癌のリンパ節転移発生の機序解明や、リンパ節転移発生の危険性が高い患者の選別、再発時の至適な治療法の開発、扁平上皮癌以外の組織型における病態、正常組織の放射線障害予防又は軽減、等の研究がある。この課題に対する本年度の研究方法は以下のように要約できる。

(1) 子宮頸癌以外の婦人科疾患でも、骨盤部術後予後因子に悪い患者や再発癌患者に、本法以外の化学療法や放射線療法を行う。各種薬剤による副作用の出現頻度や、放射線と併用した場合の副作用を、これらの結果から推測することが可能である。本試験ではシスプラチンと放射線を同時併用するが、その他の化学療法についても再考する可能性がある。

(2) 術前化学療法(NAC)が本邦では広く行われている。術後照射の有用性との比較も必要な治療法である。分担研究者もこの治療法を積極的に行っており、この治療法とリンパ節転移、予後改善、等についてさらに文献的考察を行う。

(3) 子宮がんのリンパ節転移に関連する因子を各種の方法で検討し、子宮頸癌における機序や治療法を考える上での資料とする。

(4) 子宮頸癌スクリーニングにおいて、本邦では液状検体を用いた細胞診標本の信頼性およ

びHPV検出の有用性が不明である。そこで、その有用性を明らかにすることを試みる。さらに、HPV感染と子宮頸部病変の有無・進行について年齢との関連についても解析する。

(5) 子宮頸癌の予後に関連する各種遺伝子変異や発現を検討し、本研究における予後推定に役立つか否か検討する。

(6) 正常組織の障害を軽減あるいは予防できれば、術後照射も安全に施行できる。そのため、患者毎に異なることが予測される正常組織の放射線感受性を、容易に同定できる方法の開発を進める。

(倫理面への配慮)

リンパ節転移陽性患者は術後照射を行っても予後は極めて悪い。単一施設からの幾つかの報告では、術後照射群と無治療経過観察群の予後は同一とされている。術後照射が予後を改善できない理由は、リンパ節転移陽性患者では遠隔転移が多く発生し、骨盤部の術後照射では予防できないことに起因すると考えられる。したがって、本試験では全ての患者に、現在最も有効とされている全身化学療法を行う。また、局所再発は嚴重な経過観察で早期に発見し、適切な治療を行って根治を目指す。以上の点から、本試験は倫理的に問題はないと考えられる。万が一、臨床試験遂行中に随時行われる解析で、少しでも患者の不利益が推測された場合、この臨床試験を中止する。

本臨床研究はヘルシンキ宣言に規定された倫理的原則を遵守して行うものとする。「被検者への説明と同意」に関しては本臨床試験への参加に先立ち、担当者が説明文やその他の適切な資料を用いて十分に説明し、臨床研究への参加について、自由意思による同意を文章で取得する。

本臨床研究は実施計画書を遵守し行うものとし、実施計画書、被検者への同意説明書については、参加施設の倫理委員会の承認を得るものとする。被検者の権利、安全および福祉が最も重要視される問題であり、科学および社会の利益より優先されねばならない。また、本臨床試験を通じて得られた被検者に関する全ての情報が、被検者個人のプライバシーにかかわるものであることから、刑法に規定される各要件により、その保護に関して必要な処置を講ずるものとする。したがって、被検者の表記は本研究用被検者番号を用いることとする。

C D. 研究結果と考察

1) 臨床試験の経過

本年度は研究3年目であり、患者の登録を促進し患者の集積につとめるはずであった。当初、月に3-4例の登録を予定し、年間30-40例を期待していた。しかし、実際には月に1-2例の登録に留まり、予定数の半数以下の登録となった。その最大の理由は、患者が従来の治療を止めることに不安を感じ、臨床試験への登録に消極的なことであった。また、術前化学療法が割合広く行われており、術後の化学療法を躊躇する患者もあった。さらに、放射線治療部門には術後照射を行う前提で来院し、臨床試験の説明を出来ない状態になっていた。そのため、手術を行った婦人科医が積極的に臨床試験を推進しないと、本研究の遂行は極めて困難であった。今後は婦人医を中心に本研究を進めて、患者登録を増やしていく必要があり、主任研究者の交代が必要と考えられた。

2) 付随する研究課題

(1) 放射線治療における重要な課題の1つに放射線感受性がある。放射線感受性には腫瘍と正常組織の2つの因子があり、腫瘍制御と障害発生に関連する。本研究課題は術後照射による有害事象の発生を問題としているため、患者毎に正常組織の放射線感受性が分かれば、有害事象発生を避けることも可能となる。この目的から随伴研究として、線維芽細胞の放射線感受性を容易に同定する方法の開発を行った。

細胞の放射線感受性は損傷を受けたDNAの修復が大きく影響する。この機序にはATM遺伝子が関与し、ATM変異を簡便に検出する方法の開発が考えられる。DNA解析によりATM遺伝子変異を同定することは容易ではない。本研究では、細胞にG0/G1期で放射線照射を行い、カフェイン存在下で回復を起こさせて、その後、染色体変異出現率をFISH法で同定すると、変異の出現率が増幅されることを見いだした。ATM変異細胞は極めて高い変異細胞出現率となり、この頻度と細胞生存率が相関することを明らかにした。この方法を用いて、正常組織の放射線感受性と放射線治療の有害事象発生の関係を明らかにしていく予定である。

(2) 広汎子宮全摘術・骨盤内リンパ節郭清を行った子宮頸部腺扁平上皮癌(ASC)Ib1期24例

を対象として、臨床所見と予後について、腺癌(ADC)ならびに扁平上皮癌(SCC)と比較検討した。術後の病理学的検討では、リンパ節転移の頻度はASC:25.0%であり、ADC:15.9%、SCC:16.2%に比較してやや高頻度であった。脈管侵襲の陽性率はASC:50.0%、ADC:46.0%、SCC:53.2%であった。また、ASC全例の最長腫瘍径が40mm未満であったことから、Kaplan-Meier法によるIb1期症例全体の5年生存率を組織型別に比較した結果、ASC:84.4%、ADC:91.4% SCC:94.3%と、ASCで予後不良の傾向が認められたが、有意差はなかった。さらに、Ib1期のASC症例について、リンパ節転移陽性、脈管侵襲陽性、間質浸潤10mm以上、腫瘍径20mm以上のうち、いずれかが認められるものをhigh-risk群、すべてが認められないものをlow-risk群に分類して、両群間で予後を比較した。その結果、low-risk群の全8例が現在まで無病生存中であるのに対して、high-risk群の16例中5例(31.3%)に再発(骨盤内1例、肺転移3例、肝転移1例)を認めた。本研究の結果から、ASCの予後はADCと同様にSCCに比べて不良であることが示唆され、その予後改善のために治療法の個別化が必要と考えられた。しかし、ASCでもlow-risk群の予後は良好であり、補助療法を省略できる可能性が示唆された。

(3) 子宮頸癌は初期の段階で発見されれば病変を摘出することにより良好な治癒成績をおさめているものの、進行癌と診断された場合や再発癌においては治療に難渋しており、新しい作用機序に基づく治療戦略開発が望まれている。新たな子宮頸癌の分子標的治療戦略としてHPV18型のE6,E7遺伝子を標的としたsiRNAをデザインし、子宮頸癌由来培養細胞における細胞増殖抑制効果を観察した。HPVの塩基配列特異的なsiRNAはウイルス由来E7蛋白質の発現を抑制し、癌抑制遺伝子産物Rb蛋白質の発現を回復させ、老化を促し細胞増殖抑制効果を発揮する。さらにsiRNAとアテロコラーゲン複合体は腫瘍移植治療実験において腫瘍細胞の増殖を抑制したことから、子宮頸癌に対するあらたな分子標的治療の候補として臨床応用が期待される。

(4) ヒトゲノム計画の完了とともに、各種疾病の原因遺伝子の特定やその機能解析が加速度的に進められており、様々な遺伝子診断や分子標的治療への展開が期待されている。これを達成するための有力な手段として、近年注目され

ているのが遺伝子多型解析である。ヒトゲノム DNA は各個人ではほぼ共通であるが、我々の姿形や体質が少しずつ異なっているように、DNA の塩基配列には人により若干の相違がある。遺伝子多型(genetic polymorphism) とは、ある塩基の変化が人口の 1%以上の頻度で存在するものと定義されており、通常末梢血リンパ球(germ line) DNA を用いて解析される。これまでに高血圧、糖尿病などの生活習慣病、膠原病や癌などの慢性難治性疾患において、発症関連遺伝子の SNP 解析が行われ、各疾患の予防や予後管理に役立てられてきている。

(5) 子宮頸癌の治療成績を改善するためには、予後不良な患者を選別して、適切な治療を行うことである。本研究課題は 3 つの課題を検討した。(i)子宮頸部扁平上皮癌では、BED10 の増加と予後との関連は否定的であるが、局所進行子宮頸部腺癌では両者に相関関係が認められた。十分な投与線量により頸部腺癌の生存率は扁平上皮癌と同等の結果が示唆される。(ii)CPT-11 と NDP の併用化学療法は、重篤な副作用のない安全な治療法であり、十分な奏効率が得られた。予後不良で放射線の効果が低いとされる腺癌での奏効率が大きく評価される。(iii)転移リンパ節の解析から、体癌におけるセンチネルリンパ節は内腸骨節と閉鎖節であると結論した。臨床進行期 I 期、高分化型類内膜腺癌、筋層浸潤がごくわずかである場合には、PAN と PLN 郭清を内腸骨節と閉鎖節の郭清で代用することが可能かもしれない。

E. 結 論

本年度の研究成果による結論は以下のように要約できる。

(1) 子宮頸癌術後リンパ節転移患者に対する至適後療法を開発するため、術後照射の有用性を検討する臨床試験に患者登録を行ったが、十分な成果を上げられなかった。
(2) 付随的研究として、i)正常組織細胞の放射線感受性に関する研究、ii)腺癌との比較からみた扁平上皮癌の特性、iii)婦人科腫瘍に対する新たな化学療法剤、iv)ヒト遺伝子多形と疾患の特性解析、v)術前化学療法の有用性、vi)早期癌の検出法の研究、を行った。

F. 健康被害情報

現在のところ報告すべき情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawata T, Ito H, Saito M, et al. Caffeine sensitizes nondividing human fibroblasts to X rays by inducing a high frequency of misrepair. *Radiat Res* 164(4):509-513, 2005.
2. Isobe K, Uno T, Ito H, et al. Weekly cisplatin administration cocurrent with radiation therapy for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Int J Clin Oncol* 10: 201-203, 2005.
3. Isobe K, Uno T, Ito H, et al. Preoperative chemotherapy and radiation therapy for squamous cell carcinoma of the maxillary sinus. *Jpn J Clin Oncol* 35(11):633-638, 2005.
4. Takiguchi Y, Uruma R, Ito H, et al. Phase I study of cisplatin and irinotecan combined with concurrent hyperfractionated accelerated thoracic radiotherapy for locally advanced non-small cell lung carcinoma. *Int J Clin Oncol* 10(4):418-424, 2005.
5. Uno T, Ito H, Isobe K, et al. Postoperative radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix. *Radiat Med* 24(2):91-97, 2006.
6. Isobe K, Uno T, Ito H, et al. Extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type. *Cancer* 106(3):609-15, 2006.
7. 宇野 隆、磯部公一、伊東久夫：ハイリスク症例に対する後療法には adjuvant radiotherapy か adjuvant chemotherapy か。産婦人科の世界、57:427-431, 2005.
8. 伊東久夫、宇野 隆、川田哲也：J.女性生殖器。放射線治療グリーンマニュアル(久保敦司、土器屋卓志、安藤 裕編)、金原出版、東京、pp238-259, 2005
9. 安田進太郎・小島淳美・西村隆一郎、他：子宮頸部の腺扁平上皮癌の予後に関する臨床的検討—腺癌ならびに扁平上皮癌との比較— *日本婦人科腫瘍学会雑誌* 23(2): 135-140, 2005
10. Yamaguchi S, Tsuda H, Nishimura R, et al. Photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Oncol* 69:110-116, 2005
11. 武木田茂樹・前野陽子・西村隆一郎、他：I b2、II b 期の子宮頸部扁平上皮癌に対する neoadjuvant chemotherapy (NAC)

- followed by radical hysterectomy -賛成の立場から 産婦人科の世界 57(6):P19-27, 2005.
12. Akiba Y, Kubushiro K, Fujii T, et al. Is laser conization adequate for therapeutic excision of adenocarcinoma in situ of the uterine cervix? *J Obstet Gynecol* 31(3): 252-256, 2005.
 13. Fujii T, Matsumoto N, Saito M, et al. Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 14:103-108, 2005.
 14. Ueda H, Watanabe Y, et al. Microsatellite status and immuno-histochemical features of ovarian clear-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 25:2785-8,2005
 15. Watanabe Y, Nakai H, et al. Carboplatin hypersensitivity induced by low-dose paclitaxel / carboplatin in multiple platinum-treated patients with recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 15:224-7,2005.
 16. Watanabe Y, Nakai H, Hoshiai H. The effect of granisetron on in vivo metabolism of doxorubicin, irrinotecan and etoposide. *Curr Med Res Opin.* 21:363-8,2005.
 17. Watanabe Y, Nakai H, et al. Evaluation of weekly low-dose paclitaxel and carboplatin treatment for patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 96:323-9,2005.
 18. Ueda M, Hung YC, Terai Y, et al. Glutathione-S-transferase and p53 polymorphisms in cervical carcinogenesis. *Gynecol. Oncol.,* 96:736-740 (2005).
 19. Ueda M, Hung YC, Terai Y, et al.: Fas gene promoter-670 polymorphism (A/G) is associated with cervical carcinogenesis. *Gynecol. Oncol.,* 98: 129-133 (2005).
 20. Ueda M, Terai Y, Kanda K, et al. Germ-line polymorphism of p53 codon 72 in gynecological cancer. *Gynecol. Oncol.,* 100:173-178 (2006).
 21. Ueda M, Hung YC, Terai Y, et al. HER-2 codon 655 polymorphism in cervical carcinogenesis. *Int. J. Gynecol. Cancer,* 16:325-328 (2006).
 22. Ueda M, Terai Y, Kanda K, et al. Fas gene promoter -670 polymorphism in gynecological cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer,* in press (2006).
 23. Jobo T, Sato R, Arai T, Tamura T, Watanabe J, Kuramoto H. Lymph node pathway in the spread of endometrial carcinoma. *Eur J Gynaec Oncol,* 2005; 26: 167-169
 24. Tsunoda S, Jobo T, Arai, et al. Small-cell carcinoma of the uterine cervix: a clinico-pathologic study of 11 cases. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 295-300
 25. Katsumata N, Noda K, Jobo T, et al. Phase II trial of docetaxel in advanced or metastatic endometrial cancer. A Japanese Cooperative Study. *Br J Cancer* 2005; 93: 999-1004
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
1. 特許取得
特になし。
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。

1. 線維芽細胞の放射線感受性に関する検討

主任研究者 伊東久夫 千葉大学大学院医学研究院放射線医学
研究協力者 川田哲也 千葉大学大学院医学研究院放射線医学

研究要旨

放射線治療における重要な課題の1つに放射線感受性がある。放射線感受性には腫瘍と正常組織の2つの因子があり、腫瘍制御と障害発生に関連する。本研究課題は術後照射による有害事象の発生を問題としているため、患者毎に正常組織の放射線感受性が分かれば、有害事象発生を避けることも可能となる。この目的から随伴研究として、線維芽細胞の放射線感受性を容易に同定する方法の開発を行った。

細胞の放射線感受性は損傷を受けたDNAの修復が大きく影響する。この機序にはATM遺伝子が関与し、ATM変異を簡便に検出する方法の開発が考えられる。DNA解析によりATM遺伝子変異を同定することは容易ではない。本研究では、細胞にG0/G1期で放射線照射を行い、カフェイン存在下で回復を起こさせて、その後、染色体変異出現率をFISH法で同定すると、変異の出現率が増幅されることを見いだした。ATM変異細胞は極め高い変異細胞出現率となり、この頻度と細胞生存率が相関することを明らかにした。この方法を用いて、正常組織の放射線感受性と放射線治療の有害事象発生との関係を明らかにしていく予定である。

A. 研究目的

放射線治療はがんの治療には必須の治療法の1つとなってきた。しかし、他の治療法と同様に、放射線治療でも有害事象の発生が問題となり、治療を躊躇することもある。術後照射の場合は、放射線治療単独に比べて特に有害事象の発生が多くなる。本研究課題は子宮頸癌術後照射の有用性を検討することであるが、もう1つの重要な課題は術後照射による有害事象の発生を回避することである。術後照射を行っても有害事象が発生しなければ、術後照射を行うこと自体あまり問題ではなくなる。

放射線による有害事象の発生は、照射線量に応じて確率で示される。すなわち、同様の治療を行っても、有害事象の発生しない群と発生する群があり、その確率が線量と共に増加する。有害事象の発生しやすいヒトは、正常組織の放射線感受性が高く、障害を受けやすいことが推測される。

放射線は細胞のDNAに損傷を与える。通常はDNA損傷が修復され、再び元の状態に戻るとされている。しかし、修復が上手くいかないとDNAに損傷が残り、細胞分裂を繰り返す間

に、DNA損傷が発現して細胞死になるとされている。現在、DNA損傷の修復に関連する各種遺伝子の解析がさかんに行われているが、従来から、損傷修復遺伝子としてATMが知られている。ATMはAT (ataxia telangiectasia 毛細血管拡張性運動失調症) から分離されて遺伝子である。この遺伝子に変異があると、放射線によるDNA損傷を修復できないため、放射線感受性が著しく高くなる。しかし、劣性遺伝のため、homozygousの場合に発症するが、heterozygousでは健常人と識別できない。健常人と思われるヒトにこの遺伝子が存在するかどうかは、DNA解析を行うと分かるが、ATMは大きな遺伝子で、変異部位も多く、DNA解析から変異を検出するには多くの労力を必要とする。

本研究では、ATMの変異を容易に検出する方法の開発を行うこととした。

B. 研究方法

1. 各種細胞のG0期における放射線感受性と損傷修復におよぼすカフェインの影響
ヒト正常線維芽細胞、ヒト Ataxia Te-

langiectasia 由来の線維芽を 10%の血清を含む培地で培養容器 (T25)に細胞が密に接触する状態になるまで培養する。線維芽細胞は、細胞同士の接触により細胞周期を G0 に止めることが可能である。その段階で 0.1%の血清しか含まない低栄養培養液に交換し培養を続け G0/G1 期の細胞集団を得る。これら細胞周期を G0/G1 にそろえた細胞に X 線照射を行い (1-8Gy)、24 時間 37°C で培養する。また、同時に放射線照射後にカフェインが 1-10mM の濃度で含む培地に置き換えた細胞を用意し、カフェイン存在下、37°C で 24 時間修復する時間を与える。24 時間培養後、トリプシンで細胞を遊離させ、コロニー法により細胞生存率を決定する。これによりカフェインの有無が G0 期の損傷修復に与える影響を測定することができる。本実験は最低 3 回行う。

2. FISH 法を用いた染色体異常解析

1. の実験と同様に G0/G1 期の線維芽細胞 X 線照射後、24 時間の修復時間を与えた後、トリプシン処理を行い、細胞を遊離させ別の大きめの培養容器 (T75) に継代し培養する。継代後、24 時間後から細胞は M 期に到達しはじめるため、細胞分裂阻害剤であるコルセミドを投与し、分裂期で細胞周期を止め、染色体解析に必要な M 期細胞を採取する。採取した M 期染色体は低浸透圧の塩化カリウム溶液で処理後、カルノイ溶液で固定と洗浄を行いスライドグラスに細胞を滴下する。スライドを乾燥後に 72°C に加熱した 70%ホルマミドで 2 分間作用させ DNA 2 本鎖を解離させた後、70%、85%、100%のエタノールで 2 分間脱水する。前もって 72°C で 2 本鎖を解離させておいた 1, 2, 5 番染色体に対応する Probe を滴下しカバーグラスで覆い 37°C で 24 時間ハイブリダイズさせる。その後、スライドを NP-40 溶液にて洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察し、染色体異常頻度を各々の細胞で線量およびカフェイン濃度を変えて測定する。転座(translocation), 欠失(deletion), より複雑な染色体異常である complex type exchange の線量生成関係をグラフにプロットし細胞間の感受性を比較する。本実験も最低 2 回は繰り返す必要があり、1, 2 を行うのに 1 年を要すると考えている。

C. 研究成績

1. 図 1 は 3 種の線維芽細胞 (正常線維芽細胞、

DNA 解析と遺伝的家系から heterozygous が確認されたヒト由来の線維芽細胞、症状を発症して DNA 解析から homozygous が確認された患者由来の線維芽細胞) の放射線照射後の生存曲線である。AT 患者由来の細胞は極めて高い放射線感受性を示し、生存曲線に肩がほとんど認められない。健康人と識別できない heterozygous のヒトの場合、homozygous な AT 患者に比べると、放射線感受性は低くなった。しかし、正常人と比べると、明らかに高い放射線感受性を示した。すなわち、heterozygous のヒトは自覚していないが、正常人に比べると高い放射線感受性を示す。

2. 図 2 は染色体 1, 3 に対する抗体を用いて FISH 法を行った場合である。染色体 2, 3 の両者共に転位と segment が認められる。これらの染色体変異が認められた細胞の頻度を検討した。
3. 図 3 は正常なヒトと heterozygous なヒト由来の線維芽細胞を、G0/G1 期にして 6 Gy 照射後、FISH 法で染色体変異細胞の出現頻度を見たものである。正常細胞に比べて heterozygous 細胞は、変異の出現頻度が約 2 倍になるが、頻度自体が小さいため、差がそれ程明瞭ではない。同一細胞をカフェインの存在かで PLD 修復を起こさせると、変異細胞の出現率が増加し、両者の差が明瞭になる。そのため、診断が容易となる。
4. 図 4 は細胞生存率と FISH 法により検討した染色体変異細胞出現頻度の相関である。両者の間には極めて良好な相関が見られ、FISH 法による染色体変異細胞出現頻度は、細胞生存、すなわち、放射線感受性を定量するための良好な指標となる。

D. 考察

放射線治療の重要な課題の 1 つに、腫瘍や臓器・組織の放射線感受性がある。同一の放射線量を照射しても、その反応はいろいろである。放射線感受性は現状では一般的に、照射が終了しないと判定できない。この点は放射線治療における最大の問題点とされている。

腫瘍の治療に放射線を用いる場合、腫瘍の放射線感受性は根治のために重要である。一方、正常組織の放射線感受性は、放射線治療の有害事象を推測する上で重要である。放射線治療は照射線量を増加すれば、多くのがんで局所制御

が得られると推測されている。しかし、正常組織の有害事象が発生を避けるため、安全と思われる線量で治療を終了する。患者毎に正常組織の感受性が治療開始直後に判明していれば、多くの線量を照射して、腫瘍の制御率を改善できる患者、あるいは、少ない線量で有害事象発生を避ける患者、というようにグループ化が可能となる。しかし、現在のところ、信頼すべき正常組織放射線感受性予測法がない。

組織・臓器の放射線感受性に関連する因子は現在ほとんど分かっていない。放射線による細胞死は、大部分が DNA の損傷に由来すると考えられている。通常の放射線で損傷された DNA は、大部分が修復されると考えられている。放射線が DNA に損傷を与える頻度は、無作為に起こる確率的現象で、全ての細胞に同様に発生すると考えられる。したがって、放射線による細胞致死効果は、損傷を受けた細胞における修復能力に依存する可能性が高い。放射線で損傷された DNA を修復する遺伝子の代表は、ATM である。ATM に変異が起これば AT が発症するが、劣性遺伝病で、heterozygous では健常人と区別することが出来ない。Homozygous で発症した AT 患者は勿論であるが、健常人と区別できない heterozygous なヒトも放射線感受性が高くなる。ATM 遺伝子は大きな遺伝子で、DNA 変異は多くの部位で発生するため、heterozygous はヒトで DNA 変異を同定することは、大変煩雑な手法を必要とする。したがって、この heterozygous なヒトを簡便に検出する方法の開発は、正常組織の放射線感受性を予測ために役立つ可能性がある。放射線照射線維芽細胞の染色体変異を FISH 法で同定する方法は、極めて簡便で、大変感度の良い方法である。次の段階として、FISH のよる染色体変異細胞出現率と、放射線有害事象発生率および重症度の関連を明らかにする必要がある。だが、本邦では欧米に比べて AT 患者が少ないとされており、実際に heterozygous はヒトがどの位の割合で存在するのか不明である。

E. 結論

正常、ATM の変異が heterozygous、homozygous なヒト由来の 3 種の線維芽細胞の放射線感受性は有意に異なる。この ATM 変異を簡便に検出する方法として、本研究では G0/G1 期の細胞を照射し、カフェインの存在下で PLD 回復を起こさせた。その結果、FISH 法

で検出できる染色体変異細胞数が増加し、正常と heterozygous の間で明らかな差を認めた。FISH 法よる変異細胞出現率と、放射線による生存率の間に良好な相関関係が見られた。そのため、この方法よる線維芽細胞放射線感受性予測試験は、臨床的に役立つ可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uno T, Ito H, Isobe K, et al. (2005) Postoperative pelvic radiotherapy for cervical cancer patients with positive parametrial invasion. *Gynecol Oncol* 96:335-340.
2. Mitsuhashi A, Uno T, Ito H, et al. (2005) Phase 1 study of daily cisplatin and concurrent radiotherapy in patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 96:194-197.
3. Kawata T, Ito H, Saito M, et al. (2005) Caffeine sensitizes nondividing human fibroblasts to X rays by inducing a high frequency of misrepair. *Radiat Res* 164(4):509-513.
4. Isobe K, Uno T, Ito H, et al. (2005) Weekly cisplatin administration concurrent with radiation therapy for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Int J Clin Oncol* 10: 201-203.
5. Isobe K, Uno T, Ito H, et al. (2005) Preoperative chemotherapy and radiation therapy for squamous cell carcinoma of the maxillary sinus. *Jpn J Clin Oncol* 35(11):633-638.
6. Shigematsu N, Shinmoto H, Ito H, et al. (2005) Successful pregnancy and normal delivery after whole cranio-spinal irradiation in two patients. *Anticancer Res.* 25(5):3481-7.
7. Nabeya Y, Ochiai T, Ito H, et al. (2005) Neoadjuvant chemoradiotherapy followed by esophagectomy for initially respectable squamous cell carcinoma of the esophagus with multiple lymph node metastasis. *Dis Esophagus* 18:388-397.

8. Takiguchi Y, Uruma R, Ito H, et al. (2005) Phase I study of cisplatin and irinotecan combined with concurrent hyperfractionated accelerated thoracic radiotherapy for locally advanced non-small cell lung carcinoma. *Int J Clin Oncol* 10(4):418-424.
9. Isobe K, Uno T, Ito H, et al. (2006) Extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type. *Cancer* 106(3):609-15.
10. 宇野 隆、磯部公一、伊東久夫 (2005) : ハイリスク症例に対する後療法には adjuvant radiotherapy か adjuvant chemotherapy か。産婦人科の世界、57:427-431.
11. 伊東久夫、宇野 隆、川田哲也 (2005) : J. 女性生殖器。放射線治療グリーンマニュアル(久保敦司、土器屋卓志、安藤 裕編)、金原出版、東京、pp238-259
12. 伊東久夫 (2005) : 1,3,4,5,6,7 章、放射線治療。子宮がん・卵巣癌全書(野澤史朗、青木大輔編)、法研、東京、pp90-91、172-176、310-315、336-342、386-388

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

I. 参考文献

Natarajan AT, Meyers M. Chromosomal radiosensitivity of ataxia telangiectasia cells at different cell cycle stages: *Hum. Genet.* 52 127-132. 1979.

Savitsky K, Bar-Shira A, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase: *Science.* 268 1749-1753. 1995.

Painter RB, Young BR, et al. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 7315-7317. 1980.

Foray N, Priestley A, et al. Hypersensitivity of ataxia

telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks: *Int. J. Radiat. Biol.* 72 271-283. 1997.

Sasai K, Evans JW, et al. Prediction of human cell radiosensitivity: Comparison of clonogenic assay with chromosome aberrations scored using premature chromosome condensation with fluorescence *in situ* hybridization: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 30 1127-1132. 1994.

Kühne M, Riballo E, et al. A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity: *Cancer Res.* 64 500-508. 2004.

Kawata T, Ito H, et al. Radiation-induced chromosome aberrations in ataxia telangiectasia cells: High frequency of deletions and misrejoining detected by fluorescence *in situ* hybridization: *Radiat. Res.* 159 597-603. 2003.

Loucas BD, Cornforth MN. Evidence that unrejoined DNA double-strand breaks are not predominantly responsible for chromosomal radiosensitivity of AT fibroblasts: *Radiat. Res.* 162 554-565. 2004.

Sarkaria JN, Eshleman JS. ATM as a target for novel radiosensitizers: *Semin. Radiat. Oncol.* 11 316-327. 2001.

Jha MN, Bamberg JR, et al. Caffeine eliminates gamma-ray-induced G₂-phase delay in human tumor cells but not in normal cells: *Radiat. Res.* 157 26-31. 2002.

Kawata T, Durante M, et al. Dose-response of initial G₂-chromatid breaks induced in normal human fibroblasts by heavy ions: *Int. J. Radiat. Biol.* 77 165-174. 2001.

Kawata T, Durante M, et al. Rejoining of isochromatid breaks induced by heavy ions in G₂-phase normal human fibroblasts: *Radiat. Res.* 156 598-602. 2001.

Wang H, Wang X, et al. Caffeine could not efficiently sensitize homologous recombination repair-deficient cells to ionizing radiation-induced killing: *Radiat. Res.* 159 420-425. 2003.

資料1

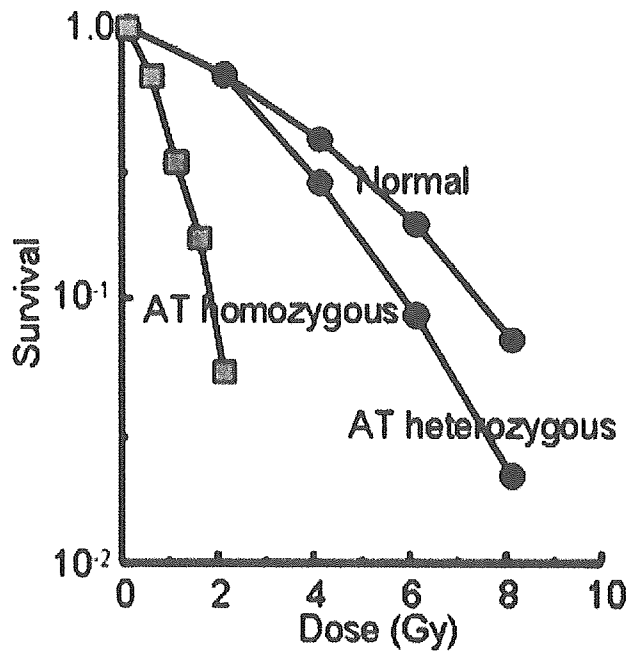


図1. 正常, AT heterozygous, AT homozygousな線維芽細胞の放射線感受性。コニー法による生存曲線。

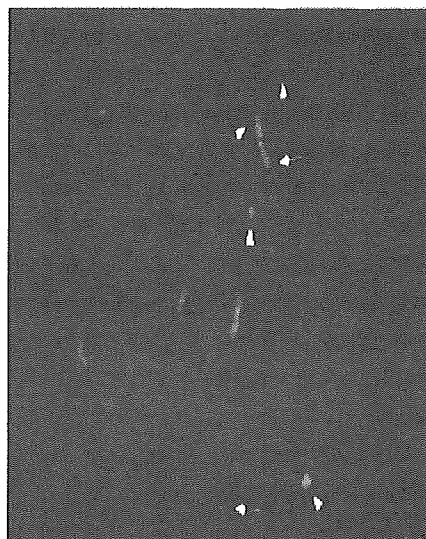


図2. 染色体1, 3に対する包帯によるFISH法。変異染色体が容易に検出できる。

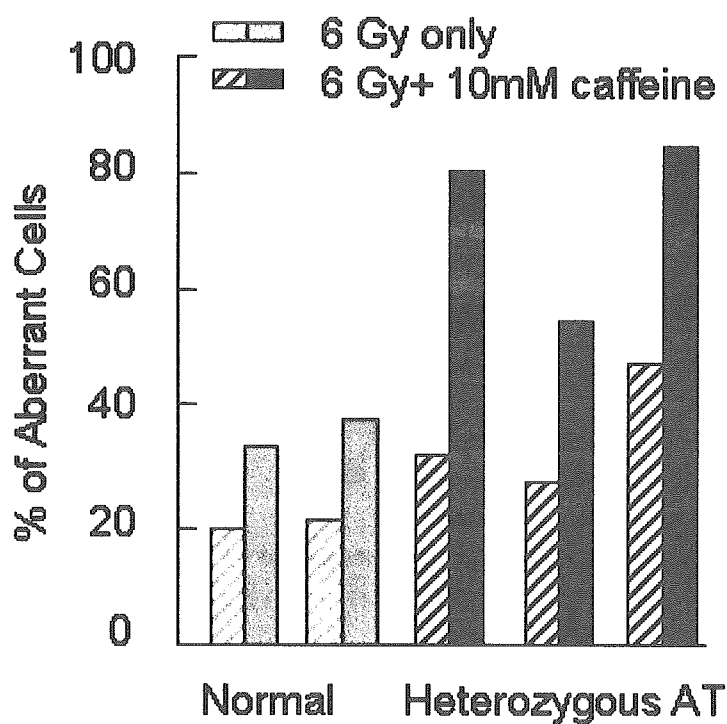


図3. 染色体1, 3に対する抗体によるFISH法。6 Gy照射単独とカフェイン併用PDL回復後の変異染色体出現細胞頻度。

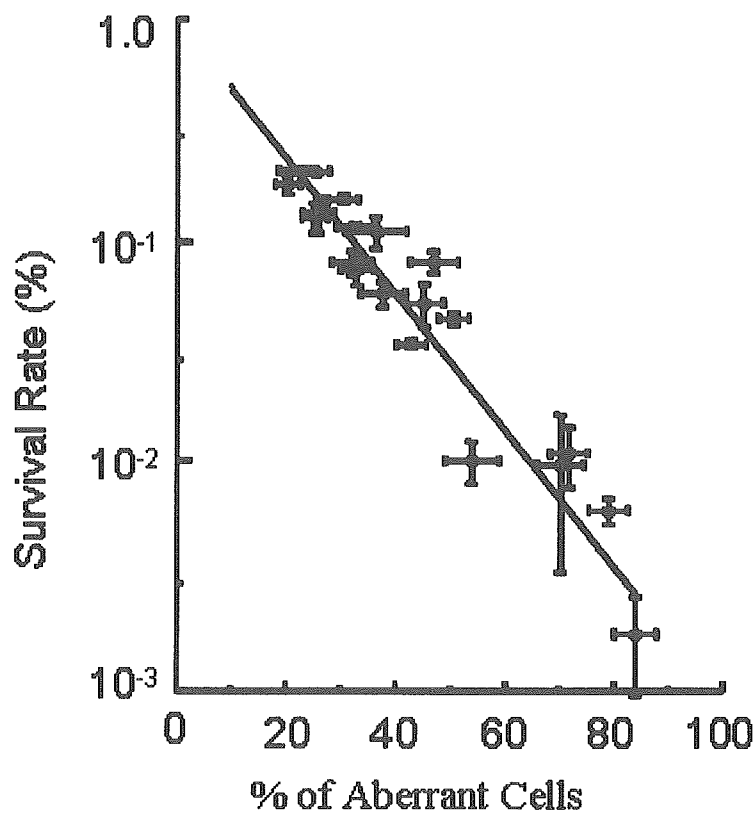


図4. 細胞生存率とFISHによる染色体変異出現細胞頻度の相関。

2. 子宮頸部の腺扁平上皮癌の予後に関する臨床的検討
—腺癌ならびに扁平上皮癌との比較—

分担研究者 西村隆一郎 兵庫県立成人病センター婦人科

研究要旨

広汎子宮全摘術・骨盤内リンパ節郭清を行った子宮頸部腺扁平上皮癌(ASC)Ib1期24例を対象として、臨床所見と予後について、腺癌(ADC)ならびに扁平上皮癌(SCC)と比較検討した。術後の病理学的検討では、リンパ節転移の頻度はASC:25.0%であり、ADC:15.9%、SCC:16.2%に比較してやや高頻度であった。脈管侵襲の陽性率はASC:50.0%、ADC:46.0%、SCC:53.2%であった。また、ASC全例の最長腫瘍径が40mm未満であったことから、Kaplan-Meier法によるIb1期症例全体の5年生存率を組織型別に比較した結果、ASC:84.4%、ADC:91.4%、SCC:94.3%と、ASCで予後不良の傾向が認められたが、有意差はなかった。さらに、Ib1期のASC症例について、リンパ節転移陽性、脈管侵襲陽性、間質浸潤10mm以上、腫瘍径20mm以上のうち、いずれかが認められるものをhigh-risk群、すべてが認められないものをlow-risk群に分類して、両群間で予後を比較した。その結果、low-risk群の全8例が現在まで無病生存中であるのに対して、high-risk群の16例中5例(31.3%)に再発(骨盤内1例、肺転移3例、肝転移1例)を認めた。本研究の結果から、ASCの予後はADCと同様にSCCに比べて不良であることが示唆され、その予後改善のために治療法の個別化が必要と考えられた。しかし、ASCでもlow-risk群の予後は良好であり、補助療法を省略できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

最近、頸部腺癌(ADC)の発生率は増加しており、しかも若年化傾向にある。さらに、早期発見の困難さに加えて、放射線療法や化学療法に対する感受性の低さから、ADCの予後が扁平上皮癌(SCC)に比べて不良であることも明らかとなり、治療の個別化が求められている²⁾。一方、組織学的に扁平上皮成分と腺成分の両者が混在する頸部の腺扁平上皮癌(adenosquamous cell carcinoma, ASC)はADCに亜分類され、子宮頸癌全体から見ると5-10%を占め、ADCの中では20-30%を占める。ASCの臨床像はADCとして一括して検討される場合がほとんどであり、その独立した予後などはよく知られていない。そこで今回、当科で経験したASCの臨床所見と予後について、ADCならびにSCCとの間で比較検討を行った。

B. 研究方法

当科では1990年1月から2002年12月までの間に39例(Ia期6例、Ib期26例、IIb期6例、IIIb期1例、30-73才)のASC症例を経験した(表1)。今回の検討では、そのうち、もっとも症例数が多く、根治術として広汎子宮全摘術ならびに骨盤内リンパ節郭清を行ったIb期の24例(表2)を対象として、リンパ節転移、脈管侵襲の有無、間質浸潤の深さ、などの病理学的リスク因子を調べた。さらに、術後の再発の有無・部位、および予後についてKaplan-Meier法による生存率で検討した。24例のIb期ASC症例すべての腫瘍径が4cm未満のIb1期であったところから、比較対照群としては、同時期に同様の根治術を行った、ADC Ib1期63例とSCC Ib1期216例を対象としてASCとの比較検討を行った。また、Ib1期のASC症例について、リンパ節転移陽性、脈管侵襲陽性、間質浸潤10mm以上に加えて、腫瘍径20mm以上をリスク因子として、いずれかの条件に該当するものをhigh-risk群、いずれも認められないものを

low-risk 群に分類して、両群の予後を比較した(表 3)。

C. 研究成績

当科では、頸癌術後の病理学的所見のうち、リンパ節転移陽性、脈管侵襲陽性、10mm 以上の間質浸潤、断端陽性などのリスク因子のいずれかを認めるものに対しては、術後に何らかの補助療法を行うことを基本方針としている。その結果、本研究の対象とした ASC Ib1 期 24 症例のうちリスク因子が認められた 16 例に補助療法が追加された。その内訳としては、術前化学療法：4 例、術後化学療法：3 例、術後放射線療法：2 例、術後化学療法併用放射線療法：2 例、術後化学療法+放射線療法：9 例となっている。術前化学療法としては、CPT-11

(60mg/m²) +CDDP (60mg/m²) や CPT-11 (100mg/m²) +MMC (10mg/m²) が投与されており、術後化学療法としては、CAP 療法や EP 療法などが施行された。また、術後化学療法併用放射線療法としては、対外照射 45-50.4Gy に併用して Nedaplatin

(30mg/m²/week) x4 が投与された。なお、本人の希望により、リスク因子の認められた 1 例には補助療法を施行せず、認められなかった 1 例に対しては術後化学療法併用放射線療法を施行した(表 3)。次に、Ib1 期症例について、術後の病理学的リスク因子を各組織型別に比較した。リンパ節転移の頻度は ASC:25.0%(6/24) で、ADC:15.9%(10/63)、SCC:16.2%(35/216) と、ASC でやや高頻度であったが、有意差は認められなかった。脈管侵襲の陽性率は、ASC:50.0%、ADC:46.0%、SCC:53.2%で、各組織別の有意差は認められなかった(表 2)。また、ASC 24 例の腫瘍径と間質浸潤の深さを表 4 に示したが、すべての症例において腫瘍径は 40mm 未満であり、Ib1 期に分類された。

Kaplan-Meier 法による各組織型別に見た Ib1 期症例全体の 5 年生存率は、ASC: 84.4%、ADC:91.4% SCC:94.3%と、ASC で予後不良の傾向が認められたが、有意差はなかった(図 1)。さらに、Ib1 期の ASC 症例について、前記したようなリスク因子に基づいて分類して予後を比較検討した結果、high-risk 群に分類された 16 例中 5 例 (31.3%) に再発が認められたが、low-risk 群に分類された 8 例のすべてが現在まで無病生存中となった。Kaplan-Meier 法による high-risk 群と low-risk 群の生存率曲線を図

2 に示したが、症例数が少ないために有意差は認められていない。しかし、リンパ節転移の有無による生存率曲線の比較では図 3 に示すように陽性例で有意に予後不良となった。また、再発した ASC5 例の病巣部位は、骨盤内 1 例、肺転移 3 例、肝転移 1 例であり、現在までに、うち 3 例が死亡し、1 例が有病生存中、1 例が無病生存中である(表 5)。

D. 考察

ASC の予後を ADC と区別して検討した過去の報告は少なく、その評価も一定したものではない。Harrison ら³⁾は Ib-IIa 期の ASC 症例の予後は SCC や ADC と比して予後不良ではないとしている。Yazigi ら⁴⁾も 417 例の ADC 症例の検討で、分化度や組織型(小細胞腺癌を除いて)は独立した予後不良因子ではないとし、さらに、ASC であることは進行症例でもリスク因子となっていないと報告した。Alfsen ら⁵⁾も ASC 症例 Ib 期の予後やリンパ節転移率は SCC との差はないとしている。一方、Gallup ら⁶⁾は 20 人の ASC 症例の予後を ADC や SCC と比較した結果、ASC 群では Ib 期が 75%ともっとも多く含まれていたにもかかわらず、2-8 年間の調整生存率では、ASC 群 20%、ADC 群 80%、SCC 群 83%と大きな有意差をもって予後不良とした。Saigo ら⁷⁾も ASC の予後は臨床期に相関しており、腫瘍サイズの大きいものほどハイリスクであるとし、ADC のなかでも予後不良な粘液性腺癌と同程度にハイリスクであるとした。さらに、Look ら⁸⁾は Ib 期の頸癌症例に対する米国 GOG study において、ASC、ADC、SCC の 3 者を比較し、年齢、リンパ節転移率、間質浸潤の深さ、子宮腫大、断端陽性率、傍結合織浸潤などにおける組織型別の有意差はなかったが、分化度や脈管浸潤の点においては有意差があったとし、根治術後の無病期間の点では有意差のないものの、生存率の点で ASC が有意に予後不良であったと報告している。また、Schorge らの報告⁹⁾でも、早期の頸部腺癌におけるリスク因子の一つとして ASC 組織型が挙げられている。今回の検討では、対象とした Ib1 期症例においても、ASC 組織型であることは ADC や SCC に比べて、有意差はないもののリンパ節転移率が高く、5 年生存率も不良である傾向が認められた。さらに、II 期以上の進行 ASC 症例の予後については、SCC はもとより ADC に比較しても不良であるとする報告が多

いが、当科での IIb 期 6 例のうち 2 例は再発死亡、IIIb 期の 1 例も死亡しており、やはり予後不良であった。

最近、ASC の予後を ADC (純粋型) や SCC と比較して検討した二つの研究が報告された。Farley ら¹⁰⁾は ADC 185 例と ASC 88 例の両群での予後比較を行い、I 期症例の 5 年生存率では、ASC 群 86%、ADC 群 89%と有意差を認めなかったが、病期の進行とともに大きな差が生じ、II、III、IV 期での 5 年生存率はそれぞれ ASC 群 : 38%、0%、0%、ADC 群 : 80%、32%、14%と ASC の予後は ADC に比べても不良であったと報告している。そして、ASC 全体の 5 年生存率でも 65%と、ADC の 83%に比べ有意に低率であったことから、ASC 組織型は独立した予後不良因子であると結論した。一方、Lea ら¹¹⁾は、米国 GOG プロトコル 92 と 109 による早期頸癌に対する補助療法のランダム化試験に登録された 230 例を対象として、術後の病理学的リスク因子 (リンパ節転移、1/3 以上の間質浸潤、脈管浸潤、断端陽性) を有さない Ib1 期症例を low-risk 群として、その予後を多変量解析で検討した。その結果、ADC 群 230 例の全体から見た 5 年無病生存率は 89%と良好なものであったが、ASC 群単独で見た 5 年生存率は 79%と不良であり、ASC 組織型は唯一の独立した再発リスク因子と判定された。すなわち、前述の Farley らの報告では予後不良ではないとされた low-risk 群においても、ASC 組織型であることは予後不良であるという結論となった。

今回の検討では、Ib1 期 ASC 症例をリンパ節転移陽性、脈管侵襲陽性、間質浸潤 10mm 以上に加えて、腫瘍径 20mm 以上をリスク因子として、いずれかの条件に該当するものを high-risk 群、すべてが陰性のものを low-risk 群に分類した。その結果、症例数が少ないため有意差は明らかとはならなかったが、両群の再発率には大きな差異が認められた。すなわち、low-risk 群に分類された ASC 症例 Ib1 期の 8 例は、1 例を除いて術後補助療法を受けていないが、すべて現在まで無病生存中である。一方、high-risk 群に分類された 16 例のうち 15 例が何らかの補助療法を受けたにもかかわらず、そのうち 5 例が再発を見ている (表 3)。これら再発 5 例のすべてが化学療法と放射線療法を受けていたが、骨盤内再発は 1 例のみで、4 例は遠隔転移 (肺 3 例、肝 1 例) であった (表 5)。一般に、ADC は SCC に比して遠隔再発を来しやすいとさ

れているが¹²⁾、ASC も同様な傾向を有することを示唆するものと思われる。ASC に扁平上皮癌が混在するところから、放射線療法の有効性を期待しがちであるが、新しいレジメンによる化学療法などの新しい治療戦略が必要であると思われる。さらに、リンパ節転移の有無による生存率曲線の比較で、陽性例が有意に予後不良となったことから、とくにリンパ節転移例に対する個別化が必要であると思われる。

E. 結論

本研究の結論として、ASC の予後は ADC と同様に SCC に比べて不良であることが示唆され、その予後改善のために有効な術前化学療法や術後補助療法の検討が必要と考えられる。しかし、ASC でも腫瘍径が 2cm 未満の Ib1 期で、術後の病理学的リスク因子を認めない症例に対しては補助療法が省略できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 安田進太郎・小島淳美・西村隆一郎、他：子宮頸部の腺扁平上皮癌の予後に関する臨床的検討—腺癌ならびに扁平上皮癌との比較— 日本婦人科腫瘍学会雑誌 Vol.23 No.2,P135-140,2005
2. Yamaguchi S, Tsuda H, Nishimura R, et al. Photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Oncol* 69:110-116, 2005
3. 武木田茂樹・前野陽子・西村隆一郎、他：Ib2、IIb 期の子宮頸部扁平上皮癌に対する neoadjuvant chemotherapy (NAC) followed by radical hysterectomy -賛成の立場から 産婦人科の世界 Vol.57 No.6 P19-27, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

資料2.

表1 当科での子宮頸癌症例数(1990年～2002年)

進行期	ASC	ADC	SCC
I a	5	8	289
I b	26	77	286
II a	0	4	61
II b	6	35	156
III a	0	0	6
III b	2	11	100
IV a	0	1	12
IV b	0	2	8
計	39	138	918

表2 当科で広汎子宮全摘術を実施した子宮頸癌 I b1期症例
(1990年～2002年)

組織型	症例数	年齢(平均)	リンパ節転移	脈管侵襲
ASC	24	30-60(46.1)	25.0%(6)	50.0%(12)
ADC	63	31-75(48.3)	15.9%(10)	46.0%(29)
SCC	216	28-79(48.7)	16.2%(35)	53.2%(115)

3. siRNA とアテロコラーゲン複合体を用いた子宮頸癌に対する分子標的治療

分担研究者 野澤 志朗 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
藤井多久磨 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

研究要旨

子宮頸癌は初期の段階で発見されれば病変を摘出することにより良好な治療成績をおさめているものの、進行癌と診断された場合や再発癌においては治療に難渋しており、新しい作用機序に基づく治療戦略開発が望まれている。新たな子宮頸癌の分子標的治療戦略として HPV18 型の E6,E7 遺伝子を標的とした siRNA をデザインし、子宮頸癌由来培養細胞における細胞増殖抑制効果を観察した。HPV の塩基配列特異的な siRNA はウイルス由来 E7 蛋白質の発現を抑制し、癌抑制遺伝子産物 Rb 蛋白質の発現を回復させ、老化を促し細胞増殖抑制効果を発揮する。さらに siRNA とアテロコラーゲン複合体は腫瘍移植治療実験において腫瘍細胞の増殖を抑制したことから、子宮頸癌に対するあらたな分子標的治療の候補として臨床応用が期待される。

A. 研究目的

子宮頸癌は初期の段階で発見されれば病変を摘出することにより良好な治療成績をおさめているものの、進行癌と診断された場合や再発癌においては治療に難渋している。特に放射線治療に抵抗性を示した場合には、有効な治療方法のないのが現状である。現在、シスプラチン、タキサン製剤、CPT-11、ジェムシタピンなどの抗癌剤が進行・再発癌に使用されており、20-40%の奏功率を示しているものの、臨床的に十分な成績とは言い難い。したがって、これらの抗癌剤とは作用機序が全く異なる抗癌剤の開発が望まれている。

近年、子宮頸癌発生の分子機構が解明されつつあるが、その中でも human papillomavirus (HPV)感染の関与が重要なイベントであることが明らかとなってきた。特にウイルス由来の E6,E7 蛋白質が宿主由来の癌抑制遺伝子産物 P53,RB 蛋白質を不活化することにより細胞の悪性化および癌細胞の維持に重要な役割を果たしている。そこで HPV の E6,E7 遺伝子発現を siRNA を用いて抑制することにより子宮頸癌細胞の増殖抑制を図るという分子標的治療の可能性について培養細胞を用いて検討するとともに、in vivo においてもその効果が見られるか否かを検討し、臨床応用の可能性について模索した。

B. 研究方法

HPV18 型は子宮頸癌の中でも、特に予後の悪い小細胞癌や腺癌において多く検出されハイリスク型 HPV と認識されている。そこで、HPV18 型 E6,E7 遺伝子に対する siRNA が HPV18 型陽性の子宮頸癌細胞に対し増殖抑制効果を示すか否かを検討した。

- (1) SKG-II,SKG-IIIa 細胞は HPV18 型、HPV16 型の DNA がそれぞれ組み込まれている子宮頸癌由来培養細胞で我々が所属している研究室で樹立された培養細胞である。一方、HeLa 細胞は HPV18 型の DNA がくみこまれている培養細胞である。我々は HPV18 型遺伝子の一部に相当する塩基配列を標的とした siRNA を合成し、培養細胞にリポソーム法にてこれらの siRNA をトランスフェクションして細胞増殖抑制能を検討した。
- (2) 1 と同様に培養細胞に siRNA をトランスフェクションしたのち、realtime RT-PCR 法とウエスタンブロット法にて培養細胞における HPV E6,E7 遺伝子産物発現量を解析した。
- (3) 1 と同様に培養細胞に siRNA をトランスフェクションしたのち、b-ガラクトシダーゼ染色を行い細胞の老化について解析した。

- (4) SKG-II 細胞をヌードマウスの背中に注射し腫瘍を形成させたのち、siRNA とアテロコラーゲン複合体を腫瘍に局注した。その後、腫瘍の大きさを計時的に計測した。
- (5) ヌードマウス移植腫瘍を摘出し、細胞増殖能を ki-67 免疫組織化学染色を用いて解析した。

C. 研究成績

- (1) SKG-II 細胞においては E6、E7 遺伝子を標的とした siRNA を用いると細胞の増殖が 40%抑制された。HeLa 細胞では 60%抑制された。一方、SKG-IIIa 細胞では増殖抑制が観察されず、我々の使用した HPV18 型に対する siRNA は少なくとも HPV16 型には効果がなく、HPV の型特異的に効果のあることが示唆された。
- (2) realtime RT-PCR 法では SKG-II 細胞を用いると E6、E7mRNA は 70%抑制され、HeLa 細胞では 50%抑制されることがわかった。ウエスタンブロット法を用いると SKG-II 細胞の E7 蛋白質の発現は検出不能となり、HeLa 細胞では 60%減少することがわかった。E7 蛋白質発現減少に伴う Rb 蛋白質発現の上昇は SKG-II 細胞、HeLa 細胞でそれぞれ、5.5 倍、1.5 倍であった。
- (3) b-ガラクトシダーゼ染色陽性細胞は標的 siRNA をトランスフェクションすることにより明らかに増加した。
- (4) ヌードマウス移植腫瘍に対し局注による治療を開始した日を 1 日目として 21 日目で腫瘍の大きさを比較した場合には、標的となる siRNA を用いるとコントロール群と比較して約 1/5 の大きさであることが観察された。
- (5) 移植腫瘍における細胞増殖能を ki-67 免疫組織化学染色で検討したところ、標的 siRNA を局注した腫瘍の ki-67 ラベルインデックスは 71%、コントロール群では 88%であり標的 siRNA を投与した腫瘍において低値を示したことから、標的 siRNA は細胞増殖能を抑制しているといえる。

D. 考察

siRNA は標的遺伝子発現を特異的に抑制すると考えられ、新しい分子標的治療のツールとして脚光を浴びている。siRNA の効果は合成 siRNA よりもウイルスベクターを使用した発現システムのほうが高い発現量が得られるが、人体への臨床応用を考えた場合、ウイルスベクターを用いた発現システムは副作用の点から現在のところ実用化のめどはたっていない。また、HPV の E6、E7 遺伝子を標的とした子宮頸癌の治療効果については *in vitro* 実験におけるデータの蓄積があるものの、*in vivo* 実験についての報告はない。そこで我々は最初に子宮頸癌由来培養細胞である SKG-II 細胞において HPV の E6、E7 遺伝子を標的としたいくつかの siRNA を合成し、もっとも細胞増殖抑制効果が認められる遺伝子配列（#1）を見出した。#1 は E6、E7mRNA の発現を抑制し E7 蛋白質発現も抑制するとともに癌抑制遺伝子産物の Rb 蛋白質の発現の回復が認められた。さらに、老化の指標として b-ガラクトシダーゼ染色陽性細胞が増加することから、細胞増殖抑制効果は Rb 蛋白質発現に伴い老化が誘導されたものと推測された。

一方、siRNA を効率よく生体内に運搬するためにアテロコラーゲンを使用した。アテロコラーゲンは牛の真皮由来のタイプ I のコラーゲンをペプシン処理したもので、すでに皮膚充填剤として医療品として承認使用されている安全な薬剤である。このアテロコラーゲンに siRNA を混ぜて腫瘍内に局注することにより腫瘍の増殖抑制効果が観察され、腫瘍摘出標本の ki-67 免疫組織染色においても細胞増殖抑制効果が認められた。siRNA とアテロコラーゲン複合体を用いた分子標的治療はウイルスベクターを用いた遺伝子導入法に比べ、安全性に優れ実地手技も難しくないことから、難治性進行子宮頸癌に対する新しい治療法のひとつとして有望と考えられた。

E. 結論

子宮頸癌の分子標的治療として HPV18 型の E6、E7 遺伝子を標的とした siRNA をデザインし（#1）、子宮頸癌由来培養細胞における細胞増殖抑制効果を観察した。#1 は E7 蛋白質の発現を抑制し Rb 蛋白質の発現を回復させ、老化を促し細胞増殖抑制効果を発揮する。さらに siRNA とアテロコラーゲン複合体は腫瘍移