

## 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 内山(時長) 亜弥

横浜市立大学大学院医学研究科 生殖生育病態医学

### 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授 折館 伸彦

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学 教授 石川 義弘

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 がん総合医科学 講師 小林 規俊

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### Aberrant nuclear localization of aPKC $\lambda$ is associated with poorer prognosis in uterine cervical cancer.

子宮頸癌における細胞極性制御因子 Atypical protein kinase C  $\lambda$  の臨床病理学的役割

**【序論】** 子宮頸癌はヒトパピローマウイルスのワクチン接種・がん検診・適切な治療により将来的に排除が見込める疾患とされているが、本邦は先進国の中でも罹患率・死亡率が高く、ワクチン接種勧奨の一時中止やがん検診受診率の低迷により今後も浸潤癌の発生が予想される。Atypical protein kinase C  $\lambda$  (aPKC  $\lambda$ ) は、正常上皮細胞で細胞の分化・細胞極性決定に寄与するタンパク質である。子宮頸癌の前がん病変である子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN) で aPKC  $\lambda$  が異常発現し、病変の進行のリスクと関連すると先行研究で示した。また、子宮頸癌以外のがん腫では aPKC  $\lambda$  の過剰発現もしくは低発現症例の予後が不良であるとの報告があり、癌腫によって aPKC  $\lambda$  の機能は異なることが示唆されている。本研究では、子宮頸癌において aPKC  $\lambda$  が分子標的治療の標的分子となりえるか評価するために、子宮頸癌における aPKC  $\lambda$  の発現量と局在を評価し臨床病理因子や予後との関連を解析した。また、前がん病変と浸潤癌、および原発巣と転移・再発病巣の aPKC  $\lambda$  発現様式をそれぞれ比較し、発がんの初期段階から浸潤癌の進行段階までの幅広い進行過程における aPKC  $\lambda$  の役割を評価し、CIN から進行浸潤癌のどの対象で aPKC  $\lambda$  が治療標的になるか検討した。

**【実験材料と方法】** 2004年1月から2011年12月に横浜市立大学附属病院産婦人科と神奈川県立がんセンターで子宮頸癌に対して初回治療を行った168例および良性疾患で子宮頸部検体を採取した13例を対象として、臨床・病理学情報および子宮頸部組織の生検標本もしくは手術摘出標本を収集した。子宮頸部組織の aPKC  $\lambda$  を免疫組織化学で検出して発現形式を評価し、aPKC  $\lambda$  の発現異常と臨床病理学因子を比較と、発現パターンによる予後の差を解析した。また、同一検体に前がん病変と浸潤部が隣接する43症例と、原発と転移巣の両方から組織を得られた8例について、それぞれの aPKC  $\lambda$  の発現様式を比較した。本研究は両施設の倫理委員会で承認を得た。

**【結果】** 正常扁平上皮における aPKC  $\lambda$  の染色様式は、発現量は低く、細胞質と細胞間に局在した。一方、子宮頸癌の69.0%では aPKC  $\lambda$  が高発現していた ( $p < 0.001$ )。発現量と進行期分類、予後に相関はなかった。高発現群は低発現群と比較し有意にリンパ節転移が多かった ( $p = 0.015$ )。子宮頸癌の36.9%では aPKC  $\lambda$  が核に異常局在し、進行期分類が進むほど、核局在である率は有意に増えた ( $p < 0.001$ )。aPKC  $\lambda$  核局在群の方が細胞質局在群と比較して有意に予後不良であった ( $p < 0.001$ )。aPKC  $\lambda$  の局在様式は原発巣の浸潤部と転

移性腫瘍では8例中7例が一致する一方、前癌病変と隣接する浸潤部の一致率は69.8% (30/43例) であり、27.9% (12/43例) の症例は、前癌病変は核局在であるが、浸潤部では細胞質局在であった。

**【考察】** 子宮頸部浸潤癌では aPKC  $\lambda$  の過剰発現と予後の関連は認めなかったが、核に異常局在する一部の症例は予後不良であった。臨床進行期の進行症例ほど aPKC  $\lambda$  の核局在症例の割合が多いが、FIGO III・IV 期の症例に限定した解析でも aPKC  $\lambda$  が核に局在する症例は予後が不良で、進行期とは独立した子宮頸癌の予後因子である。先行研究で aPKC  $\lambda$  の核局在と CIN の進展の関連を示しており、aPKC  $\lambda$  の核局在はがん初期から浸潤がんまでの過程で一貫して病変の進行・進展と関連していると考えられる。aPKC  $\lambda$  の核局在は乳癌で唯一報告されていたが、その機能については神経細胞で増殖と関連する報告があるが不明な点が多く、予後との関連を本研究で初めて示した。浸潤癌の同一症例で aPKC  $\lambda$  は原発巣と転移巣で同じ局在である症例が多かったが、CIN3 と隣接する浸潤癌の部位の比較では aPKC  $\lambda$  が核局在から細胞質局在に変化する症例を認めた。これは、CIN が浸潤になる過程で生じる他の遺伝子変異により aPKC  $\lambda$  の局在が影響を受ける可能性を示唆している。浸潤癌に進展した比較的早い段階で aPKC  $\lambda$  の局在は決まると考えられる。

**【結論】** 子宮頸部の浸潤癌においても CIN と同様に aPKC  $\lambda$  の核局在が病変の進展に関与している可能性が示された。子宮頸癌において aPKC  $\lambda$  の異常な核局在が予後予測バイオマーカーとなり、がん細胞の表現型に関与する可能性を初めて示した。また、原発・転移巣の比較から、この異常発現は浸潤癌発生の初期から保持され続ける性質と考えられ、原発巣や遠隔転移巣の両方の分子標的治療の標的となる可能性がある。

上記内容について研究報告の説明がなされたのち、以下の質疑応答が行われた。

副査の石川義弘教授の質疑に対して、以下の回答がなされた。

講評と質疑

1. 子宮頸癌において aPKC  $\lambda$  の役割について着目し、基礎研究と臨床研究とを組合せたことは良い観点である。
2. aPKC  $\lambda$  の局在の違いによる子宮頸癌の生存曲線の差が印象的である。臨床進行期 III・IV 期を対象とした解析でも予後に大きな差が出ている。III 期と IV 期それぞれに限定して解析するとより大きな差が出るのではないか。
3. aPKC  $\lambda$  が核局在する分子メカニズムについてどのように考えているか。
4. 免疫組織化学の評価結果が3名で一致しなかった場合、どのような議論と決定を行い、その結果どの程度一致したのか。

回答

2. III 期と IV 期それぞれで比較は行っていない。適切な従属変数による多変量解析では

aPKC  $\lambda/\mu$  局在と病期はともに有意差を認め、aPKC  $\lambda/\mu$  の局在が臨床進行期分類とは独立した予後因子であると考えられる。

3. aPKC  $\lambda/\mu$  が核局在するメカニズムとしては、上流に PI3K の変異が関与している可能性がある。PI3K シグナルにより核局在が生じるという In Vitro 実験の結果と子宮頸癌組織で PI3K 遺伝子変異がある点から想定される仮説であり、今後さらなる検証が必要である。
4. 免疫組織化学の評価は判定者間で乖離があり当初は十分な一致率が得られなかった。意見が分かれた症例を振り返り、定義（核と細胞質の共局在を核局在と定義する等）を明確にして再評価したところ高い一致率を得た。

副査の小林規俊講師の質疑に対して、以下の回答がなされた。

質疑

1. 子宮頸癌で aPKC  $\lambda/\mu$  が核局在する症例が予後不良であった原因として、局在による治療反応性の違いは考えられるか。
2. aPKC  $\lambda/\mu$  による細胞極性の変化は、腫瘍や間質に影響を及ぼしているか。

回答

1. 対象となった子宮頸癌の症例は病期に応じて基本的に標準治療が行われている。標準治療と試験治療の比較をした臨床試験は生存期間に大きな差がでることは少ない。aPKC  $\lambda/\mu$  の核局在が病変の進行のほかに、薬剤抵抗性や放射線感受性などの治療反応性に影響を及ぼす可能性があり今後検証したい。
2. aPKC  $\lambda/\mu$  ががんの微小環境にどのように影響及ぼすか既存の研究はない。CIN では出現しない炎症細胞が浸潤癌に存在することもあり、今後関係を検討したい。

最後に主査の折館伸彦教授の質疑に対して、以下の回答がなされた。

質疑

1. 既存の知見では前がん病変の進行として CIN1 から CIN 3 は連続し、浸潤癌の I 期から IV 期の進行もしていると考えられているが、連続していない可能性もあるか。また、CIN3 で aPKC  $\lambda/\mu$  が核局在、子宮頸癌 I 期では aPKC  $\lambda/\mu$  が細胞質局在となる意義は何か。
2. 局在の違いを治療ターゲットにする時に、核局在を阻害すると CIN3 から I 期へ進行を促進してしまう可能性はないか。

回答

1. CIN 3 と子宮頸癌 I 期は微少な浸潤を病理学的に捉えられるため連続しているが aPKC  $\lambda/\mu$  の局在は異なる。この aPKC  $\lambda/\mu$  の局在変化は同一症例の隣接した CIN3 と浸潤癌の部位の比較でも裏付けられている。浸潤癌となった後は細胞の性質により遠隔転移が生じる症例とそうでない症例に分かれる可能性がある。ただし aPKC  $\lambda/\mu$  の局在は浸潤癌の原発巣と転移巣で保持されることが多い。CIN3 から微小浸潤になる浸潤能を獲得す

る過程で、遺伝子変異や分子相互作用が起きる。PI3Kの変異による aPKC  $\lambda/\nu$  の局在変化が生じる仮説を立てているが、浸潤癌となる原因か結果かはさらに検証する必要がある。

2. aPKC  $\lambda/\nu$  の阻害は、CIN から浸潤癌までの幅広い治療の候補と考えているが、CIN の治療と浸潤癌の治療についてはそれぞれ個別に検討する必要がある。

以上の審査から、本研究は子宮頸癌における aPKC  $\lambda/\nu$  核局在が予後不良であることを示し、aPKC  $\lambda/\nu$  は今後子宮頸癌に対する新たな治療戦略や予後予測マーカーになりえることから、学術的かつ臨床的に高く評価できる内容である。発表内容ならびに質疑応答はいずれも適切なものであり、本研究により得られた知見はさらなる臨床研究につながる可能性がある。したがって審査員による協議の結果、本学位論文は博士（医学）の学位に十分値するものと判断された。