

論文の内容の要旨

論文題目 子宮体癌における染色体不安定性に基づく転移 診断と CyclinD1-CDK4/6 活性を指標とした 予後関連バイオマーカーの探索

氏名 池田 悠至

[序論]

子宮体癌と卵巣の同時発生癌の頻度は、子宮体癌の 5%と言われており、これらには同一組織型（主に類内膜癌）が存在するためその診断に苦慮する事がある。また、子宮体癌は再発後の予後が悪いため再発を抑えるのが治療の重要なポイントとなる。術後の化学療法の適応は現在病理学的に決められている。しかし抗癌剤未投与群で 15~20%で再発するため、抗癌剤投与群を抽出する新たな指標が求められている。

子宮体癌の分子生物学的背景に着目すると、近年染色体コピー数異常や遺伝子の変異が発癌の原因として着目されている。染色体コピー数異常が多い症例は予後が悪い事が知られている。また子宮体癌では、RAS-MAPK (MAP kinase)経路、PI3K (Phosphatidylinositol 3' kinase)経路を活性化する遺伝子変異が高頻度に存在し(*K-RAS*変異約 20%、*PIK3CA*変異約 30%、*PTEN*変異約 50%)、また高率に共存して起こることが知られている。そしてその下流に存在する Cyclin D1 は細胞周期の key protein として知られている。Cyclin D1 は PI3K 経路の下流の GSK3 β により 286 番目のスレオニンがリン酸化され、CyclinD1 は核内から細胞外へ移行し分解される。一方、核内に存在する Cyclin D1 は CDK4/6 と結合し、細胞周期を G1 期から S 期へと移行させ細胞を増殖させ、癌の進行の一因となる。しかし Cyclin D1 変異の報告が非常に少なく子宮体癌においては過去に 1 報のみである。子宮体癌は PI3K 経路の変異が非常に多く起きている癌腫であり、Cyclin D1 も未知の遺伝子変異が癌の悪性化に関与している可能性がある。

そこで本研究では下記を目的とした。

- (1) 子宮体部卵巣同時発生癌における、染色体コピー数変化 (Chromosomal instability; CIN) や RAS/PI3K 経路の主要遺伝子の変異の有無の検索およびその診断的意義の検討。
- (2) RAS/PI3K 経路の下流である Cyclin D1 の子宮体癌における変異の検索、およびその機能解析

(3) Cyclin D1 の結合蛋白である CDK4/6 のキナーゼ比活性値の子宮体癌における意義の探求

[方法]

(1) 子宮体部・卵巣同時発生癌における新たな診断方法の探索

東京大学医学部附属病院における子宮体部卵巣同時発生癌 5 症例それぞれの摘出凍結検体 10 サンプルから倫理委員会承認ならびに患者同意の元でゲノム DNA、cDNA を抽出、精製した。Single nucleotide polymorphism (SNP) タイピングアレイによる解析、及び *KRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *CTNNB1* の変異と Microsatellite instability (MSI) の検索を行った。

(2) 子宮体癌における Cyclin D1 (*CCND1* 遺伝子) 変異の解析

東京大学医学部附属病院における子宮体癌 88 症例の摘出凍結検体から倫理委員会承認ならびに患者同意の元でゲノム DNA を抽出、精製し、PCR-ダイレクトシーケンス法にて *CCND1* のエクソン 5 の遺伝子変異を解析した。変異のあった検体組織に Cyclin D1 の組織免疫染色を施行した。新たに同定された T286I 遺伝子変異のベクター (CD1-T286I) を作成した。Wild type の Cyclin D1 のベクター (CD1-WT)、コントロールとして pcDNA3 ベクター (CD1-CT) も含め HEK293T 細胞に導入し、細胞免疫染色、Western blotting、Luciferase assay、Clonogenic cell survival assay を行い、機能解析を行った。

(3) 子宮体癌におけるサイクリン D 依存性キナーゼ比活性値の有用性の検討

東京大学医学部附属病院における子宮体癌 (類内膜癌) 119 症例の摘出凍結検体から倫理委員会承認ならびに患者同意の元で Cell cycle profiling technology (C2P) を用いて CDK4/6 の発現および活性を調べた。CDDKSA = Kinase activity (CDK4+CDK6)/Expression (CDK4+CDK6) の式よりサイクリン D 依存性キナーゼ比活性値 (CDDKSA) を求め、 χ^2 乗検定、Pearson の積率相関係数、Spearman の順位相関係数、カプランマイヤー法による log-rank test にてその比較を行った。

[結果]

(1) 子宮体部・卵巣同時発生癌における新たな診断方法の探索

今回検討した 5 症例において形態学的には症例 1・5 は同一起源の転移癌 (Single primary with metastasis ; SPM)、症例 2・3・4 では子宮、卵巣各々が別起源の独立癌 (Double primary ; DP) と診断された。各検体に対して SNP タイピングアレイを施行した。コピー数変化が 5 ヶ所以上で生じている症例を CIN-Extensive、1-4 ヶ所で生じている症例を CIN-Intermediate、いずれの部位でも生じていない症例を CIN-Negative と分類した。症例 1 の子宮体部の腫瘍からはコピー数減少である Loss of heterozygosity (LOH) が 3 カ所検出された (CIN-Intermediate)。一方、卵巣の腫瘍からはコピー数変化は認められなかった (CIN-Negative)。症例 2 に関しては子宮体部、卵巣の両部位より同じ場所の LOH を 3 カ所、UPD を 2 カ所に認めた (CIN-Extensive)。症例 3 は子宮体部ではコピー数変化を認めなかった (CIN-Negative) であったのに対し、卵巣では 1 カ所の UPD

を認めている(CIN-Intermediate)。症例 4 は子宮卵巣ともに同じ部位のコピー数増加 (Gain) を 1 ヲ所認めた(CIN-Intermediate)。症例 5 に関しては卵巣検体に含まれる正常組織の割合が多く、コピー数の振幅が異なっていたが、子宮体部、卵巣ともに同部位での染色体異常が起きていた (CIN-Extensive)。

MSI に関しては症例 3 には子宮・卵巣でどちらも High、その他症例に関しては子宮・卵巣でどちらも Low という結果を得た。遺伝子変異に関しては症例 1 にて *PIK3CA* でそれぞれ 1 ヲ所、*PTEN* にてそれぞれ 2 ヲ所子宮卵巣間で異なる部位の変異を認めた。症例 2 は *CTNNB1*、症例 3 は *PIK3CA*、症例 4 は *PIK3CA* および *CTNNB1*、症例 5 は *PIK3CA* にて子宮・卵巣間で同じ部位に変異を認めた。今回の結果を比較しコピー数変化に着目すると、症例 1 は DP、症例 2、症例 4、症例 5 は SPM と考えられた。症例 3 は変異が子宮体部と卵巣で同部位に起きており、転移後のコピー数変化と考え SPM と結論付けた。興味深い事に、病理診断との結果の合致は症例 5 のみで、症例 1 から症例 4 に関しては病理診断と逆の結果となった。またすべての症例に RAS/PI3K 経路の主要遺伝子の変異が含まれていた。

(2) 子宮体癌における CyclinD1 遺伝子変異の解析

抽出したゲノム DNA を用いて、*CCND1* のエクソン 5 のシーケンスを行った結果、88 例の手術検体のうち 2 例 (2.3%) で codon286 のスレオニンがイソロイシンへと点変異 (T286I) している事が確認された。この変異は未報告の変異であり、組織免疫染色を行ったところ、その 2 例どちらも核内の Cyclin D1 強発現を認めた。HEK293T を用いて行った細胞免疫染色では CD1-T286I において CD1-WT、CD1-CT と比べ著明な核内の Cyclin D1 の蓄積を認めた。また Western blotting においても核分画で CD1-T286I で Cyclin D1 の高発現が認められた。一方、CD1-WT および CD1-CT では Cyclin D1 は核内のみならず、核外にも存在していた。Luciferase assay では CD1-WT および CD1-CT と比べ CD1-T286I において有意に pRb の発現が抑制されていた。また、Clonogenic cell survival assay においては CD1-T286I において有意に多くのコロニーが形成されていた。

(3) 子宮体癌におけるサイクリン D 依存性キナーゼ比活性値の有用性の検討

子宮体癌 119 例に C2P を施行し、7 例に関しては測定下限以下、2 例はサンプル不良にて結果より除外し、110 例に関して検討を行った。CDK4 および CDK6 の比活性値の間には Pearson の積率相関係数にて強い相関関係がある事を確認した (相関係数 ; 0.661)。CDDKSA を中央値(5)にて 2 群化し、 χ^2 乗検定を施行した所、CDDKSA は予後と有意に相関していた ($p=0.044$)。続いて Spearman の順位相関係数を用いて CDDKSA 値とその他の臨床病理学的因子との相関を検討したところ、CDDK はどの因子とも有意な相関がない事が示された。次に子宮体癌カットオフ値を再発群の Box plot より 3.2 と設定し、それ以上を CDDK-high、以下を CDDK-low と定義した。無病生存期間を Kaplan-Meier 法による log rank test で検討したところ、抗癌剤非投与群には CDDK-high が有意に予後不良であったのに対し、抗癌剤投与群では CDDK-high が有意に

予後良好であった。抗癌剤投与群において単変量解析を行ったところ、年齢 ($p=0.023$) と CDDKSA ($p=0.035$) のみ有意な予後因子であった。多変量解析では CDDKSA のみが独立予後不良因子として抽出された ($p=0.036$)。

[考察] 子宮体部卵巣同時発生癌における診断法として SNP タイピングアレイを用いた CIN の解析が有用である事を示した。CIN-Extensive の症例で診断精度が高くなる点、および腫瘍含有量が低くても診断可能である点であるが、欠点としては転移後や同一腫瘍内の部位毎に異なるコピー数変化が生じている可能性を否定できない点が挙げられる。これはコピー数に限らず遺伝子変異にも同様に起こりうる事であり、現時点ではこれらの診断法の組み合わせで診断精度を高める事が望まれる。また、すべての症例に RAS/PI3K 経路の主要遺伝子の変異が含まれていたためその下流遺伝子である *CCND1* の変異解析を行った。2.3%に変異が発見された T286 は Cyclin D1 の分解に関わる重要にアミノ酸であり、リン酸化により Cyclin D1 が核外へ移行され分解される事が知られている。そのため追加で細胞株を用いた機能解析を行い、この変異が存在すると Cyclin D1 の核内蓄積が起これ、細胞増殖が促進される事を証明した。以上より、子宮体癌における RAS/PI3K-Cyclin D1 経路の重要性が示唆された。その一方、Cyclin D1 の過剰発現は子宮体癌において予後に相関しないことが報告されていたため、Cyclin D1 の結合蛋白である CDK4/6 に着目した。CDK4/6 は P16 に代表される CDK の機能を抑制する蛋白によっても制御されており、細胞周期調節の最終段階に関わっている。Cyclin D1 は Ras-PI3K 経路からのシグナルによる影響を受けるため、CDK4/6 の活性の方が細胞周期そのものへの影響を直接的に反映する可能性があると考えられる。本研究において、CDDKSA は子宮体癌における予後因子の一つであり、同時に腫瘍進展性・術後抗癌剤感受性の指標となる事が明らかとなったことより、術後化学療法の必要性を判断するうえで診断の一助となる可能性が示された。これまで CDK4、CDK6 の発現そのものについては予後因子となる報告はないが、今回キナーゼ活性値を蛋白発現と同時に計測する事により CDK4/6 の機能が子宮体癌の予後因子になる事が初めて示された。子宮体癌の予後・治療感受性における有力なバイオマーカーとして期待される。