

神澤医学賞受賞講演

子宮間葉系腫瘍の鑑別に対する新規バイオマーカーの開発

短縮タイトル：子宮平滑筋肉腫に対するバイオマーカー

Establishment of novel diagnostic biomarker for human uterine mesenchymal tumors

信州大学 医学部 医学科 免疫制御学講座 准教授 林 琢磨

はじめに

子宮平滑筋肉腫(子宮肉腫)は、再発・転移を繰り返す難治性腫瘍であり、50歳以降その罹患率の増加が認められる。子宮平滑筋腫(子宮筋腫)は、人種を問わず50歳以上の成人女性の約80%が発症するといわれる良性腫瘍であるが、子宮肉腫との判別が極めて難しい場合もある。画像診断技術は日々進歩しているが、MRI等の画像診断では、子宮肉腫は子宮筋腫と区別しにくい場合もある。現行の確定診断は、病理医の経験に基づいた摘出物の病理診断により行われるため客観性に欠けている。そのため、容易に、正確に診断できる技術の確立が要望されている。これまで、私達の研究グループは、米国・MITの利根川 進 教授との研究協力のもと、イムノプロテアソーム構成因子LMP2の欠損マウスで、子宮肉腫が高頻度に自然発症することを報告した。そこで、私達の研究グループは、病理ファイルより選別された各種生検組織でのLMP2の発現状況について免疫組織化学染色により検討を行なった。その結果、子宮肉腫で特異的なLMP2の著しい発現低下が認められた。さらに、LMP2に着目したMicroArrayの遺伝子プロファイリングより、子宮肉腫特異的にCyclin Eの著しい発現が認められた。提携の医療機関との連携の基、私達の研究グループは、LMP2とCyclin E、さらに堀内らが報告したCalponin h1を加えた3因子を子宮間葉系腫瘍の診断マーカーとしての信頼性について種々の子宮間葉系腫瘍で検証を行っている。さらに、私達の研究グループは、子宮肉腫を中心とした子宮間葉系腫瘍の生物学的特徴の解析を行い、新規治療に向けた標的因子の探索を行っている。本誌をお借りして、子宮肉腫の発症機序に関する分子生物学的解析成果の診断技術への応用について、新たな研究成果を含めて紹介する。

子宮平滑筋肉腫とは

子宮体部に発症する腫瘍には、子宮体癌(子宮内膜癌)の他に子宮平滑筋肉腫(子宮肉腫)と子宮平滑筋腫(子宮筋腫)がある。子宮筋腫は良性であるので命を落とす危険はないが、子宮肉腫と区別しづらく、鑑別診断は非常に困難であるケースがある。子宮肉腫は婦人科の悪性腫瘍の中でもまれな疾病で、子宮体部悪性腫瘍の2~5%の発症率であり、子宮頸部より体部の平滑筋肉組織層から多く発生する。子宮体癌では、女性ホルモン値の高い人、肥満、高血圧、糖尿病などが、

リスクファクターとされている。しかし、子宮肉腫では、女性ホルモンは肉腫の発症に関与しておらず、リスクファクターは明らかでない^{1),2)}。ただ、骨盤内への放射線照射の治療歴のある女性に子宮肉腫が、発生する傾向にある。

子宮体癌と同様、生理以外や閉経後の性器出血が認められたり、腹痛、下腹部の違和感を認められたりすることもある。そして、外見上、子宮筋腫と区別しにくい場合、子宮筋腫として手術した後に、病理検査の結果により、子宮肉腫と判明することもある。子宮筋腫の増殖は性ホルモンに依存的なので、通常、閉経後に増殖が低下する。つまり、閉経後も子宮体部が増大する場合は、子宮肉腫を疑ってみる必要がある。閉経前に急激に子宮体部が大きくなっていく場合も、子宮肉腫である可能性が高い³⁾。このように、子宮肉腫に特徴的な症状はないが、出血、下腹部の違和感は、初期症状である。子宮肉腫に対する化学療法、放射線療法の有効性は低く、基本的な治療法は、外科療法である⁴⁾。

現在の子宮平滑筋肉腫に対する診断での問題点

現在の鑑別基準：子宮肉腫細胞は、異型性が強く巨大化しながら増殖することが多いが、殆ど細胞異型性を示さない場合もあるので注意が必要である。子宮肉腫と子宮筋腫との鑑別は、凝固壊死があるかどうか、そして細胞分裂像が増大しているかどうかである。原則的には、細胞密度が高い状況では 10 高倍視野で 10 個以上の細胞分裂が認められる場合、あるいは腫瘍細胞に異型性が認められる状況では 10 高倍視野で 5 個以上の細胞分裂がある場合に子宮肉腫と診断する。したがって、上記疾患の診断は、外科病理医の経験に依存するため、複数の外科病理医の間で鑑別診断について異なる意見が認められることもあり、その鑑別は容易ではない。したがって、子宮肉腫と子宮筋腫に対する鑑別マーカーの同定が、同疾患の診断において必須である。

ユビキチン依存性蛋白質分解機構と発癌

細胞内の蛋白質の合成・分解が効率的に保たれることは、細胞の生存や増殖において必須である。細胞内の蛋白質分解機構として、エネルギー依存的な反応系であるユビキチン・プロテアソームカスケードが存在する。プロテアソームは、真核生物の ATP 依存性プロテアーゼであり、不活性型の 20S プロテアソームの両端に調節複合体(19S RP あるいは PA700)が会合した分子量 250 万の巨大な蛋白質複合体で約 50 個のサブユニットから構成されている。プロテアソームの・リングのサブユニットである LMP2、LMP7、LMP10 (MECL-1) の発現は、インターフェロン- γ (IFN- γ) の刺激により顕著に誘導されるため、プロテアソームは、IFN- γ の刺激により再構成される⁵⁾。特に、IFN- γ の刺激により再構成されたプロテアソームは、イムノプロテアソームと呼ばれる。

これまでの研究より、細胞周期、細胞死、代謝調節、免疫応答、シグナル伝達、転写調節、DNA 修復など生命現象のあらゆる機能において、ユビキチン・プロテアソームカスケードは、重要な役割を果たしている。したがって、ユビキチン・プロテアソームカスケードの異常が、癌、神経

変性疾患や自己免疫疾患などの発症に関与している⁶⁾。

LMP2 の発現低下と子宮平滑筋肉腫の発症との関連性

LMP2 欠損マウスでは、組織と基質特異的にイムノプロテアソームの不活性化が認められている。さらに、ウイルスに感染された LMP2 欠損マウスでは、ウイルス感染細胞に対する正常な免疫応答が認められず、この免疫異常は、主要組織適合性抗原複合体(major histocompatibility complex, MHC)による抗原ペプチドの細胞表面への提示障害に起因することが確認されている。私達の研究グループは、利根川 進 教授(ピコア学習記憶研究所 M. I. T.)の研究協力のもと、LMP2 欠損マウスのメスで、生後 6 ヶ月以降になると子宮平滑筋層での腫瘍が認められ、生後 12 ヶ月までの発症数は、全 LMP2 欠損マウスのメスの約 37%にまでおよぶことを確認した⁷⁾⁸⁾(図 1)。このマウスの子宮平滑筋層での腫瘍の罹患率のカーブ曲線は、閉経後の 50 才以降で認められるヒト子宮肉腫の罹患率のカーブ曲線に非常に似通っている⁷⁾⁸⁾。術後摘出組織より得られた子宮肉腫の病理所見で認められる子宮肉腫細胞の特徴“統一性のない大小様々な大きさの紡錘状の細胞と核”が、LMP2 欠損マウスより得られた子宮平滑筋層の腫瘍の病理所見でも認められた⁷⁾⁸⁾。また、子宮平滑筋層で腫瘍が生じている LMP2 欠損マウスにおいて、著しい体重の減少が認められ⁷⁾⁹⁾。通常、ヒトにおいては子宮筋腫と子宮肉腫の判断が必ずしも容易ではないが、特徴的な病理所見とこのような顕著な体重の減少が認められることから、私達の研究グループは、LMP2 欠損マウスで認められる子宮平滑筋腫瘍は、悪性腫瘍である“子宮平滑筋肉腫(leiomyosarcoma)”と判断した。

子宮肉腫の罹患率は、子宮体部に生じる悪性腫瘍の 2~5%と頻度は低いものの、発症原因が不明で、子宮肉腫の血行性転移能が非常に高い。そのため、子宮平滑筋層内の原発巣が大きくない場合でも、他臓器での転移巣が確認される症例も少なくない。当然ではあるが、他の臓器に発症する悪性腫瘍と同様、子宮肉腫が転移する前に発見し、早期治療を始めることが予後において重要である。しかしながら、MRI や PET/CT などの画像診断では子宮筋腫と子宮肉腫を見分けるのは難しく、切除した生検の病理検査で確定診断を行っているのが現状である。しかも、科学的根拠に基づいた腫瘍マーカーがないため、病理医の経験による判断に依存するなど、診断にも限界がある。そこで、私達の研究グループは、提携先の医療機関(注 1)との共同研究でヒトの正常子宮平滑筋 55 症例、子宮筋腫 48 症例、子宮肉腫 54 症例の組織を用いて、各組織での LMP2 の発現状況を検討した^{10)~13)}。その研究成果より、子宮肉腫の組織においてのみ著しい LMP2 の発現低下が認められ、種々の基礎研究や臨床研究より「LMP2 は子宮肉腫と子宮筋腫の鑑別マーカーとしての有用性が高い」との結論に至った。バイオプシーや手術摘出組織での鑑別診断により、腫瘍が「悪性」か「良性」の判断は、患者の生命の岐路に直面することである。そこで、私達の研究グループは、マイクロアレイの手法を用いて LMP2 と併用可能である新規のバイオマーカーの探索を行っており、数種類の蛋白質を当該の腫瘍に対するバイオマーカーとしての候補に挙げ、

臨床研究によって検証を行っている。最終的には、LMP2 を含んだ最低 3 種類のバイオマーカー (cyclin B1, calponin h1 など)¹⁰⁾⁻¹³⁾を用いて、子宮肉腫の鑑別診断法を確立することを当面の目標としている。また、私達の研究成果より、LMP2 の発現低下が、子宮肉腫の増殖能と血行性転移に関与しているらしい。今後の研究成果が子宮肉腫の血行性転移に対する新たな阻害法の開発へと進展していく可能性が考えられる。

経済の発展、福祉の向上等への貢献

乳癌や子宮内膜癌をはじめとするヒト婦人科腫瘍の場合、女性ホルモンのアンバランスが癌発症のリスクファクターとなることが多いが、子宮肉腫の発症と女性ホルモンとの関連性は認められていない。子宮筋腫の一部が悪性化して子宮肉腫へと形質転換したと思われる症例もあるが、子宮肉腫と子宮筋腫との関連性は明らかとされていない^{1), 2)}。子宮肉腫の発症に関与するリスクファクターが同定されなかった理由の 1 つとして、現在までに、子宮肉腫を高頻度に自然発症する動物モデルが存在しなかった点があげられる。LMP2 欠損マウスが最初の子宮肉腫の自然発症モデルであり、ヒトの子宮肉腫の発症と LMP2 発現との関連性について問われる。LMP2 欠損マウスでは、子宮肉腫以外に高頻度な自然発癌が認められない事より、LMP2 が、子宮平滑筋細胞において既知または未知の細胞周期調節因子や形質転換因子の作用に大きく関与しているらしい^{10) 11)}。現在、私達の研究グループは、ヒト子宮肉腫の発症と LMP2 の発現との関連性について検証を行っている。本研究では、LMP2 の子宮肉腫の鑑別マーカーとしての将来的有用性が、特筆されるべき点である (注 2)。子宮肉腫の発症における特定のリスクファクターが明らかとされることは、明確な遺伝子レベルでの新規診断方法さらに治療法の開発へと発展する。

女性の晩婚化・高齢初産婦の増加といったライフサイクルの変化によって、40 歳代女性の子宮温存希望が強くなっている。これまで、30 歳代までに妊娠、出産した女性は 40 歳代で子宮筋腫にかかった場合子宮摘出術を施行されることが多かった。しかし、今日、子宮筋腫の治療方針は患者の社会背景を教慮して子宮をできるだけ温存する方法を考えなければならない。多くの子宮筋腫患者の中から、子宮温存の是非を決定する際の最大重要点は悪性腫瘍の可能性を除外診断することである。本技術によって子宮筋腫と子宮肉腫を正確に鑑別する方法が確立されれば、最近急増している子宮温存希望患者に大きな恩恵が期待される。

注 1: ヒト子宮平滑筋肉腫組織等のヒト生検組織を用いた実験系: ほりうちレディースクリニック (堀内 院長)、信州大学医学部産科婦人科講座 (塩沢 教授)、京都大学医学部産科婦人科講座 (小西 教授)、信州大学医学部付属病院臨床検査部 (小林 主任、佐野 講師)、国立がんセンター病院病理部 (平岡 室長、金井 部長)、兵庫県立がんセンター婦人科 (須藤 医長、西村 部長)、東北大学医学部産科婦人科講座 (八重樫 教授)、大阪市立大学医学部産科婦人科講座 (市村 講師、石河 教授) と連携; 同研究は、各医療機関の倫理委員会より承認され行われている。ゲノム解析: 東

京大学先端科学技術研究センター(油谷 教授)との共同研究により遂行されている。LMP2 欠損マウスに関する遺伝子プロファイリング:利根川 進 教授(マサチューセッツ工科大学)の研究協力下で行われている。

注 2：日本特許：特許第 4982869 号、名称「LMP2 を用いた子宮平滑筋肉腫の検出」

平成 17 年 11 月 30 日出願（平成 24 年 5 月 11 日登録）

全発明者氏名：林 琢磨(信州大学大学院医学系研究科・准教授)、小林 幸弘(信州大学医学部附属院・主任)、佐野 健司(信州大学医学部附属病院・講師)、堀内 晶子(信州大学医学部・助教)、小西 郁生(信州大学医学部・教授)

他、米国特許(No. 8,206,896 B2)、ヨーロッパ特許(No. EP 1 959 022 B1)修得

参考文献

- 1) Leita MM, Soslow RA, Nonaka D, Olshen AB, Aghajanian C, Sabbatini P, Dupont J, Hensley M, Sonoda Y, Barakat RR, Anderson S. Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer* 101: 1455-1462, 2004
- 2) Leiser AL, Anderson SE, Nonaka D, Chuai S, Olshen AB, Chi DS, Soslow RA. Apoptotic and cell cycle regulatory markers in uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol.* 101: 86-91, 2006
- 3) Mulayim N, Gucer F. Borderline smooth muscle tumors of the uterus. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 33: 171-81, 2006
- 4) Dusenbery KE, Potish RA, Argenta PA, Judson PL. On the apparent failure of adjuvant pelvic radiotherapy to improve survival for women with uterine sarcomas confined to the uterus. *Am J Clin Oncol.* 28: 295-300, 2005
- 5) Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 21: 455-464, 2000.
- 6) Hayashi T, Kodama S, Faustman DL. : LMP2 expression and proteasome activity in NOD mice. *Nature Med.* 6(10):1065-1066, 2000.
- 7) Hayashi T, Faustman DL. :Development of spontaneous uterine tumors in low molecular mass polypeptide-2 knockout mice. *Cancer Res.* 62: 24-27, 2002
- 8) 林 琢磨：子宮肉腫の発症機構：26S プロテアソームの不活性化の発癌関与. *実験医学* 21: 952-956, 2003.
- 9) Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kanai Y, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Mice-lacking LMP2, immuno-proteasome subunit, as an animal model of spontaneous uterine leiomyosarcoma. *Protein Cell* 1(8),711-717, 2010.
- 10) Hayashi T, Kobayashi Y, Kohsaka S, Sano K. : The mutation in the ATP-binding region of JAK1, identified in human uterine leiomyosarcomas, results in defective interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2. *Oncogene* 25: 4016-4026, 2006
- 11) Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Nagase S, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. *Scientific Reports* 1: 180, 2011. doi: 10.1038/srep00180
- 12) Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Nagase S, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Potential role of LMP2 as an anti-oncogenic factor in human uterine leiomyosarcoma: morphological

significance of calponin h1. *FEBS Letters* 586(13): 1824–1831, 2012.

- 13) [Hayashi](#) T, [Horiuchi](#) A, [Sano](#) K, [Hiraoka](#) N, Ichimura T, Sudo T, Ishiko O, Yaegashi N, Aburatani H, [Konishi](#) I. Potential diagnostic biomarkers for human [uterine](#) mesenchymal tumors: Especially LMP2/ β 1i and Cyclin B1-differential expression. *Oncology Letters* In press (Accepted at March 26, 2013)