

筑波大学  
博士(医学)学位論文

転移・浸潤に関わるタンパク質

Rho, ROCK の発現と, 同時化学放射線療法後の  
子宮頸癌の予後との関係について

2020

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

田中 圭一

## 目次

要旨 .....	3
<b>I. 背景.....</b>	<b>4</b>
I-1：子宮頸癌の社会的背景 .....	4
I-2：子宮頸癌の発生要因 .....	4
I-3：子宮頸癌の病期分類と治療方針 .....	5
I-4:子宮頸癌の治療（手術療法を除く） .....	9
I-4-1：子宮頸癌の放射線療法 .....	9
I-4-2：子宮頸癌に用いられる化学療法 .....	11
I-5：子宮頸癌における遠隔転移の位置づけ .....	12
I-6：RHO の作用と情報伝達 .....	13
I-7：細胞遊走及び方向性と RHO ファミリー .....	16
I-8：臨床及び IN VIVO 転移モデルにおける解析 .....	18
I-9：RHO-ROCK 経路とバリア機能との関係 .....	19
<b>II. 目的.....</b>	<b>20</b>
<b>III. 対象と方法 .....</b>	<b>21</b>
III-1：対象 .....	21
III-2：方法 .....	23
III-2-1：同時化学放射線療法（CCRT: concurrent chemoradiotherapy） .....	23

III-2-2 : 検体と免疫組織化学染色 .....	24
III-2-3 : 統計解析 .....	29
<b>IV. 結果 .....</b>	<b>30</b>
IV-1 : 再発率と生存率 .....	30
IV-2 : タンパク発現と予後の関係 .....	33
IV-2-1 : 全症例 .....	33
IV-2-2 : II期 .....	35
IV-2-3 : III期 .....	37
IV-3 : RHOA 発現と再発部位の関係 .....	39
IV-4 : RHOA 発現と他の転移浸潤に関わるタンパクとの関連 .....	41
<b>V. 考察 .....</b>	<b>43</b>
<b>VI. 結論 .....</b>	<b>47</b>
謝辞 .....	48
引用文献 .....	59
用語集 .....	60
出典 .....	63
参考論文からの修正点 .....	63
基金 .....	63
利益相反 .....	64

## 要旨

### 目的：

癌の浸潤や転移に密接に関連している Rho と ROCK の発現と、子宮頸癌の化学放射線療法後の予後との関係を明らかにすることを目的とした。

### 対象と方法：

II-III 期の子宮頸部扁平上皮癌と診断され、根治的な化学放射線療法を受けた 49 例の患者を対象とした。治療前の生検組織を用いて Rho, ROCK および p 53 の免疫組織化学染色を行い、それらの発現を基準により陽性群、陰性群に分類した。次に診療記録から患者の転帰情報を調査し、タンパク発現との関係を、統計学的に解析した。

結果：49 例のうち 40 例に相当する III 期の子宮頸癌患者において、RhoA 陽性群は陰性群に比べ、無増悪生存率と非遠隔転移生存率が統計学的に有意に低値であった ( $p = 0.045$ ,  $p = 0.041$ )。p53, RhoC, ROCK1, ROCK2 の解析では、いずれも予後に対する統計学的な有意差は認められなかった。

### 結論：

本研究により、子宮頸がん患者の化学放射線療法後の再発、特に遠隔転移の予測に RhoA の発現が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## I. 背景

### I-1：子宮頸癌の社会的背景

昭和 56 年以降，癌は本邦における死因の第一位を占める．我が国の癌対策の基本方針は，2006 年に成立したがん対策基本法に基づき，2007 年には第一次がん対策推進基本計画が制定された．その後，2012 年には第二次がん対策推進基本計画が，2018 年には第三次がん対策推進基本計画が制定されて現在に至る．子宮頸癌は，女性の悪性腫瘍の中でも主要な疾患の一つであり，特に検診の推進や背景となるウイルス感染の予防対策などが言及されている．

世界的に HPV ワクチンの予防的投与が実用化されており，長期的には子宮頸癌の罹患率は低下するものと予想されるが，日本では現時点でいまだに罹患数，死亡数とも増加傾向にある(1)．本邦においては年間で約 1 万 1 千人が罹患し，約 2800 人が子宮頸癌によって死亡している(2, 3)．特に，20-40 代の若い世代の罹患率の増加が相対的に多くなっており，2014 年度の本邦の統計では，全体の 46.4%を占めると報告されている．

子宮頸癌検診の普及により早期発見の割合が増加傾向ではあるものの，浸潤癌で発見されるものが 1/3 を占める(4)．

### I-2：子宮頸癌の発生要因

子宮頸癌のほとんどにヒトパピローマウイルス (HPV)，とくに HPV 16 型と 18 型の感染が関与していることが明らかになっている(5-7)．発生の機序としては，HPV が性的接触等を契機に子宮頸部粘膜に感染し，感染した細胞が軽度異

形成（CIN1：Cervical Intraepithelial Neoplasia 1 もしくは LSIL：Low grade Squamous Intraepithelial Lesion）となる。この状態では生体の免疫機能により自然消退することもあるとされている。しかし排除されないまま経過すると、HPV の DNA が細胞に組み込まれ、ウイルス由来のタンパク質が各種の癌抑制遺伝子を不活化し、数か月～数年を経て中等度異形成～高度異形成（CIN2～3，HSIL：High grade Squamous Intraepithelial Lesion），上皮内癌（CIS：Carcinoma In Situ）となり，その一部が浸潤癌へ至ると考えられている。McCredie らは，高度異形成（CIN3）を放置すると，その3割ほどが浸潤癌へ進展すると報告している(8)。

### I-3：子宮頸癌の病期分類と治療方針

子宮頸癌においては，TNM 分類と FIGO（国際産婦人科連合，International Federation of Gynecology and Obstetrics）(9)の定める FIGO 進行期の両方が進行期決定のための規約として用いられる。

TNM 分類は UICC(国際対がん連合，Union for International Cancer Control)の定める国際的な癌の病期分類である。それぞれの癌ごとに T（原発腫瘍の進展範囲），N（領域リンパ節への転移の有無と転移の範囲），M（遠隔転移の有無）の3つのカテゴリーで評価される。そして，それら3つの結果に応じてそれぞれの癌ごとに病期が決定される(10)。T の定義に関しては，TNM と FIGO 進行期は対応している。その一方で，FIGO 分類には TNM 分類の N（所属リンパ節転移）に該当する項目はない点が特徴である。

子宮頸癌の進行期の概略を(図 1)に示す.

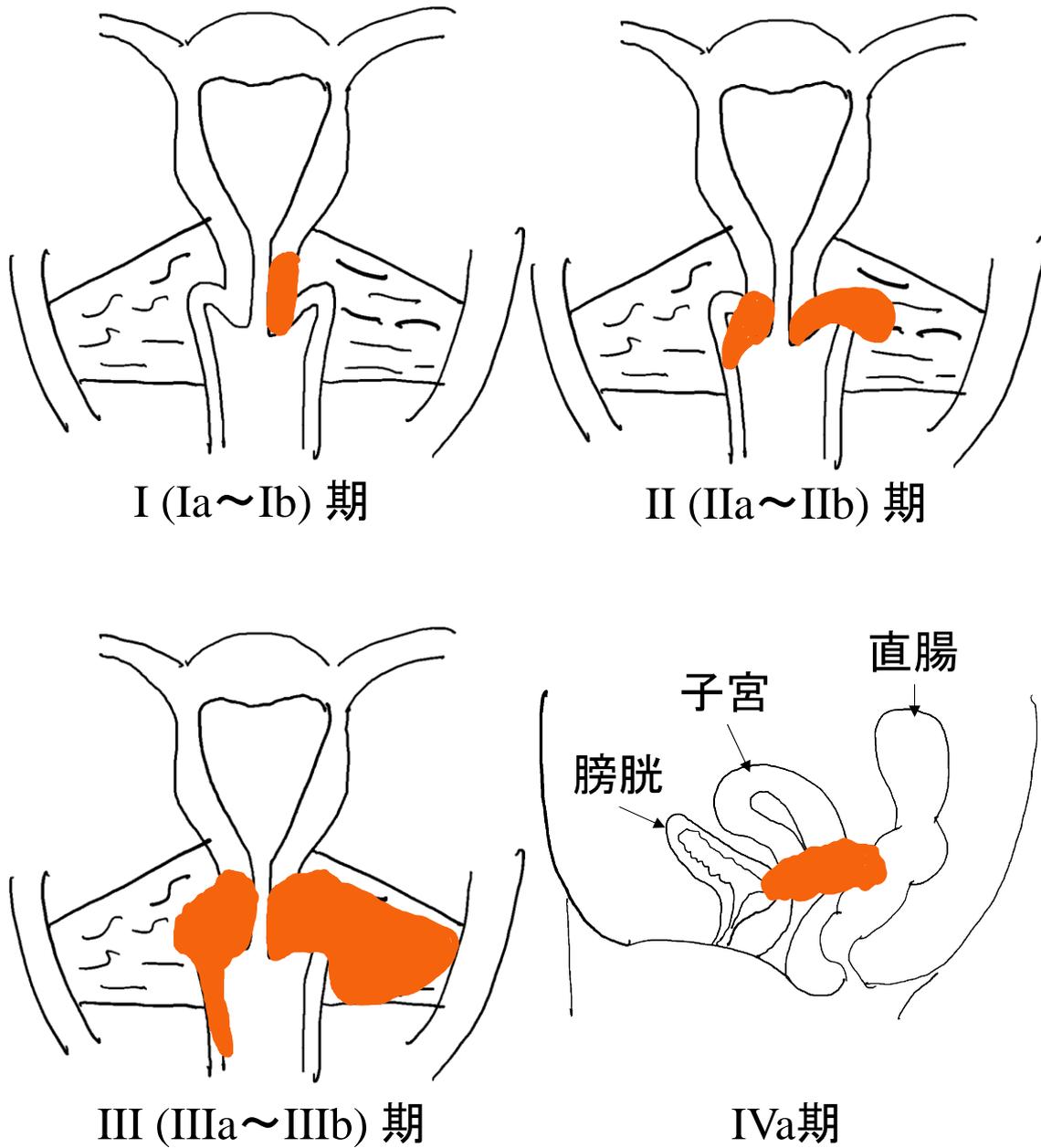
日本産科婦人科学会腫瘍委員会 (2016 年) によると, 発症時の病期は, IA 期 15.4%, IB 期 39.6% (I 期 亜分類不明 0.6%), II 期 22.9%, III 期 10.2%, IV 期 11.2%と報告されている. 旧来の 0 期 (同集計の CIN3 に相当) は, 同報告内では子宮頸癌とは別の疾患として集計されているが, 全体で 13,757 例 (I 期 ~IV 期の合計で 7,436 例) と報告されている. IA 期の治療は, 円錐切除が基本となるが, 深達度や組織型, 脈管侵襲の有無, 切除標本の断端の評価やその後の妊孕性温存の希望等により個別に考慮され, 単純子宮全摘術や準広汎子宮全摘術 (状況により +骨盤内リンパ節郭清), 広汎子宮全摘術まで選択肢になるとされている(11).

NCCN のガイドライン(12)およびわが国のガイドライン(11)では, IB から II 期では, 広汎子宮全摘とともに, 放射線療法が選択肢の一つとなっている. IIB 期以降の進行癌に対して, 本邦の術式 (岡林式系統的広汎性子宮全摘出術) はより根治性が高いと考えられており, 長らく積極的な手術が試みられてきた. 一方, 欧米では IIB 期から放射線療法 (化学療法併用を含む) が標準とされている. 日本産科婦人科学会腫瘍委員会の 2016 年の報告によると, IIB 期の子宮頸癌患者における根治照射を施行された割合は, 2004 年の 39%に対し 2014 年には 54%まで増加している.

III 期から IVA 期は, 周辺臓器が温存できないために本邦・欧米いずれも原則として手術適応がなく, 同時化学放射線療法 (CCRT: concurrent chemoradiotherapy) が標準治療とされる. IVB 期は孤立性の転移や全身転移が

あるものまで幅があり，病変の範囲と全身状態等により，全身療法として薬物療法が推奨されるが，局所コントロールによる QOL 向上のため，放射線療法がおこなわれることも多い。

子宮頸癌の病期分類と治療法を考えるうえで特徴的な問題点は傍大動脈リンパ節（PALN：para-aortic lymph node）転移の取り扱いである。TNM の分類に基づくと，PALN 転移は領域リンパ節転移とは扱われず病期分類では M1（遠隔転移）扱いとなる。しかし，他の遠隔転移がない場合，傍大動脈領域まで照射野を拡大した照射野（拡大照射野，extended-field）を用いた CCRT を施行することで，根治の可能性がある病態として考えられている(11)。現行の子宮頸癌の診療ガイドラインにおいても，他の遠隔転移がない PALN 転移を伴う子宮頸癌は，拡大照射野を用いた CCRT が考慮されるとしている(11)。筑波大学附属病院においても，局所進行期が IVA 期までで PALN 転移以外の遠隔転移がない症例は，個別に症例を検討した上で，根治的な CCRT の適応としている。画像検査により PALN 陽性と判断された症例に対する拡大照射野を用いた根治的 CCRT の治療成績は，Yoon らは 5 年の OS で 62.6%，DFS で 43.9%(13)，楮本らは 4 年の OS で 56.3%，DFS で 50.0%と報告している (14)。ただし，これらの報告では，PALN 転移陽性例は照射野外の遠隔再発が 36-50%と多いことが併せて報告されている。



- Ib : 子宮頸部に限局し，肉眼で病変が指摘できる
- IIa : 膣に進展するが膣の下 1/3 には達しない
- IIb : 子宮傍組織に浸潤する
- IIIa : 膣の下 1/3 に達する
- IIIb : 骨盤壁に達する
- IVa : 膀胱・直腸粘膜まで進展する

図 1. 子宮頸癌の進行期分類 (FIGO)

## I-4：子宮頸癌の放射線療法と化学療法

### I-4-1：子宮頸癌の放射線療法

放射線療法は、手術と同様に子宮頸癌の根治的な治療法である。本邦では進行癌に対しても積極的な手術が試みられてきた。しかし、近年では放射線療法そのものの進歩や併用する化学療法の進化もあり、放射線療法は手術と並ぶ子宮頸癌の標準的な治療選択肢として理解されている。

子宮頸癌の放射線療法は、骨盤全体に対する外部照射と高線量率の小線源治療（腔内照射）との組み合わせで行うのが標準的である。

外部照射は医療用の直線加速器（リニアック）で 6MV 以上の X 線を用い、直交 4 門照射または対向 2 門で一回 1.8 Gy から 2 Gy の週 5 回法の分割照射で行われる。わが国では、総線量約 30 Gy 程度で中央遮蔽が挿入される。腔内照射は用いる線源の違いにより、低線量率（Low Dose Rate: LDR）と高線量率（High Dose Rate: HDR）の 2 種類がある。現在は世界的に専ら HDR 線源（放射性イリジウム：Ir-192）による遠隔操作式後充填法（Remote After Loading System: RALS）が用いられている。腔内照射は（図 2）のように、通常は膣・子宮腔内に留置するタンデムアプリーケーターと、膣円蓋部に留置するオボイドアプリーケーターの 2 つの組み合わせで行うマンチェスター法（図 2A, 2B）が一般的である。子宮頸癌の解剖学的進展様式にあわせて、洋梨形の線量分布を作成することを目的としている（図 2D）。古典的には二次元(2D)的な治療計画で、A 点（外子宮口および膣円蓋部から頭側および外側にそれぞれ 2cm）に対して 1 回 5-7 Gy/回が処方されて来た（図 2D）が、現在は CT や MRI の画像をベースと

した三次元 (3D)的な治療計画が普及してきており (図 2C), 腫瘍や近接するリスク臓器に対する処方線量がより正確に評価, 調整できるようになっている. これを3次元治療計画による画像誘導小線源治療 (3D- Image-guided brachytherapy: IGBT) といい, 当院でもこれを実際の治療に用いている.

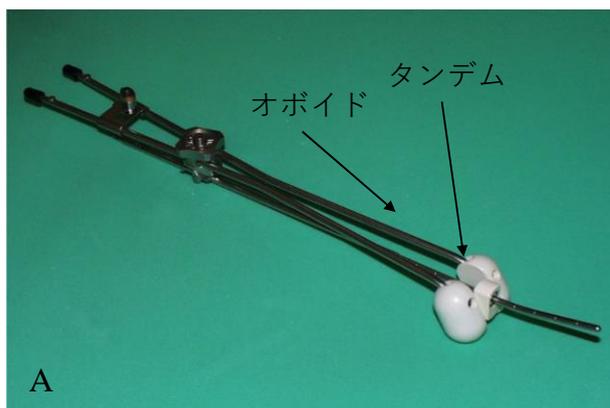


図2A. 腔内照射用アプリケータの一例  
(Fletcher-Williamson Asian Pacific applicator)

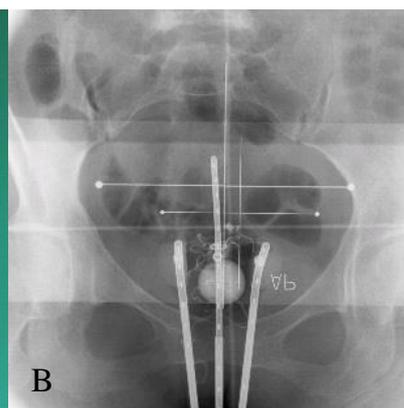


図2B.レントゲン写真による線源の三次元的な位置関係の同定

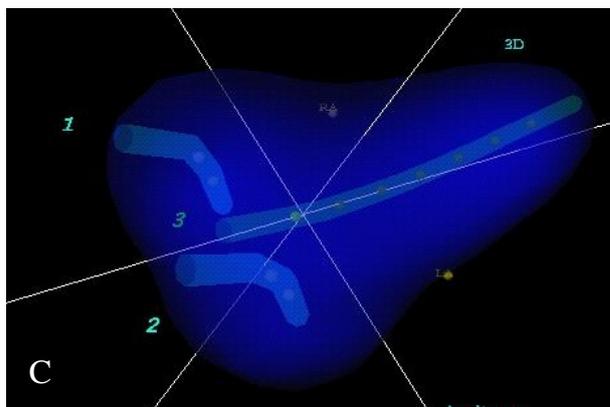


図2C. シミュレータによる線源の三次元的な位置関係の同定

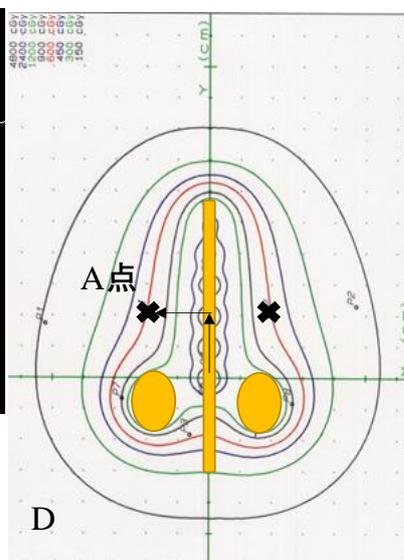


図2D. シミュレータによる腔内照射の線量分布

## 図 2. 子宮頸癌に対する腔内照射

- A:腔内照射に使用する道具 (アプリケータ: タンデムとオボイドを組み合わせたもの). タンデムとオボイドは中空構造になっており, 放射性イリジウム線源が治療時に挿入され, 放射線照射が行われる.
- B:タンデム (中央), オボイド (左右) の実際の配置例. タンデムが子宮腔内に挿入され, オボイドが子宮腔部に配置される.
- C:放射線治療計画装置による, 三次元の線量分布計算. コンピュータシミュレーションで線源の停留時間を調整することにより, 三次元空間上での線量分布が計算できる.
- D:古典的な二次元の線量処方 (A 点処方). 洋梨型の線量分布を作成する.

#### I-4-2：子宮頸癌に用いられる化学療法

CCRTにおける標準的な化学療法はシスプラチン（CDDP: cis-Diammineplatinum (II) Dichloride), 40 mg/m<sup>2</sup>, 週1回投与, 計5~6コース投与とされている。その他, CDDP+5-FU, CDDP+パクリタキセル (PTX, Paclitaxel) などが用いられてきた。CDDP単剤と多剤併用 (CDDP+5-FU) のCCRTの比較においては, 両者間で長期予後には差がなく, Grade3以上の特に血液毒性に代表される急性期有害事象が多いことが報告されている(15)。そのため, 日本では放射線療法との併用レジメンとして, CDDP単剤が広く用いられている。

1980年代~90年代前半までは放射線療法前の化学療法 (NAC : Neoadjuvant Chemotherapy) の有効性が検討されたことがあった。しかし, 化学療法を放射線療法前に追加しても, 全生存率, 無増悪生存率, 局所再発率, 遠隔転移再発率のいずれも改善が認められなかったため(16), 現在の実臨床ではNACを施行しないのが一般的である。

また, 再発時にもCDDPがキードラッグとして用いられるほか, PTX, イリノテカン (CPT-11, Irinotecan hydrochloride hydrate) などと併用される。また, もともと併存疾患等により腎機能が低下している, とくに再発癌で水腎症をきたしている症例などは腎毒性の強いCDDPは投与しづらい。その際に, 同じ白金製剤として, 腎毒性の低いカルボプラチン (Carboplatin, CBDCA) が用いられることがある。

## I-5：子宮頸癌における遠隔転移の位置づけ

子宮頸癌の CCRT は、放射線療法 (RT) 単独よりも優れた治療成績を得られることが既に知られている。過去のランダム化試験では、CCRT 後の患者の 81% で局所領域制御が得られたが、RT 単独投与を受けた患者の 65% のみが局所領域制御を達成し、CCRT および RT 単独群の全生存率 (OS) はそれぞれ 73% および 58% であったことが示されている(17)。

さらに子宮頸癌に対する放射線療法のうち、組織内照射や画像誘導小線源治療などの小線源治療における技術革新は、さらなる良好な局所腫瘍制御と生存率に貢献してきた(18)。しかし、すぐれた局所制御効果にもかかわらず、再発や遠隔転移により生存率は現代においてもいまだ満足なものとは言えない。

FIGO 臨床病期別の 5 年生存率は、I 期：80~90%、II 期：60~80%、III 期：40~60%、IVA 期：10-20% である。

子宮頸癌の遠隔転移の制御と再発率の改善に関して、Vale らのグループは、18 のランダム化比較試験のメタ解析により、CCRT 後の追加の化学療法が微視的な遠隔転移を抑制し子宮頸癌の生存率を向上させると報告している(19)。現在の標準的な CCRT に化学療法を追加して予後の改善を図るものとして、CCRT と CCRT+TC 療法を比較する臨床試験 (OUTBACK 試験) がオーストラリア、ニュージーランドのグループを中心に進行中である(20)。

今後新たな研究により、CCRT 後の補助化学療法を施行すべき患者群を決定できれば、子宮頸癌のさらなる予後の改善に寄与する可能性があると考えられる。

## I-6 : Rho の作用と情報伝達

Rho ファミリーGTPase は Ras に類似した低分子量 G タンパク質であり，不活性なグアノシン三リン酸（GTP）結合型と活性化型の GTP 結合型の間を循環し，下流のターゲットと相互作用する(21)（図 3）. Rho は細胞骨格のダイナミクスを調節し，それによって細胞の運動性や極性を含む複数の細胞機能に影響を与える(22, 23). 1985 年に初めて Rho の存在が報告され，その過剰発現によりアクチンからなるストレスファイバーが形成されることが報告された(24, 25). ヒトでは，Rho ファミリーは 8 のサブファミリーと 20 のメンバーで構成される(21). Rho サブファミリーには，RhoA, RhoB, および RhoC のアイソフォームが含まれ，これらは配列が 84% 同一であり，ほとんどの違いは C 末端付近に集中している(26).

Rho の作用は，細胞間マトリックス接着，細胞遊走，神経突起の退縮，細胞質分裂，細胞周期の G1→S 相進行，癌化など，多岐にわたる(27-33). これらの一見多様なアクションのほとんどは，アクチン細胞骨格の時間空間特異的な再編成によって発揮される．たとえば，細胞間マトリックス接着は，間期線維芽細胞においては細胞接着斑とストレスファイバーの形成として見られるが，ストレスファイバーは接着斑に固定されるアクトミオシン繊維の束であり，Rho はこれらの構造の形成に加わる(32). また，ストレスファイバーは有糸分裂中に消えるが，Rho は分裂期では分裂面にアクトミオシンの束から構成される収縮リングを形成することにより，細胞質分裂を開始および実行する(29). このように Rho は，細胞周期に応じてさまざまな場所で特定のアクチン細胞骨格

を誘導する(33).

このような Rho の機能は、下流エフェクター分子に対する活性化 Rho の作用によって発揮される。主なエフェクター分子は、タンパク質リン酸化酵素 ROCK (Rho 結合キナーゼ) とアダプター分子 mDia である(34,35)。ROCK は、N 末端にキナーゼドメイン、中央にコイルド・コイル形成領域、C 末端に膜結合ドメインを持つ分子量 160 K のセリン・スレオニンリン酸化酵素である。ROCK の働きは、様々な変異体と特有の阻害剤 Y-27632 を用いて解析され、いくつかの経路によってアクチン骨格を制御することが解明された(34,36)。1 つ目はミオシン脱リン酸化酵素の不活性化とミオシン軽鎖に対する直接リン酸化で、ミオシンを活性化しアクトミオシンの収縮力を誘発する(37)。2 つ目は LIM キナーゼの活性化で、活性化された LIM キナーゼはアクチン結合タンパク質コフィリンを不活性化する(34)。その結果、コフィリンのアクチン脱重合活性は抑制され、線維化アクチンの増加が誘発される。3 つ目として、1 型 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換体に対する作用があり、ROCK によりリン酸化し活性化される(38)。この活性化により、交換体とアクチンアクチンである ERM タンパク質の結合が誘導され、ROCK の作用が細胞膜への結合に寄与する。このような ROCK の作用は同時に細胞膜に結合したアクトミオシン束の形成を誘導する。

一方、mDia は細胞極性に関与する Formin タンパク質の 1 つであり、N 末端の Rho 結合領域に加えて、Formin タンパク質群で保存性の高い FH1, FH2, FH3 領域を有する(35)。このうち、FH1 は poly-proline 配列が豊富で、これを介してアクチン結合タンパク質プロフィリンを結合する。これにより、線維化ア

クチンの増加が引き起こされる。また、FH2 領域は微小管の配向に關与する。これらの結果は、mDia が 2つの細胞内微小管とアクチン骨格を統合し、それによって細胞内のアクチン束の Rho 依存的な配置を決定することを示している(39)。また、ROCK と mDia は協調してストレスファイバー誘導を起こす(40)。

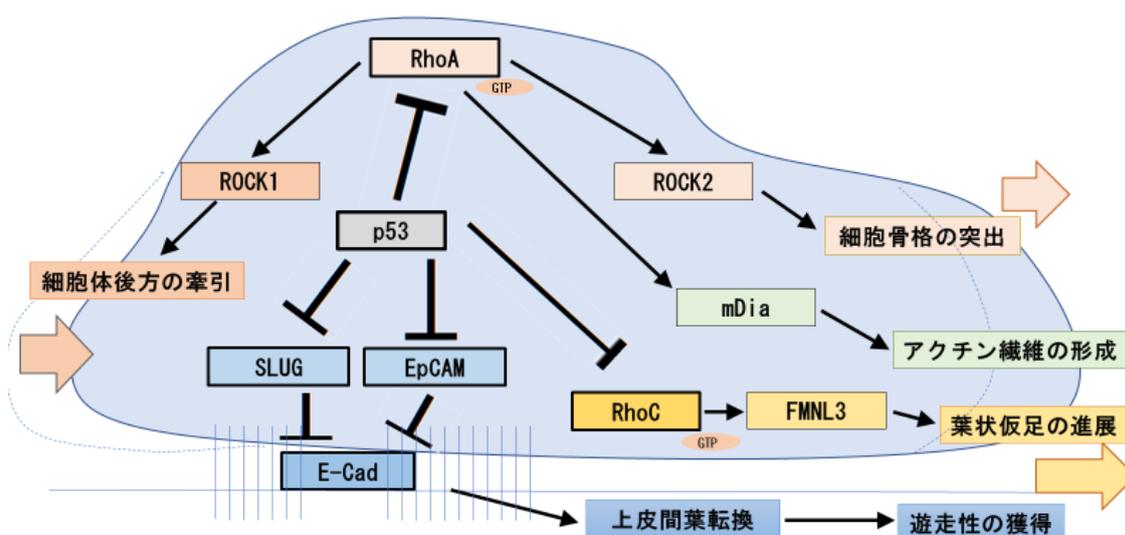


図 3. 細胞の移動における Rho-ROCK 経路の役割

## I-7：細胞遊走及び方向性と Rho ファミリー

方向性をもった細胞遊走は、細胞のアクチン細胞骨格と細胞外基質 (Extracellular matrix : ECM) を接続し、機械的な力を伝達するインテグリン含有フォーカルアドヒージョン (Focal adhesion : FA) に依存する(41,42). フォーカルアドヒージョンの形成と細胞遊走は、細胞外から誘導に応じ、細胞後縁でのアクチンベースの収縮繊維、細胞前縁での突起の動的な再編成がそれぞれ必要である(43,44). Rho ファミリーにより制御される細胞遊走は、正常組織の発生、増殖、成熟だけでなく、癌や慢性炎症などの様々な病態生理学的状態の制御に関与する.

細胞の移動は進行方向への細胞突起、つまり糸状突起 (フィロポディア)、膜状突起 (ラメリポディア) の進展と先端部での細胞外基質への接着、これを支点にしての胞体の牽引と尾部の脱離が繰り返されて行われる (図 4). これらの運動はアクチン骨格の時空間的編成によって行われている. Rho ファミリー GTPase は、細胞突起の形成、伸長、退縮、分解に必要なアクチンフィラメントの動的な集合と分解を Rac 及び Cdc42 の制御下で細胞の前縁で行い、さらに収縮性アクトミオシン線維の動的な集合と分解を RhoA の制御下で細胞の後端で調節している(32, 45, 46). また、興味深いことに、RhoA は細胞の前縁においても活性化される(47, 48).

RhoA シグナル伝達を阻害するとアクチンストレス線維形成が阻害されることから、細胞と ECM 間の相互作用の制御における Rho-ファミリーGTPases の重要性が明らかとされた(32, 42). 活性化した RhoJ は、インテグリン含有フォ

ーカルアドヒージョンに局在化し、その解体を制御する。一方、GTP 結合型 RhoJ は、Rac などから構成されるマルチタンパク質複合体をフォーカルアドヒージョンへと輸送し、RhoA の活性化を妨げつつ Rac1 と Cdc42 の活性化を促進する(49,50)。この結果、RhoA の活性とアクチン収縮の低下を伴うフォーカルアドヒージョン解体と運動性の増加が生じる(32, 49-51)。

Rho ファミリーが介在するアクチン細胞骨格再編成は、細胞外からの誘導に対する細胞の方向性応答に必須である。この方向性応答にはアクチン細胞骨格の動的な再編成が必要であり、細胞外情報をアクチン細胞骨格へと中継するシグナル伝達分子として、Rho ファミリーが機能する(41-44)。

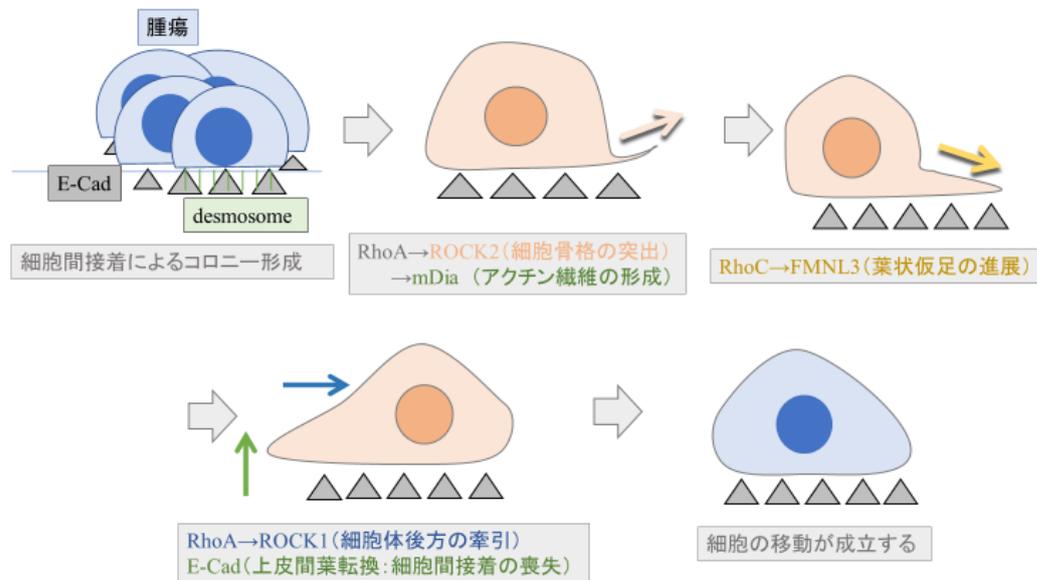


図 4. 細胞の移動と形態変化における Rho-ROCK 経路の働き

## I-8 : 臨床及び *in vivo* 転移モデルにおける解析

実際の臨床においても Rho 遺伝子の発現は転移との関連で調査されてきた。Rho-ROCK 経路の活性化は、膀胱癌、喉頭癌、乳癌などのいくつかの癌の進行との関連が指摘されている (53-55)。前立腺癌などいくつかのタイプの癌においては、本経路の発現低下または阻害による治療の可能性が記載されている (52)。Rho-ROCK 経路は腫瘍の転移に関わる主要な経路の一つと考えられ、それらの発現度は腫瘍の悪性度や転移の頻度と関連していると考えられる (52-55)。例えば、膵管癌症例と正常な膵臓組織での Rho の発現を比較した研究では、癌組織で有意に発現が高く、転移巣では原発層に比べて発現が高く、転移浸潤性の癌はそうでない癌に比べ高発現し、発現が高い群は低い群に比べ予後が悪いことが報告されている (56)。この成果はマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析によっても裏付けられており、ヌードマウスにヒト及びマウス由来の悪性黒色腫細胞を移植し、これにより生じた肺転移巣から細胞を回収して *in vitro* で培養する操作を繰り返すことで、原株に比べてより高い転移能を有する亜株を樹立し、マイクロアレイ解析結果から転移能亢進に関与する遺伝子の同定が行われた。その結果、転移性の高い株では、フィブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質に加えて RhoC の高発現が見つかり、RhoC を低転移性細胞に導入すると転移能の亢進を誘導した (57)。

他方、ROCK 阻害剤 Y-27632 の発見により、*in vivo* での個々のレベルでの転移性浸潤における Rho-ROCK 経路の役割を分析することが可能になった。Itoh らは、ラットの腹腔内にラット肝癌由来 MMI 細胞を注入した腹膜播種モデル

を用い、ROCK 阻害剤の持続注入により腹水の蓄積が減少し、播種及び腫瘍形成も有意に減少することを示した(58). Takamura らは、ヒト肝癌細胞を SCID マウスの肝臓に漿膜下に注射した肝内転移モデルを用い、ROCK 阻害剤の継続腹腔内投与により、肝内転移の頻度が減少し、注射部位での肝類洞への腫瘍細胞の浸潤が抑制されたことを明らかにした(59). これらの結果は、in vivo の転移・浸潤過程における Rho-ROCK 経路の重要性を示唆する所見である.

#### I-9 : Rho-ROCK 経路とバリア機能との関係

癌が宿主の細胞層を通り抜けるには2つの重要な要素があり、1つが癌細胞の接着能と遊走能であり、もう1つは宿主細胞層のバリア機能である. 前者における Rho-ROCK 経路の重要性については上述したが、後者においても本経路は重要な役割を果たすことが知られる. 宿主細胞層は細胞間結合、すなわちタイトジャンクションにより外部からの分子の通過を防いでおり、これがバリア機能の要因である. タイトジャンクションは炎症性刺激により漏出しやすくなることが知られており、そのタイトジャンクションの開放機構に Rho-ROCK 経路が関与していることが明らかになった(60). これに関する研究成果はまだ十分ではないが、癌細胞が宿主細胞層に付着すると何らかのシグナルが発生し、Rho-ROCK 経路が活性化され、タイトジャンクションが開く可能性が示唆されている.

## II. 目的

他の癌では、Rho-ROCK 経路の発現が癌の悪性度、転移の頻度や予後などと相関することや、この経路の阻害薬が腫瘍の浸潤を抑制することが既に報告されている。しかし、子宮頸癌においては、この経路の発現と癌の悪性度、転移の頻度や予後との関係はいまだ明らかでない。

子宮頸癌の転移再発のリスクとこれらのタンパクの発現の関係を示すことができれば、ハイリスクな症例に追加の化学療法を行うなど、治療の最適化と予後の改善に繋がる可能性があると考ええる。

よって本研究では、癌の浸潤や転移に密接に関連している Rho と ROCK の発現と、子宮頸癌の CCRT 後の転帰との関係を明らかにすることを目的とした。

### III. 対象と方法

#### III-1 : 対象

筑波大学附属病院では、2008年3月から2014年6月までに、148人の子宮頸部扁平上皮癌患者が標準的なCCRTを受けていた。患者の背景をそろえるために、国際産科婦人科連合分類(9)で、Ⅱ期およびⅢ期の症例のうち、組織型が扁平上皮癌で、CCRT前に当院で腫瘍生検が行われており、組織標本の作製が可能な49例を対象とした。

患者の特徴を表1にまとめた。患者の年齢中央値は治療開始時点で55歳(27~75歳)であった。合計41人の患者に治療開始前の画像検査で指摘されたリンパ節転移があり、5人にPALNへの転移が認められた。陽性と診断されたリンパ節の大きさの中央値は18.8mm(範囲:8~74mm)であった。すべての患者は、1ヶ月から最長で3か月おきの間隔で定期的にフォローアップされ、内診およびCT、MRI等の画像検査を含む追跡調査が行われた。追跡期間中央値は解析時の2016年1月時点で40.1カ月(範囲:2.3~80.1カ月)であった。

本研究は筑波大学附属病院倫理審査委員会において審査、承認された(H26-054)。

表 1. 患者背景

項目	患者数 (%)
年齢	
<59	30 (61)
60-69	17 (35)
70-	2 (4)
全身状態 (PS)	
0	37 (76)
1	11 (22)
2	1 (2)
FIGO臨床病期	
IIA	2 (4)
IIB	7 (14)
IIIA	2 (4)
IIIB	38 (78)
リンパ節転移	
陽性	41 (84)
陰性	8 (16)
化学療法	
4コース	5 (10)
5コース	44 (90)
放射線治療 (外照射)	
全骨盤30 Gy +中央遮蔽20 Gy	43 (88)
全骨盤40 Gy +中央遮蔽10 Gy	4 (8)
全骨盤45 Gy +中央遮蔽5.4 Gy	2 (4)
放射線治療 (PALNへの追加照射)	
なし	44 (90)
あり (50Gy / 25 fr)	5 (10)
放射線治療 (腔内照射)	
12 Gy / 2 fr	1 (2)
24 Gy / 4 fr	42 (86)
30 Gy / 5 fr	6 (12)

略語: FIGO = 国際産婦人科連合, PALN = 傍大動脈リンパ節

## III-2. 方法

### III-2-1：同時化学放射線療法（CCRT: concurrent chemoradiotherapy）

放射線療法は、標準的な子宮頸癌の放射線療法に準じ(61)、骨盤全体に対する外照射と、腫瘍局所への高線量率の小線源治療（腔内照射）との組み合わせで実施した。外照射は直線加速器（Varian 社製 iX）による 10MV の X 線を用い、4 方向のボックス照射もしくは前後対向の 2 門照射で実施した。原則として、全骨盤領域に 30Gy/15 回の処方後、中央遮蔽を挿入した照射野でさらに 20Gy/10 回を投与したが、病巣の大きさや形状を考慮し、全骨盤照射の線量を増加した症例が 6 例あった。治療開始時点で PALN 転移があり、PALN の照射が必要な症例は、中央遮蔽挿入後に PALN の照射を開始した。PALN に対する線量分割は 50Gy /25 回を用いた。腔内照射は、イリジウム線源を用いた小線源治療装置（ヌークレトロン社製マイクロセレクトロン HDR）を用いた。マンチエスター法に準じて、A 点（外子宮口から子宮腔軸に沿って 2cm 頭側かつ 2cm 外側の点）を線量評価点とし、1 回 6 Gy を基本の処方とし、さらに適宜 3 次元線量分布の評価により全体の線量分布を最適化した。腔内照射は週に一回で計 4 回を原則としたが、全骨盤への外照射線量とのバランスを考慮して 6 例で 5 回、1 例で 2 回とした症例が認められた。

同時併用化学療法は、放射線療法中に週 1 回のシスプラチン（CDDP）を、1 コースで体表面積 1 平方メートルあたり 40mg の容量で投与した。合計で 5 回 /5 週の投与を目標とした。48 例にシスプラチン投与が行われたが、シスプラチンに投与に伴う心負荷を理由とし、カルボプラチンが投与された症例が 1 例認

められた。

### III-2-2：検体と免疫組織化学染色

本研究の対象となる患者の腫瘍において、腫瘍の悪性度、転移性、浸潤性を評価するため、癌抑制遺伝子 p53 と癌の転移及び浸潤で重要な役割を担う Rho-ROCK 経路に関わる種々のタンパク質の発現変化を調べることとし、その手法として免疫組織化学染色を用いた。CCRT 前の全 49 人の子宮頸癌患者から採取した腫瘍片を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンにて包埋してブロックを作成した。ブロックから厚さ 2 $\mu$ m で切片を切り出し、65°Cで 1 時間乾燥させた後、100%キシレンで 5 分間脱パラフィン化し水洗した。次いで、pH=6.0, 100mM のクエン酸緩衝液（武藤化学, 10291）を用いて 115°Cで 10 分間加熱処理し、pH=9.0 の Target Retrieval Solution（Dako, S2367）を用いて 105°Cで 10 分間抗原賦活化処理を行った。その後水洗し、ペルオキシダーゼブロッキング溶液（Dako, S2023）で 5 分間ブロッキングを行った。洗浄バッファー（Dako, S3006）で洗浄し、抗体希釈液（Dako, S2022）を用いて各種抗体を希釈し、30 分間の一次抗体反応を行った。染色の条件を表 2 に示す。

表 2. 一次抗体条件一覧

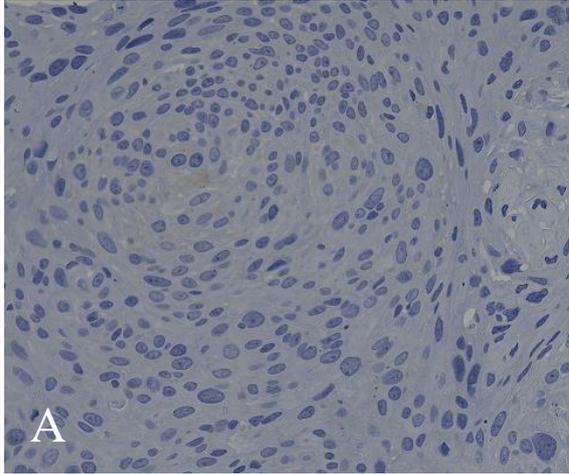
Protein	Company	Product number	Species Cross-Reactivity	Isotype	Dilution
p53	Dako	M700101	human	Mouse IgG	×100
RhoA	Proteintech	10749-1-AP	human	Rabbit IgG	×100
RhoC	Abgent	ABG AP14105B	human	Rabbit IgG	×100
ROCK-1	Atlas antibodies	HPA007567	human	Rabbit IgG	×100
ROCK-2	Atlas antibodies	HPA007459	human	Rabbit IgG	×200

一次抗体反応後、切片を洗浄バッファーで洗浄後水洗し、EnVision+ Dual Link System-HRP (Dako, K4061) を用い、30 分間の二次抗体反応を行った。その後、DAB+ Substrate Chromogen System (Dako, K346) を用い、基質緩衝液 DAB+ Substrate Buffer 1mL に発色基質 DAB+ Chromogen 1 滴の割合で混合して、染色処理を行った。その後、再度洗浄バッファーで洗浄し、Tissue-tek Hematoxylin 3G (Sakura Finetek Japan Co.,Ltd, 8656) で 5~10 秒の対比染色 (核染色) を行った。その後水洗し、アルコールとキシレンを用いて脱水処理を行った。

作成した各染色切片を実体顕微鏡 (Keyence, BZ-X710) 下で観察し、各試料について最低 5 枚の独立した写真を撮影した。免疫組織化学的染色による各タンパク質の発現評価基準は、先行研究で用いられている染色強度と陽性細胞数割合の 2 つのパラメータを定量スコア化し、その積によるスコアを最終的な発現評価スコアとして用いた(62-64)。また、陽性の内部コントロールとしては、筋上皮細胞または血管平滑筋細胞の染色レベルを用いた。染色強度は strong (+++), moderate (++) , faint (+), または negative (-) の 4 段階にスコア化し、強度に応じて strong は 3 点, moderate は 2 点, faint は 1 点, negative は 0 点とした。ついで、陽性細胞数割合については撮影した 5 枚の写真から細胞の重なり等がなく、発色がよく陽性のコントロールが腫瘍細胞の近傍にあると判断した領域を、計数する領域として設定した。そこから 500 個以上の細胞数を計数し、陽性細胞数割合が 0~25% は 1 点, 26~50% は 2 点, 51~75% は 3 点, 76~100% は 4 点として 4 段階にスコア化した。最終的な発現評価スコア

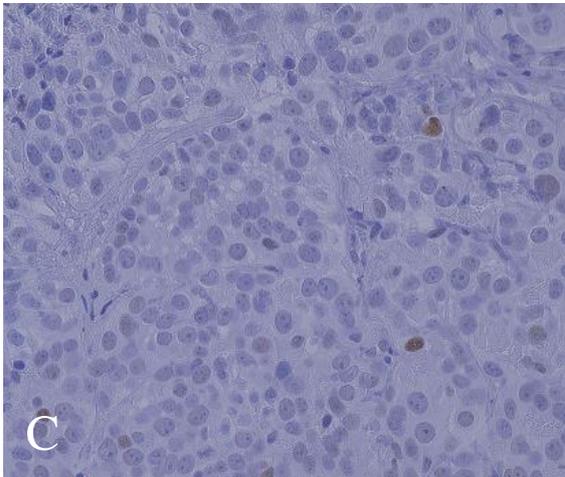
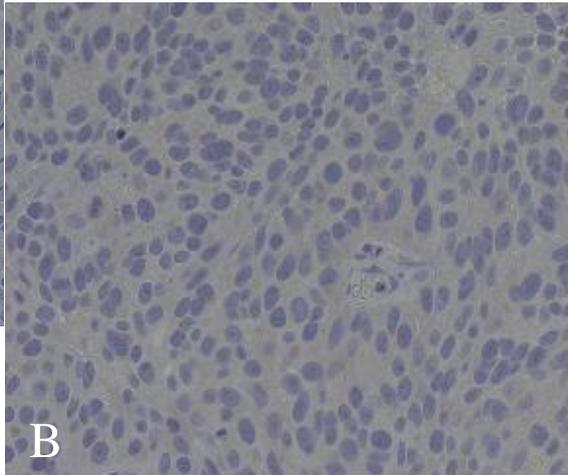
による陽性判断基準は、RhoA, ROCK-1, ROCK-2 は 4 以上, RhoC は 6 以上とした。一例として、ある検体における RhoA の発現について、染色強度が moderate (++) で陽性細胞の割合が 60%であった場合、強度スコア 2 x 割合スコア 3 でこの検体の最終スコア 6 となり陽性と判定した。また、p53 に関しても先行研究の方法を採用し、陽性細胞の割合が 10%未満であれば陰性、10%以上であれば陽性と判定した(63)。本研究における免疫組織化学染色の代表的な画像を(図 5)に示す。

免疫染色の評価は、3 人の独立した本研究に関わる観察者（田中、松本および石川）によって行われた。各評価者の点数評価が異なる場合は、最も経験のある研究者（石川）の判断を最終的なコンセンサスとすることを予め取り決め、評価を開始した。実際には、評価者間で陽性陰性のスコアが逆転するような評価の解離はなかった。



↑ 図5A. Rho A 陰性例  
 染色強度:弱  
 陽性細胞数:0~25%

↓ 図5B. Rho A 陽性例  
 染色強度:中  
 陽性細胞数:76~100%



↑ 図5C. p53 陰性例  
 陽性細胞数:3.75%

↓ 図5D. p53 陽性例  
 陽性細胞数:26.24%

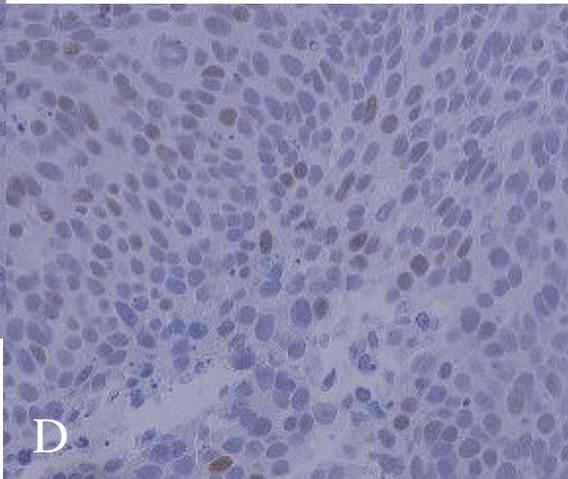


図 5. 免疫組織化学染色による陰性腫瘍と陽性腫瘍の例

### III-2-3 : 統計解析

統計解析は、IBM 社の SPSS Ver.22.0 を用いた。RhoA, RhoC, ROCK-1, ROCK-2, および p53 のタンパク発現を陽性群と陰性群に分類した。その後、群ごとに、全生存率 (OS : overall survival), 無増悪生存率 (PFS: progression free survival), 局所制御率 (LC: local control rate), 非遠隔転移生存率 (DMFS: distant metastasis free survival) を Kaplan-Meier 法を用いて算出した。照射野内の再発を局所再発と定義し、照射野外の再発を遠隔転移と定義した。有意差検定は、2 群間のログランク検定を用いて実施し、 $P<0.05$  の場合に、統計学的な有意差があると判断した。

また、タンパクの発現と患者背景およびタンパク発現同士の独立性は、サンプル数が少ないことから、イエーツの補正を適応したカイ 2 乗検定を用いて算出した。ログランク検定と同様に、 $P<0.05$  の場合を統計学的な有意差ありと判断した。

#### IV. 結果

##### IV-1：再発率と生存率

全例の3年時点でのOS, PFS, LC, DMFSは、それぞれ88.4%、65.9%、88.4%、73.2%であった（図6）。II期の患者の3年時点でのOS, PFS, LC, DMFSは、それぞれ100.0%、63.5%、100.0%、76.2%であった。III期の患者の3年時点でのOS, PFS, LC, DMFSは、それぞれ90.5%、65.6%、88.1%、74.0%であった。II期とIII期の患者群間のOS, PFS, LC, DMFSいずれも有意差はなかった（図7）。

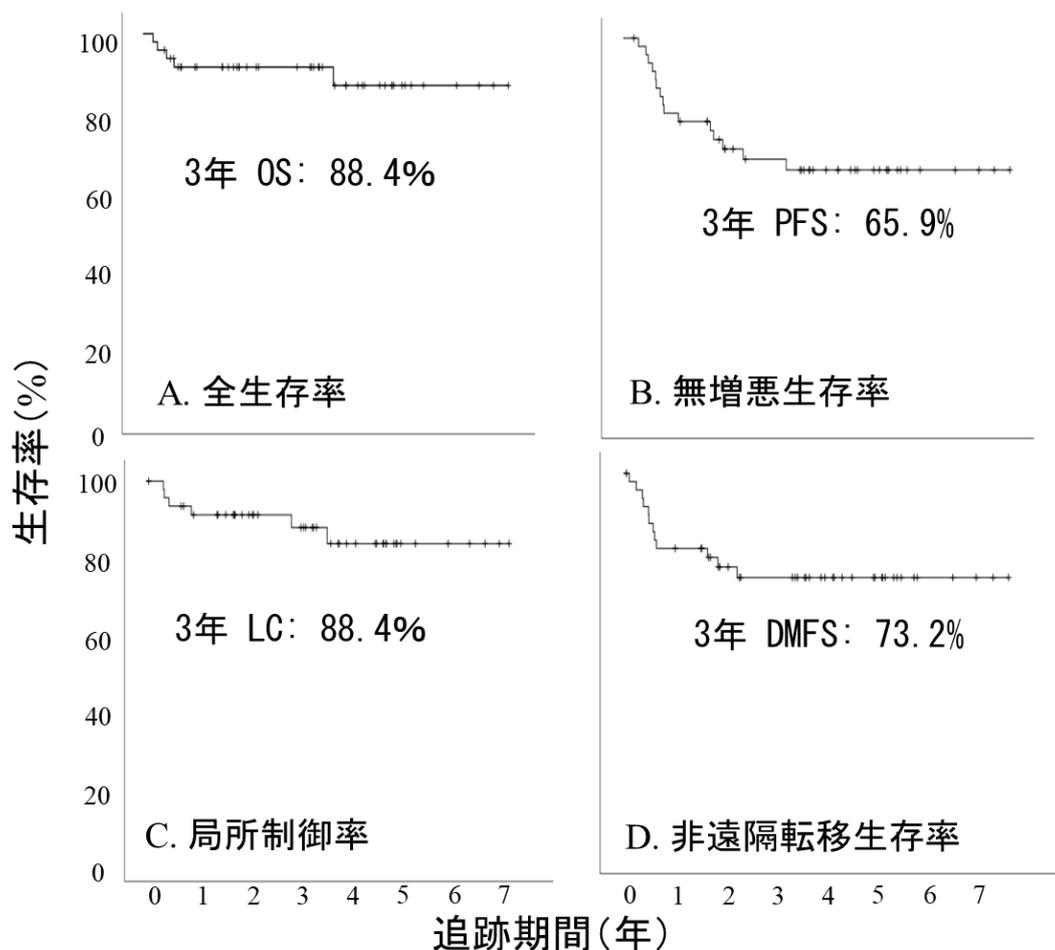


図6：II期・III期 全49例における生存率

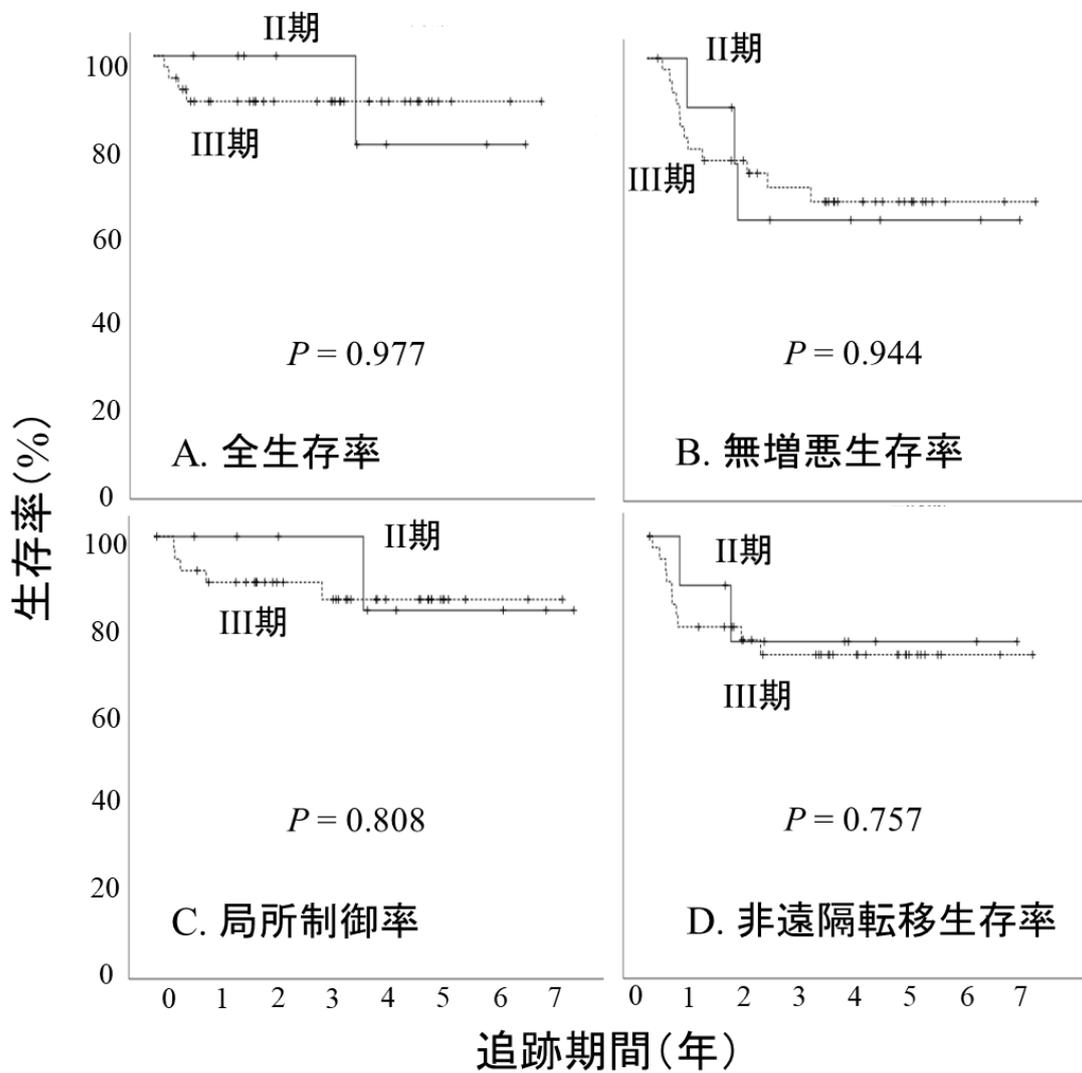


図7：II期・III期間の生存率の比較

本研究における追跡調査の時点で、33例の患者が無増悪で生存し、9例の患者が再発の状態に生存していた。5例の患者は腫瘍再発で死亡しており、2例は子宮頸癌とは別の疾患が原因で死亡していた（そのうち1例は子宮頸癌が再発した状態で死亡し、もう1例は再発のない状態で死亡していた）。全49例のうち6例（12%）に局所再発が認められ、12例（24%）に遠隔再発が認められた（表3）。

表3.治療後の再発部位と頻度

再発の有無	部位		
	局所・領域 (%)	遠隔 (%)	全体 (%)
II期 + III期 (49症例)			
+	6 (12)	12 (24)	15 (31)
-	43 (88)	37 (76)	34 (69)
II期 (9症例)			
+	1 (11)	2 (22)	3 (33)
-	8 (89)	6 (67)	6 (67)
III期 (40症例)			
+	5 (13)	9 (23)	11 (28)
-	35 (88)	31 (78)	29 (73)

## IV-2 : タンパク発現と予後の関係

### IV-2-1 : 全症例

全症例でのタンパク発現と予後との関連について表 4, 図 8 に示した. 各タンパクの発現と予後との関連は明らかでなかった.

表 4 : II 期・III 期 全 49 例における各タンパクの発現と予後の関係

発現	数 (n)	全生存率		無増悪生存率		局所制御率		非遠隔転移生存率	
		3年 割合(%)	<i>P</i> 値						
RhoA									
+	28	88	0.755	58	0.102	80	0.132	66	0.121
-	21	87		80		100		84	
RhoC									
+	34	91	0.629	63	0.631	89	0.474	72	0.673
-	15	90		72		87		79	
ROCK-1									
+	36	94	0.122	67	0.541	90	0.895	76	0.527
-	13	82		61		84		69	
ROCK-2									
+	24	92	0.882	69	0.692	87	0.988	83	0.294
-	25	90		62		88		66	
p53									
+	9	83	0.822	62	0.899	89	0.851	62	0.761
-	40	92		66		88		76	

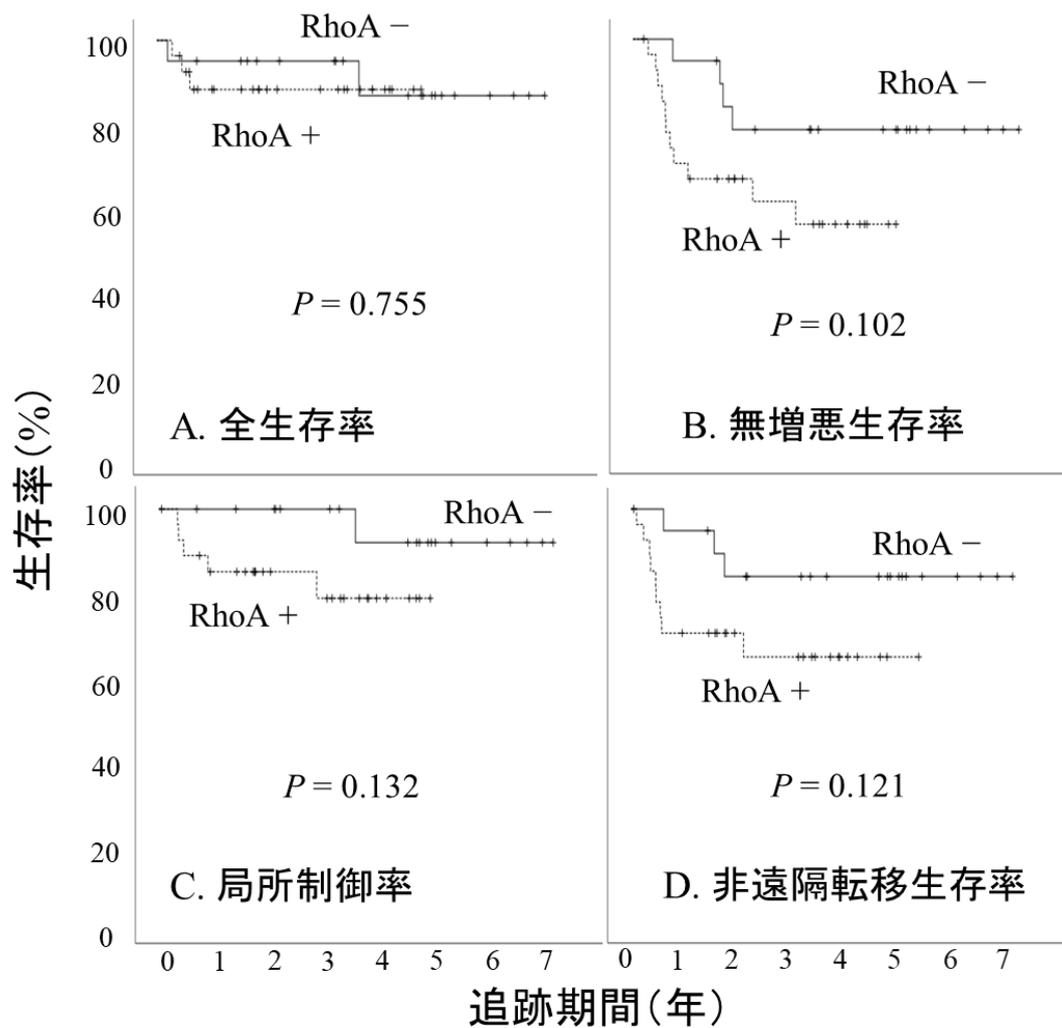


図 8 : II 期・III 期 全 49 例における RhoA の発現と予後の関係

IV-2-2 : II 期

II 期症例でのタンパク発現と予後との関連について表 5, 図 9 に示した. 各タンパクの発現と予後との関連は明らかでなかった.

表 5 : II 期 9 例の各タンパクの発現と予後の関係

発現	数 (n)	全生存率		無増悪生存率		局所制御率		非遠隔転移生存率	
		3年 割合(%)	P値	3年 割合(%)	P値	3年 割合(%)	P値	3年 割合(%)	P値
RhoA									
+	3	100	0.480	100	0.237	100	0.480	100	0.343
-	6	100		50		100		67	
RhoC									
+	7	100	0.655	51	0.277	100	0.655	69	0.408
-	2	100		100		100		100	
ROCK-1									
+	7	100	0.025	69	0.650	100	0.025	69	0.408
-	2	50		50		100		100	
ROCK-2									
+	3	100	0.655	67	0.953	100	0.655	67	0.560
-	6	100		60		100		80	
p53									
+	1	100	NS	100	0.483	100	NS	100	0.589
-	8	100		58		100		73	

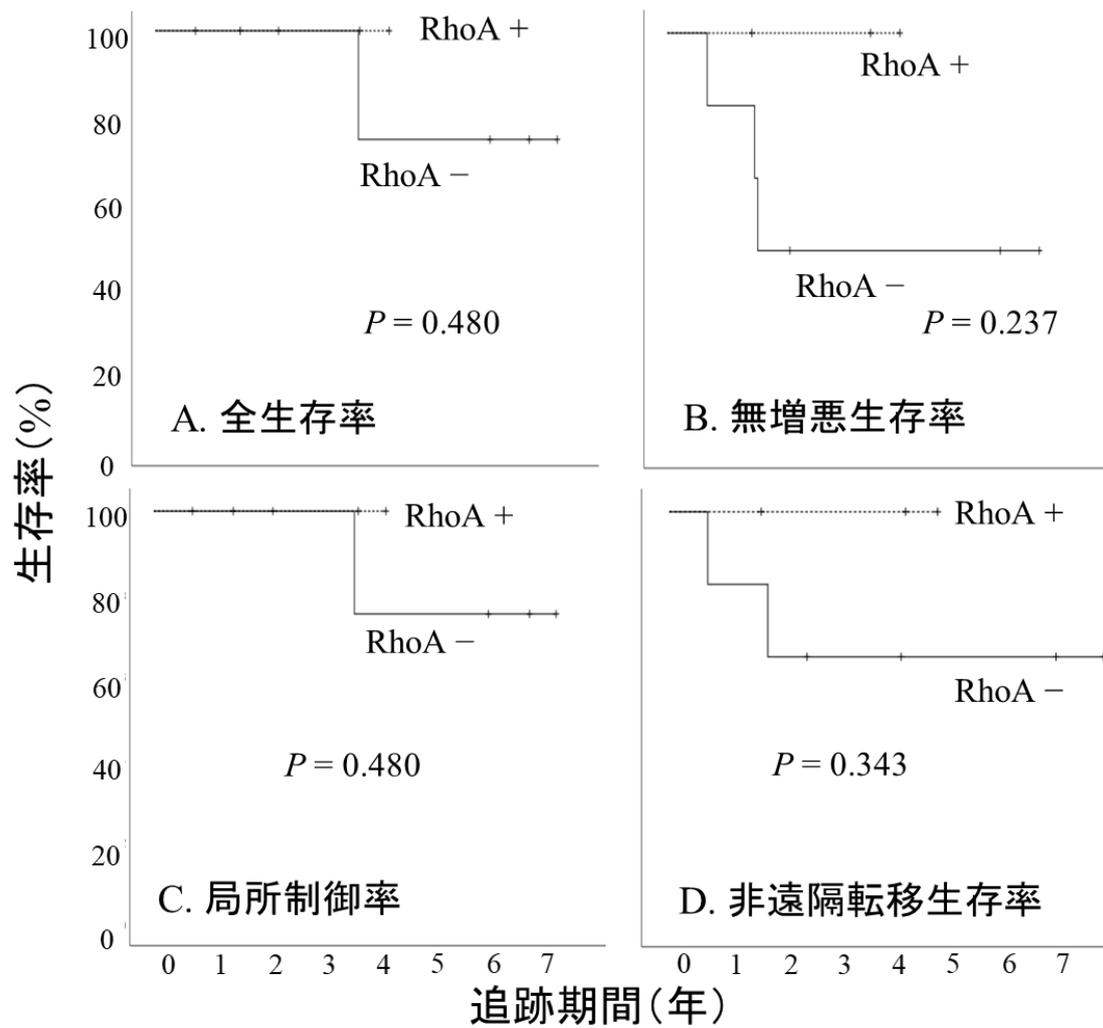


図9：II期9例のRhoAの発現と予後の関係

#### IV-2-3 : III期

III期症例でのタンパク発現と予後との関連について表 6, 図 10 に示した.

RhoA の過剰発現は, III 期の子宮頸癌患者において PFS および DMFS の 2 つにおいて有意差があった ( $P=0.045$  および  $P=0.041$ ). 他のタンパク発現と臨床的な予後との間に有意差は認められなかった.

表 6 : III 期 40 例の各タンパクの発現と予後の関係

発現	数 (n)	全生存率		無増悪生存率		局所制御率		非遠隔転移生存率	
		3年 割合(%)	<i>P</i> 値						
RhoA									
+	25	84	0.508	52	0.045	81	0.097	62	0.041
-	15	93		86		100		92	
RhoC									
+	27	88	0.810	61	0.452	91	0.436	68	0.390
-	13	88		77		85		85	
ROCK-1									
+	29	93	0.350	67	0.712	87	0.876	77	0.329
-	11	78		64		91		64	
ROCK-2									
+	21	91	0.985	70	0.653	87	0.947	85	0.165
-	19	87		62		90		62	
p53									
+	8	80	0.715	56	0.705	88	0.731	56	0.393
-	32	90		68		89		77	

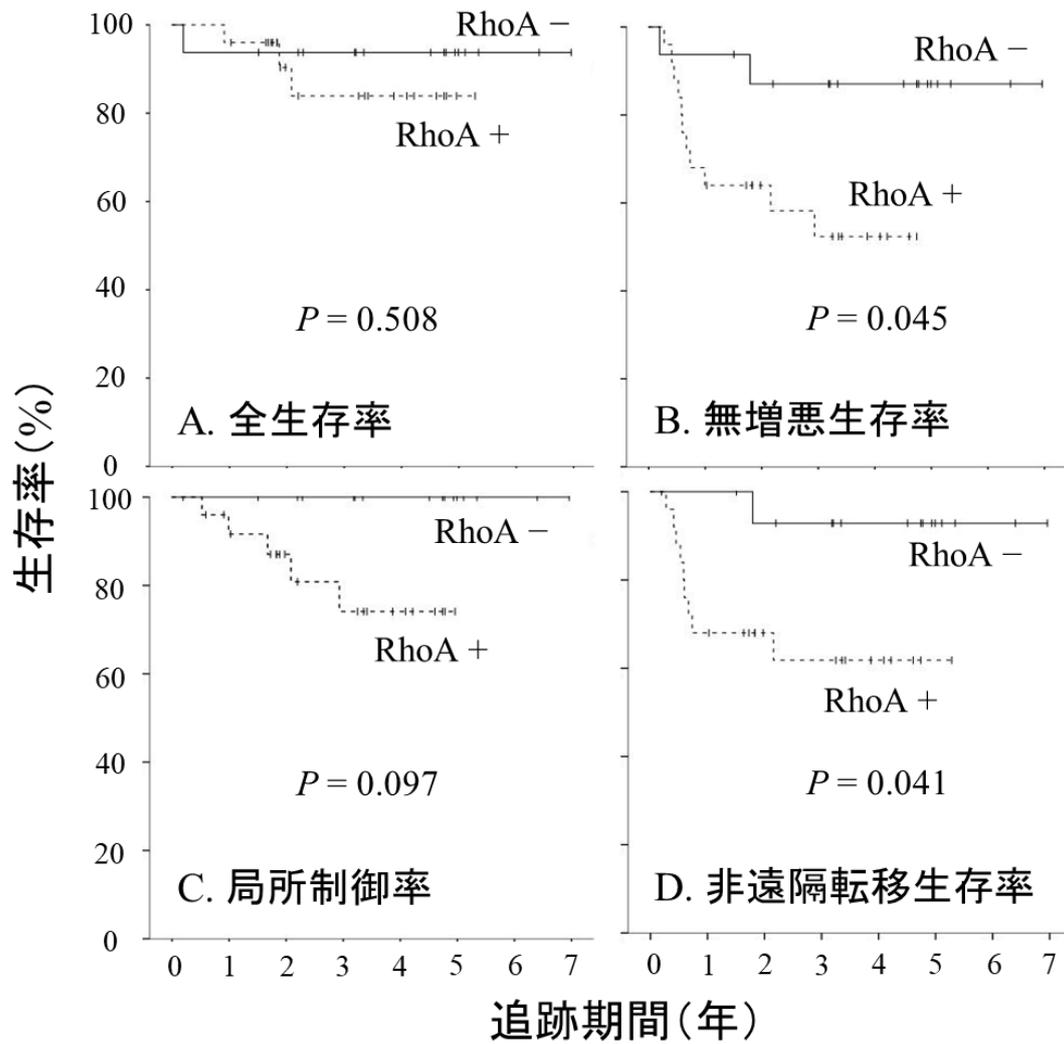


図 10 : III 期 40 例の RhoA の発現と予後の関係

#### IV-3 : RhoA 発現と再発部位の関係

RhoA 陽性の III 期子宮頸癌患者のうち、25 例中 11 例 (44%) に癌の再発が認められた。再発部位としては、5 例で局所・領域再発、9 例で遠隔転移再発であり、そのうち 3 例では、局所・領域再発と遠隔転移再発が同時に出現していた。局所・領域再発は、子宮が 1 例、膣が 1 例、外陰が 1 例、骨盤リンパ節が 2 例であった。遠隔転移は、肺が 4 例、骨が 1 例、傍大動脈リンパ節が 3 例、その他のリンパ節が 2 例、脳が 1 例、肝臓が 1 例 (3 症例で複数臓器の遠隔転移が指摘された症例あり) であった。

一方で、RhoA 陰性の III 期の子宮頸癌患者では、15 人中 1 人 (6.7%) に癌の再発が認められ、その 1 例は遠隔転移再発 (傍大動脈リンパ節) であった。

RhoA の発現は、局所進行 (FIGO ステージ)、腫瘍の大きさ (4cm 以上または 4cm 未満)、リンパ節転移の有無などの患者背景とは、有意差がなかった。

RhoA の発現と局所進行度 (FIGO)、腫瘍径 (4cm 以上または 4cm 未満) またはリンパ節転移の有無との間に、有意差がなかった (表 7)。

また、RhoA の陽性群、陰性群いずれも同様の治療が行われていた (表 8)。

表 7. RhoA の発現と患者背景（予後予測因子）

予後因子	RhoAの発現			P 値
	n (%)	陽性	陰性	
<b>FIGO進行期</b>				
II	9	3	6	0.221
III	40	25	15	
<b>腫瘍径</b>				
≤4cm	9	6	3	0.688
4cm<	40	21	19	
<b>リンパ節転移</b>				
陽性	41	23	18	1.000
陰性	8	4	4	

表 8 : RhoA の発現と患者背景（治療内容）

治療内容	患者数 (%)	
	RhoA 陽性 (n = 28)	RhoA 陰性 (n = 21)
<b>化学療法 (CDDP)</b>		
4コース	4 (8)	1 (2)
5コース	24 (49)	20 (41)
<b>外照射線量</b>		
WP 30 Gy + CS 20 Gy	24 (49)	19 (39)
WP 40 Gy + CS 10 Gy	4 (8)	0 (0)
WP 45 Gy + CS 5.4 Gy	0 (0)	2 (4)
<b>小線源治療線量</b>		
12Gy	0 (0)	1 (2)
24Gy	22 (45)	20 (41)
30Gy	6 (12)	0 (0)

略語: CDDP = シスプラチン; WP = 全骨盤照射; CS = 中央遮蔽

#### IV-4 : RhoA 発現と他の転移浸潤に関わるタンパクとの関係

RhoA 発現と今回検討した他の転移浸潤に関わるタンパクの発現との関係は明らかでなかった (表 9~表 11).

全患者群において, RhoA と RhoC の二重陽性例とそれ以外の症例群の間に, OS, PFS, LC, DMFS の有意な差は認められなかった ( $P = 0.352, 0.161, 0.331, 0.222$ ). III期の患者 40 人のみに着目した場合でも, 同様に有意な差は認められなかった (それぞれ  $P = 0.406, 0.061, 0.361, 0.089$ ).

表 9 : RhoA とその他のタンパク質の発現との関係

(II 期+III 期 (49 症例))

タンパク質	発現の有無	RhoA (%)		P値
		+(n=28)	-(n=21)	
RhoC	+	21 (43)	14 (29)	0.102
	-	7 (14)	7 (14)	
ROCK-1	+	20 (41)	15 (31)	1.000
	-	8 (16)	6 (12)	
ROCK-2	+	14 (29)	10 (20)	1.000
	-	14 (29)	11 (22)	
p53	+	5 (10)	4 (8)	1.000
	-	23 (47)	17 (35)	

表 10 : RhoA とその他のタンパク質の発現との関係

(II 期 (9 症例))

タンパク質	発現の有無	RhoA (%)		P値
		+ (n = 3)	- (n = 6)	
RhoC	+	2 (22)	5 (56)	1.000
	-	1 (11)	1 (11)	
ROCK-1	+	3 (33)	4 (44)	0.777
	-	0 (0)	2 (22)	
ROCK-2	+	1 (11)	2 (22)	1.000
	-	2 (22)	4 (44)	
p53	+	0 (0)	1 (11)	1.000
	-	3 (33)	5 (55)	

表 11 : RhoA とその他のタンパク質の発現との関係

(III 期 (40 症例))

タンパク質	発現の有無	RhoA (%)		P値
		+ (n = 25)	- (n = 15)	
RhoC	+	19 (48)	9 (23)	0.476
	-	6 (15)	6 (15)	
ROCK-1	+	17 (43)	11 (28)	1.000
	-	8 (20)	4 (10)	
ROCK-2	+	13 (33)	8 (20)	1.000
	-	12 (30)	7 (18)	
p53	+	5 (13)	3 (8)	1.000
	-	20 (50)	12 (30)	

## V. 考察

Rho は Ras スーパーファミリーに属する低分子 GTP 結合タンパク質の分子である。Rho は細胞間の接着，神経突起の伸長と退縮およびそれによる細胞の移動，細胞質の分裂など細胞骨格の制御のさまざまな作用に関わる。悪性腫瘍においても，これらの発現が腫瘍細胞の浸潤や転移に役割を果たしていると考えられている(45, 65)。これまでの報告によると，胃癌患者では，RhoA の過剰発現は局所リンパ節転移の有無と程度，およびリンパ管侵襲と相関していた(66,67)。さらに，RhoA の過剰発現は，肝細胞癌における被膜浸潤(68)，門脈浸潤，播種(69)，静脈侵襲および微視的な衛星結節(70)と関係しているとの報告がある。Faried らは，食道癌（扁平上皮癌）において，RhoA の過剰発現が N および M カテゴリー（遠隔転移の有無），リンパ管侵襲，血管侵襲と相関していることを報告している(71)。つまり，RhoA 発現は遠隔転移だけでなく，腫瘍の進行度や分化度(68, 69, 72, 73)とも相関する可能性が示唆されている。また，他の癌種では，RhoA の高発現は，OS(66, 69, 71)，PFS(66)を指標とした予後因子であることも報告されている。RhoA と関係するシグナル伝達経路が予測因子であるかどうかを明らかにするためには，より多くの癌種において解析を行う必要があると考えられる。

Rho と子宮頸癌における遠隔転移のリスクなどとの相関が明らかになれば，Rho や ROCK の発現の有無が子宮頸癌のリスク因子の一つとなる可能性があるだけでなく，例えば Vale らが指摘しているように，CCRT 後に追加の化学療法を適応すべき群が明確になることにより，子宮頸癌治療の改善や最適化につな

がる可能性がある(19). また, Somlyo らは, 選択的 Rho 阻害剤が前立腺癌細胞の転移増殖を阻害したことを示しており(52), Rho や ROCK の阻害剤が新たな分子標的薬として子宮頸癌の治療薬のひとつとして有用となる可能性も考えられる.

本研究では, CCRT を受けた II-III 期の子宮頸癌患者 49 名から得られた生検標本において, RhoA, RhoC, ROCK-1, ROCK-2, p53 の発現を免疫組織化学的に評価し, これらのタンパク質の発現と予後との関係を検討した結果, RhoA の発現が CCRT 後の再発, 特に遠隔転移の予測に重要な役割を果たしていることが明らかになった. これまでの子宮頸癌を対象とした研究では, RhoA が VEC (Vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) -RhoA-ROCK2 シグナル伝達経路を介して腫瘍の移動に関与し, 転移と相関していることが報告されている(74). その中で我々の研究は, 進行期の子宮頸癌における CCRT 後の遠隔転移と RhoA の発現が密接に関係していることを示した最初の研究である. また, これまでの報告では, RhoA 発現と年齢, 性別, 腫瘍の大きさ, リンパ節転移の有無との間に相関は示されておらず(68, 73), その結果は我々の結果と一致している. つまり RhoA の発現は, 遠隔転移の予測において, 患者の背景や病巣の状態に依存しない独立した因子である可能性が示唆される.

本研究で評価したタンパクのうち, RhoA のみが予後と関係しており, 他のタンパクでは相関は認められなかった. これは, RhoA と RhoC の下流のエフェクター分子が異なるためと考えられる. RhoA は ROCK-1/2 を制御してアクチン細胞骨格と細胞移動を制御している. 対照的に, RhoC は, 細胞移動と細

胞の浸潤のための葉状仮足の進展を調節する FMNL3 に影響を与える。このように下流のエフェクター分子の違いが、RhoA および評価した他のタンパクと生存の関係で観察された格差の根底にある可能性がある (75)。

本研究の結果から、RhoA は遠隔転移の発生を予測できる可能性が示唆された。CCRT の前に遠隔転移のリスクが高いことが予測できれば、患者を層別化することができ、補助化学療法などの個別化された治療を提供できる可能性につながる。子宮頸癌では、RhoA 発現の有無に基づく新たな治療プロトコールの開発が大いに期待され得る。Mabuchi らは、CCRT 施行後のパクリタキセル + カルボプラチン (TC) ベースの補助化学療法が IIIB-IVA 期の子宮頸癌の OS を改善することを報告している(76)。しかし、Tangjitgamol らは、TC ベースの追加の化学療法は、遠隔転移再発率を抑制するが IIB-IVA 期を含む子宮頸癌患者の OS や PFS は改善しないと報告している(77)。また、進行子宮頸癌患者に対する追加の化学療法が OS を改善するかどうかを検討する第 III 相試験が進行中である(20)。

本研究にはいくつかの課題がある。第一に、本研究の対象病期と観察期間の設定である。再発や遠隔転移は当然病期が進行するとともに確率が高くなる。II 期症例では再発や転移が少ないと予想されるために解析から除外すべきであったかもしれないが、実際には III 期と比べて同等の再発、転移が認められていたので解析に含めることとした。また、IV 期に関しては II 期、III 期よりも予後が悪いため、予め対象から除外した。本研究の結果からは、RhoA の発現は無増悪生存率と非遠隔転移生存率には差がある一方で、全生存率には差がなか

った。本研究の追跡期間と子宮頸癌の標準的な予後からすると、IV期の症例を含む、より長期間の追跡を行うなどすれば、全生存率にも差が出る可能性がある。

第二に、今回の免疫組織化学的手法の限界が挙げられる。本研究では先行する研究(62-64)で用いられている細胞の計数やタンパクの陽陰性の発現の判定方法を参考にして陽性率を算出した。さらに、評価は経験豊富な研究者を含む3名の共同研究者によって行われ、可能な限り客観性を保つようにした。しかし、染色された Rho と ROCK は細胞質に分布しているため計数しにくく、陽性細胞数の判定に迷う場合もあった。今後は、機械学習などの手法を用いて客観的判定を行うことのできる装置の開発があればさらに確信のもてる結果が期待できると考えられる。

第三に、今回は Rho ファミリーと p53 の子宮頸癌における発現を調べたが、重要な分子はこれらだけではない。悪性腫瘍では、低酸素環境は治療抵抗性の予測因子であり、子宮頸癌においては HIF-1 の発現が DMFS と関連することが知られている(78)。子宮頸癌の遠隔転移に関係する細胞・分子メカニズムを解明するためには、これら低酸素系に関わる分子など、他の機能を担うタンパク質との相関を含めた更なる研究が必要であると考えられる。

第四に、本研究は単施設での後ろ向きコホート研究である。より普遍的な結論を導き出すためには、多施設共同でのプロトコールを用いた治療と解析が不可欠であり、今後の研究計画に活かしていきたい。

## VI. 結論

本研究により，子宮頸癌患者の CCRT 後の再発，特に遠隔転移の予測に RhoA の過剰発現が重要な役割を果たしている可能性が示唆された．子宮頸癌の診断時点で RhoA の発現の程度をあらかじめ評価することで，治療後の転移再発のリスクを現在よりもより正確に判断することができるようになる可能性がある．このことは，子宮頸癌患者の転移リスクに応じた子宮頸癌患者の層別化に役立ち，ハイリスクな患者群にはあらかじめ追加の化学療法を行うなど，より個別化・最適化された子宮頸癌治療の提供につながり，予後の改善に寄与する可能性があると考えられる．

## 謝辞

本研究を行うにあたり，多岐にわたるご指導・ご助言をいただいた本学・放射線腫瘍科櫻井英幸教授，石川仁教授（現・国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 QST 病院 副病院長）及び松本孔貴助教に心より感謝いたします。また，本論文作成にあたり貴重なご意見を頂いた本学・産科婦人科学講座の佐藤豊実教授に厚くお礼申し上げます。さらに，本研究を行うにあたり研究協力者としてご協力いただいた本学附属病院放射線腫瘍科および陽子線医学利用研究センターのスタッフの皆様にも心より感謝いたします。

## 引用文献

1. 伊藤ゆり. 本当に増えているがん，減っているがん. *JACR Monograph*. 2016; **Supplement No.2**: 85-97.
2. 国立がん研究センター. Cancer Registry and Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (Ministry of Health, Labour and Welfare, National Cancer Registry). In: 国立がん研究センター (ed.)2017.
3. Hori, M, Matsuda, T, Shibata, A, *et al*. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Japanese journal of clinical oncology*. 2015; **45(9)**: 884-91.

4. 片渕秀隆ら. 婦人科腫瘍委員会報告. *日本産科婦人科学会雑誌*. 2016; **68**(3): 1117-60.
5. Boshart, M, Gissmann, L, Ikenberg, H, *et al.* A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984; **3**(5): 1151-7.
6. Durst, M, Gissmann, L, Ikenberg, H, *et al.* A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; **80**(12): 3812-5.
7. Onuki, M, Matsumoto, K, Satoh, T, *et al.* Human papillomavirus infections among Japanese women: age-related prevalence and type-specific risk for cervical cancer. *Cancer science.* 2009; **100**(7): 1312-6.
8. McCredie, MR, Sharples, KJ, Paul, C, *et al.* Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2008; **9**(5): 425-34.
9. Bhatla N, Berek J, Fredes MC, *et al.* Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet* . 2019 Apr;145(1):129-135.
10. James D. Brierley, MKG, Christian Wittekind. *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition*: Wiley-Blackwell; 2016.

11. 日本婦人科腫瘍学会. 子宮頸癌治療ガイドライン 2017 年版: 金原出版; 2017.
12. Koh, WJ, Abu-Rustum, NR, Bean, S, *et al.* Cervical Cancer, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2019; **17**(1): 64-84.
13. Yoon, HI, Cha, J, Keum, KC, *et al.* Treatment outcomes of extended-field radiation therapy and the effect of concurrent chemotherapy on uterine cervical cancer with para-aortic lymph node metastasis. *Radiat Oncol.* 2015; **10**: 18.
14. Kazumoto, T, Kato, S, Yokota, H, *et al.* Is a low dose of concomitant chemotherapy with extended-field radiotherapy acceptable as an efficient treatment for cervical cancer patients with metastases to the para-aortic lymph nodes? *Int J Gynecol Cancer.* 2011; **21**(8): 1465-71.
15. Rose, PG, Ali, S, Watkins, E, *et al.* Long-term follow-up of a randomized trial comparing concurrent single agent cisplatin, cisplatin-based combination chemotherapy, or hydroxyurea during pelvic irradiation for locally advanced cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2007; **25**(19): 2804-10.
16. Neoadjuvant Chemotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration, C. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced cervix cancer. *Cochrane Database*

*Syst Rev.* 2004(2): CD001774.

17. Morris, M, Eifel, PJ, Lu, J, *et al.* Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999; **340**(15): 1137-43.

18. Mabuchi S, Takahashi R, Isohashi F *et al.* Reirradiation using high-dose-rate interstitial brachytherapy for locally recurrent cervical cancer: a single institutional experience. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24: 141–8.

19. Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis, C. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008; **26**(35): 5802-12.

20. Mileskin, LR, Narayan, K, Moore, KN, *et al.* A phase III trial of adjuvant chemotherapy following chemoradiation as primary treatment for locally advanced cervical cancer compared to chemoradiation alone: Outback (ANZGOG0902/G0G0274/RTOG1174). *Journal of Clinical Oncology.* 2014; **32**(15).

21. Vega, FM, Ridley, AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 2008; **582**(14): 2093-101.

22. Boureux, A, Vignal, E, Faure, S, *et al.* Evolution of the Rho family of ras-like

GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol.* 2007; **24**(1): 203-16.

23. Jaffe, AB, Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; **21**: 247-69.

24. Aktories, K, Just, I. Clostridial Rho-inhibiting protein toxins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005; **291**: 113-45.

25. Madaule, P, Axel, R. A novel ras-related gene family. *Cell.* 1985; **41**(1): 31-40.

26. Wheeler, AP, Ridley, AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res.* 2004; **301**(1): 43-9.

27. Hill, CS, Wynne, J, Treisman, R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell.* 1995; **81**(7): 1159-70.

28. Hirata, K, Kikuchi, A, Sasaki, T, *et al.* Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem.* 1992; **267**(13): 8719-22.

29. Mabuchi, I, Hamaguchi, Y, Fujimoto, H, *et al.* A rho-like protein is involved in the organisation of the contractile ring in dividing sand dollar eggs. *Zygote.* 1993; **1**(4): 325-31.

30. Qiu, RG, Chen, J, McCormick, F, *et al.* A role for Rho in Ras transformation.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; **92**(25): 11781-5.

31. Rankin, S, Morii, N, Narumiya, S, *et al.* Botulinum C3 exoenzyme blocks the tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin induced by bombesin and endothelin. *FEBS Lett.* 1994; **354**(3): 315-9.

32. Ridley, AJ, Hall, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992; **70**(3): 389-99.

33. Yamamoto, M, Marui, N, Sakai, T, *et al.* ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene.* 1993; **8**(6): 1449-55.

34. Ishizaki, T, Maekawa, M, Fujisawa, K, *et al.* The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 1996; **15**(8): 1885-93.

35. Watanabe, N, Madaule, P, Reid, T, *et al.* p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 1997; **16**(11): 3044-56.

36. Maekawa, M, Ishizaki, T, Boku, S, *et al.* Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 1999; **285**(5429): 895-8.

37. Watanabe, G, Saito, Y, Madaule, P, *et al.* Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science*. 1996; **271**(5249): 645-8.
38. Tominaga, T, Ishizaki, T, Narumiya, S, *et al.* p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *EMBO J*. 1998; **17**(16): 4712-22.
39. Ishizaki, T, Morishima, Y, Okamoto, M, *et al.* Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol*. 2001; **3**(1): 8-14.
40. Watanabe, N, Kato, T, Fujita, A, *et al.* Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*. 1999; **1**(3): 136-43.
41. Lawson, CD, Ridley, AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol*. 2018; **217**(2): 447-57.
42. Warner, H, Wilson, BJ, Caswell, PT. Control of adhesion and protrusion in cell migration by Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol*. 2019; **56**: 64-70.
43. Ridley, AJ. Life at the leading edge. *Cell*. 2011; **145**(7): 1012-22.
44. Sit, ST, Manser, E. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*. 2011; **124**(Pt 5): 679-83.
45. Nobes, CD, Hall, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of

multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995; **81**(1): 53-62.

46. Ridley, AJ, Paterson, HF, Johnston, CL, *et al.* The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992; **70**(3): 401-10.

47. Kurokawa, K, Matsuda, M. Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Mol Biol Cell*. 2005; **16**(9): 4294-303.

48. Pertz, O, Hodgson, L, Klemke, RL, *et al.* Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*. 2006; **440**(7087): 1069-72.

49. Vicente-Manzanares, M, Horwitz, AR. Adhesion dynamics at a glance. *Journal of cell science*. 2011; **124**(Pt 23): 3923-7.

50. Wilson, E, Leszczynska, K, Poulter, NS, *et al.* RhoJ interacts with the GIT-PIX complex and regulates focal adhesion disassembly. *Journal of cell science*. 2014; **127**(Pt 14): 3039-51.

51. Chrzanowska-Wodnicka, M, Burridge, K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*. 1996; **133**(6): 1403-15.

52. Somlyo, AV, Bradshaw, D, Ramos, S, *et al.* Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; **269**(3): 652-9.

53. Kamai, T, Tsujii, T, Arai, K, *et al.* Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; **9**(7): 2632-41.
54. Zhang, J, He, X, Ma, Y, *et al.* Overexpression of ROCK1 and ROCK2 inhibits human laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; **8**(1): 244-51.
55. Lane, J, Martin, TA, Watkins, G, *et al.* The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *Int J Oncol.* 2008; **33**(3): 585-93.
56. Suwa, H, Ohshio, G, Imamura, T, *et al.* Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer.* 1998; **77**(1): 147-52.
57. Clark, EA, Golub, TR, Lander, ES, *et al.* Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature.* 2000; **406**(6795): 532-5.
58. Itoh, K, Yoshioka, K, Akedo, H, *et al.* An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med.* 1999; **5**(2): 221-5.
59. Takamura, M, Sakamoto, M, Genda, T, *et al.* Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology.* 2001; **33**(3): 577-81.
60. Hirase, T, Kawashima, S, Wong, EY, *et al.* Regulation of tight junction

permeability and occludin phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2001; **276**(13): 10423-31.

61. 日本放射線腫瘍学会. 放射線治療計画ガイドライン 2016年版 第4版. 金原出版; 2016.

62. Zhang, D, Zhang, JY, Dai, SD, *et al.* Co-expression of delta-catenin and RhoA is significantly associated with a malignant lung cancer phenotype. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; **7**(7): 3724-32.

63. Horiuchi, A, Imai, T, Wang, C, *et al.* Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab Invest.* 2003; **83**(6): 861-70.

64. Klee, CG, van Golen, KL, Zhang, Y, *et al.* Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am J Pathol.* 2002; **160**(2): 579-84.

65. Leung, T, Chen, XQ, Manser, E, *et al.* The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 1996; **16**(10): 5313-27.

66. Huang, KH, Lan, YT, Chen, MH, *et al.* The Correlation Between RhoA Expression and Clinicopathological Characteristics in Gastric Cancer Patients After

Curative Surgery. *World J Surg.* 2015; **39**(9): 2289-99.

67. Chang, KK, Cho, SJ, Yoon, C, *et al.* Increased RhoA Activity Predicts Worse Overall Survival in Patients Undergoing Surgical Resection for Lauren Diffuse-Type Gastric Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2016; **23**(13): 4238-46.

68. Hu, T, Guo, H, Wang, W, *et al.* Loss of p57 expression and RhoA overexpression are associated with poor survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2013; **30**(4): 1707-14.

69. Song, LJ, Liu, Q, Meng, XR, *et al.* DLC-1 is an independent prognostic marker and potential therapeutic target in hepatocellular cancer. *Diagn Pathol.* 2016; **11**: 19.

70. Wang, D, Dou, K, Xiang, H, *et al.* Involvement of RhoA in progression of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; **22**(11): 1916-20.

71. Faried, A, Nakajima, M, Sohda, M, *et al.* Correlation between RhoA overexpression and tumour progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2005; **31**(4): 410-4.

72. Pan, Y, Bi, F, Liu, N, *et al.* Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; **315**(3): 686-91.

73. Zhang, A, Wang, Q, Han, Z, *et al.* Reduced expression of Snail decreases breast cancer cell motility by downregulating the expression and inhibiting the activity of RhoA

GTPase. *Oncol Lett.* 2013; **6**(2): 339-46.

74. He, M, Cheng, Y, Li, W, *et al.* Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade. *BMC Cancer.* 2010; **10**: 170.

75. Vega FM, Fruhwirth G, Ng T *et al.* RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J Cell Biol.* 2011; 193: 655-65.

76. Mabuchi, S, Isohashi, F, Okazawa, M, *et al.* Chemoradiotherapy followed by consolidation chemotherapy involving paclitaxel and carboplatin and in FIGO stage IIIB/IVA cervical cancer patients. *J Gynecol Oncol.* 2017; **28**(1): e15.

77. Tangjitgamol, S, Tharavichitkul, E, Tovanabutra, C, *et al.* A randomized controlled trial comparing concurrent chemoradiation versus concurrent chemoradiation followed by adjuvant chemotherapy in locally advanced cervical cancer patients: ACTLACC trial. *J Gynecol Oncol.* 2019; **30**(4): e82.

78. Ishikawa, H, Sakurai, H, Hasegawa, M, *et al.* Expression of hypoxic-inducible factor 1alpha predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2004; **60**(2): 513-21.

## 用語集

### 1. 3D-Image-guided brachytherapy (IGBT)

画像誘導小線源治療. 密封小線源治療において, CT や MRI の画像をもとに三次元的に線量分布を作成する手法のこと. 腫瘍や近接するリスク臓器に対する処方線量がより正確に評価, 調整できる.

### 2. Brachy therapy (BT)

密封小線源治療. 放射性同位元素 (RI:radioisotope) を密封して作られる線源を, 腫瘍病変の表面に密着させたり, 内腔を通したり, 病変に直接刺入するなどして, 病変にきわめて近い位置から行う放射線療法. 外部照射と併用することもある.

### 3. Concurrent Chemoradiotherapy (CCRT)

同時併用化学放射線療法. 放射線療法期間中に, 化学療法を並行して施行する. 単独の治療効果に加え, 併用による相乗効果を得ることを目的としている.

### 4. Center Shield (CS)

中央遮蔽. 子宮頸癌の外照射の後半で, 直腸の線量を低減するため, 照射野に直線加速器附属のマルチリーフコリメーターを利用して同部を遮蔽する方法のこと. 本邦で主に用いられる.

## 5. External radiotherapy

外照射，外部放射線療法．照射装置から発生した放射線を体外から照射する治療．主に医療用直線加速装置 (Linac) から出力される X 線や電子線が用いられる．

## 6. Fractionated irradiation

分割照射．正常組織と腫瘍組織の放射線感受性の差（亜致死損傷からの回復力の差）を利用して，照射 1 回あたりを低い線量に分割して行う照射法．正常組織に対する有害事象を抑えつつ，腫瘍細胞に大きなダメージを与えることを目的としている．

## 7. Immunohistochemistry

免疫組織化学染色．生体切片上で，組織上に存在する抗原と蛍光標識された抗体を反応させる手法．特定のタンパク質の発現の有無や強度を視覚化し，解析する．

## 8. Isoform

アイソフォーム，イソフォーム．機能はほぼ同一だが，アミノ酸配列が異なる類似のタンパク質分子のこと．

## 9. Linear accelerator (Linac)

ライナック，リニアック．直線加速器．ここでは医療用の放射線治療装置とし

での直線加速器を指す。機器ごとに数種類のエネルギーの X 線及び電子線を発生させることができる。

#### 10. Manchester system

マンチェスター法。Paterson-Parker 法とも呼ばれる。腔内照射において、標的内の線量分布が均一になるように小線源を配置する方法。1本のタンデムアプリーケーターと2本のオボイドアプリーケーターを用いて、子宮頸部を囲むように配置し、子宮頸部を中心とした洋梨状の線量分布を形成する。

#### 11. Multi Leaf Collimator (MLC)

マルチリーフコリメーター。放射線治療装置に附属する遮蔽用の金属板。独立して稼働し、腫瘍などの形に合わせて照射野を形成するのに用いる。

#### 12. Paraaortic lymph node (PALN)

傍大動脈リンパ節。腹部大動脈および下大静脈周囲のリンパ節を指す。総腸骨リンパ節から頭側に連続しており、子宮頸癌において骨盤リンパ節から順行性のリンパ節転移をきたし易い。

#### 13. Remote after loading system (RALS)

遠隔操作式後充填法。小線源治療の方法の一つ。体内にアプリーケーター（管）を挿入後、遠隔操作で放射線源を留置し、病変に放射線を照射する。

## 出典

本研究は、2016年11月27日に京都で開催された第1回アジア放射線腫瘍学会連合会（FARO）／第29回日本放射線腫瘍学会（JASTRO）学術集会で口頭発表した。

本学位論文では、Journal of Radiation Research, Volume 61, Issue 2, March 2020, Pages 221–230（オンライン版：<https://doi.org/10.1093/jrr/rrz093>）に掲載された論文の内容を、Oxford University Press社の規定に従って再利用している。

## 参考論文からの修正点

以下の3点について、上記の参考論文から記載を訂正、変更した。

- p21 line3

条件を絞り込む前の症例数に誤植があったので訂正した。実際に研究の対象として解析した人数に変更はない。

- p28 図5

下段の写真が参考論文では「RhoC」となっているが、誤植であり正しくは「p53」なので、学位論文では正しい記載に訂正した。

- p29 line4 統計解析（無病生存率）

参考論文中では無病生存率（disease free survival: DFS）の表現を用いていたが、放射線療法後の評価では無増悪生存率（progression free survival: PFS）と表現したほうが適切であるので、そちらに表現を変更した。以降の本文もこの表記に合わせて修正した。統計解析の結果に変更はない。

## 基金

本研究は、文部科学省科学研究費補助金（19H03596）および科学研究費補助金（C）（17K10467）の助成を受けて実施された。

## 利益相反

利益相反 (COI) : 著者らは, 競合する財務上のいかなる利害関係も持たない.