

氏名(本籍)	おき 沖	あきのり 明典(東京都)
学位の種類	博士(医学)	
学位記番号	博甲第1,936号	
学位授与年月日	平成10年3月23日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
審査研究科	医学研究科	
学位論文題目	子宮頸部すりガラス細胞癌の性状と集学的治療に関する基礎的検討	
主査	筑波大学教授	医学博士 赤座英之
副査	筑波大学教授	医学博士 野口雅之
副査	筑波大学教授	医学博士 秋根康之
副査	筑波大学教授	医学博士 大塚藤男
副査	筑波大学助教授	医学博士 長澤俊郎

## 論文の内容の要旨

### (目的)

子宮頸癌は婦人科悪性腫瘍のなかで最も頻度の高い癌である。衛生環境の向上と早期発見が相まって子宮頸癌は比較的予後の良い腫瘍と考えられるようになってきた。しかしながら、進行癌や相対的頻度の増加をみせる子宮頸部腺癌や少数例の予後不良癌では治療成績の改善がなかなか進まないのが現状である。この原因として、これらの組織型の癌が、子宮頸癌の約8割を占める扁平上皮癌に比して生物学的な特徴の解明が不十分であり、組織型別に最適な治療法が開発されていないことがあげられる。本研究では、そのなかで病理学的に低分化な腺扁平上皮癌と位置づけられる子宮頸部すりガラス細胞癌 (glassy cell carcinoma: GCC) に着目し、その細胞株を2株樹立することに成功した。これらの細胞株と既存の同組織型由来の細胞株を用いて、予後不良と考えられている組織型の癌に対するモデル系として、生物学的特徴の解明と集学的治療法に関する基礎的検討を行なった。

### (対象と方法)

筑波大学附属病院産婦人科で経験されたGCC 2例に対して初代培養を試みて樹立された2株 (TOM-2, Opt60b) と、他施設で世界初に樹立された同組織型由来細胞株HOKUGの合計3株を用い、GCCの生物学的特徴として染色体検査・腫瘍マーカー分泌能・human papillomavirus (HPV) DNAの検出・サイトカインの分泌能を検討した。染色体分析はG-band分染法で、腫瘍マーカーとサイトカインの分泌能は培養上清をELISA法で、またHPV DNAの検出はPolymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法で行った。この結果、GCCではInterleukin-6, -8の高濃度の産生が認められたため合計17種類の子宮頸癌由来細胞株を用いて同サイトカインの分泌の特異性を検討した。また、これらサイトカインの分泌促進シグナルとなるIL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ の分泌も低濃度ながら認められたことから、これらのサイトカインを培地中に添加してIL-6, -8の産出量をELISA法で測定した。

次にGCCに対する治療の個別化の可能性を検討するため、上記3株に対するin vitroでの抗癌剤感受性検査を行った。検討した化学療法剤としては婦人科腫瘍に対して頻用されている11種類の薬剤を用い、各々10段階の接触濃度で6時間から48時間の4接触時間別に検討した。細胞の生存率はWST-1 assayを用い、50%細胞生存剤濃度と生体内で得られる薬剤濃度のAUCから有効性を判定した。

また、近年新しい癌治療法として注目されている、細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocytes: CTL) による養子免疫療法の婦人科腫瘍への適用の可能性を検討する目的で、患者健在で樹立後の増殖が安定している子宮体癌由来のMIN-2を用いたCTLの誘導を試みた。CTLの誘導に際して、targetとして樹立癌細胞 (live target) とホルマリン固定パラフィン包埋病理切片 (fixed target) を用い、interleukin (IL) -1, 2, 4, 6のサイトカインを加えて患者本人の末梢血単核球分画 (PBMC) と混合して培養した。この際、特にホルマリン固定パラフィン包埋切片上に癌抗原提示に不可欠なMHC class I分子の保存をDako社製のCatalysed signal amplification (CSA) systemを用いた免疫染色法で証明した。

(結果および考察)

#### A. GCC由来細胞株の生物学的特徴

1. 細胞株のヌードマウス移植腫瘍は、原腫瘍とほぼ同様の細胞形態を示し、電子顕微鏡による観察でもGCCの特徴を保持していた。

2. in vitroでの細胞培養上の特徴として、細胞倍加時間はTOM-2, Opt 60b, HOKUGのそれぞれで87時間、59時間、49時間であり増殖が緩慢であり、単層シート状配列を示し、細胞数の増加後も重層化しなかった。

3. 染色体検査では、TOM-0が低4倍体、Opt 60bが3倍体、HOKUGが低2倍体であり、共通性は認められなかった。

4. 培養上清中の腫瘍マーカーとしてCA125が全例で、SCCがTOM-2, HOKUGで分泌されていた。また、全例で低濃度ながらNSEも検出された。

5. 全例でHPV DNAが検出された。このなかでTOM-2, Opt 60bではHPV18型が、HOKUGでは58型であった。

6. 全例で培養上清中にIL-1 $\alpha$ , -6, -8が、また2例でTNF- $\alpha$ が検出された。特にIL-6, -8は高濃度に分泌されており、17種類の子宮頸癌由来細胞株によるサイトカイン分泌能の検査ではIL-6, -8を共に高濃度に分泌している株はGCCの3株のみであった。

7. HOKUGではこのIL-6, -8の分泌がIL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ により4倍から50倍に促進された。

以上のことから、ヌードマウス移植腫瘍の細胞形態・腫瘍マーカーとしてCA125, SCCを分泌していること、などから腺癌と扁平上皮癌の特徴を合わせ持つ腺扁平上皮癌としての特徴を満たしていることが確認された。また、今回用いた細胞株は全てIL-6, -8が高濃度に分泌されており、このことがGCC生物学的特徴であると考えられたが、これは同時に分泌されているIL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ によって促進されている可能性が示唆された。

#### B. 集学的治療に関する検討

1. GCCの3株に対して施行した抗癌剤感受性検査では、TOM-2は3種類、Opt 60bで5種類、HOKUGでは6種類の抗癌剤に感受性を認めた。共通して感受性ありと判定された薬剤はCDDPとActDの2種類であり、これら2種類の併用もしくはCDDPを主体とした薬剤併用がなされるべきと考えられた。

2. ホルマリン固定パラフィン包埋切片のfixed target上にMHC class I分子が保存されていることが証明された。

3. live target, fixed targetからほぼ同様にCTLの増殖が確認され、癌細胞の傷害性も確認された。

以上より、従来の集学的治療に加えてGCCに特異的なCDDPを基本とした化学療法の確立に今回の検討結果が有用である可能性が示唆された。また、婦人科腫瘍に関してCTLを用いた養子免疫療法の可能性が示され、特にfixed targetからのCTLの誘導は術前診断がつきにくいGCCにとって有用なCTL誘導法であろうと考えられた。

(結論)

子宮頸癌のなかで頻度は低いが予後の悪いGCCの細胞株を樹立し、共通の生物学的な特徴を検討した。その結果、特にCA125とSCCという2つの組織型に由来すると考えられる腫瘍マーカーとIL-6, -8という2種類のサイトカインの過剰発現を見いだした。また、子宮頸癌で高頻度に検出されるHPV DNAも検出され、これらはCTLを誘導するうえで、腫瘍抗原として有用である可能性が示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

子宮頸部すりガラス細胞癌（GCC）は子宮頸癌のなかでは稀な組織型である。しかし、臨床的には非常に予後不良の癌と言われ、診療を行う上で問題となっているものの一つである。これまでにGCC由来の細胞株の樹立報告は1例に過ぎず、そのため系統的なGCCの生物学的な特徴が検討されていなかった。本研究では筆者が新たに2株のGCC由来細胞株を樹立したことに端を発して可能となった研究であり意義深いものであると考えられる。実地臨床の際、GCC患者で問題となった腫瘍熱とGCCの病理学的な特徴を解明することを目的として、これら細胞株がInterleukin-6,-8を高濃度に分泌することを確認したことは高く評価出来る点である。しかしながら、実際に腫瘍熱が全てのGCC症例に生じているわけではない点や、これらサイトカインの分泌が、GCCの臨床病理学的な特徴の根本的な原因であるかについては、今後更なる症例の集積を待ち検討が必要である。また、論文後半に展開される養子免疫療法に関する検討は、婦人科腫瘍全体の新しい治療モデルとして筆者が樹立した子宮体癌由来細胞株とその患者本人の自己血を informed consent を得た上で行われているが、GCC由来細胞株が細胞株樹立から時間が短く検討に用いられなかったため、今後同様の検討が望まれる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。