

氏名	田中智人
(ふりがな)	(たなかともひと)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 号
学位審査年月日	平成28年1月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	CD24 expression as a marker for predicting clinical outcome and invasive activity in uterine cervical cancer (子宮頸癌における CD24 の予後因子及び浸潤能の指標としての有用性の検討)
論文審査委員	(主) 教授 廣 瀬 善 信 教授 内 山 和 久 教授 岡 田 仁 克

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

子宮頸癌の治療には、外科的切除および放射線治療が行われているが、依然予後は不良であり、術前あるいは術後の補助療法等の選択にかかわる適切な予後因子や、新規分子標的薬などの新たな治療を見出すことが重要である。CD24 は glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) 結合型シアロ糖タンパクで、細胞間接着や細胞分化に関わる膜蛋白である。リンパ球や上皮細胞、神経細胞の前駆細胞に発現し、これらの成熟に重要な役割を担っていると考えられている。しかし近年、膀胱癌、脳腫瘍、肺癌、肝細胞癌、卵巣癌や乳癌など多種の癌種にも発現していることがわかり、予後との関連も示唆されているが、子宮頸癌におい

ではその発現意義や機能について未だ明らかになっていない。そこで今回、子宮頸癌における CD24 の発現意義と機能について検討した。

《材料および方法》

1. 臨床検体の免疫染色による予後評価

2002年より2012年までに当科で手術を施行した子宮頸癌 Ib～II期の症例において解析可能な117例（Ib期; 89例、II期; 28例、扁平上皮癌; 76例、腺癌; 41例）を対象とした。病理標本から組織マイクロアレイを作成し、抗 CD24 抗体による免疫染色を行い、組織型、進行期、生存率、リンパ節転移の有無、リンパ脈管侵襲の有無と CD24 の発現の関連を解析した。

2. 子宮頸癌株を用いた機能解析

ヒト子宮頸部扁平上皮癌株である CaSki 細胞に CD24 発現ベクターを Lipofectamin 法により遺伝子導入し、CD24 を過剰発現させた細胞を準備し以下の実験を行った。

2.1 CD24 過剰発現による浸潤能を Matrigel を塗布した Boyden チャンバーを用いた浸潤アッセイにより検討した。

2.2 CD24 過剰発現による pAkt、pERK、pNF- κ B、MMP9 の発現をウェスタン・ブロット法を用いて検討した。

2.3 CD24 過剰発現における上皮-間葉転換（epithelial-mesenchymal transformation, EMT）関連因子の Snail、Slug の mRNA 発現を RT-PCR 法で、E-cadherin、N-cadherin の発現をウェスタン・ブロット法を用いて検討した。

《結果と考察》

1. 臨床検体を用いた免疫染色では CD24 陽性群は陰性群と比較すると進行例が多く（50 % vs 16.5 % , $p < 0.01$ ）、リンパ節転移（34.6 % vs 14.3 % , $p = 0.03$ ）およびリンパ

脈管侵襲 (65.4 % vs 20.4 %, $p=0.01$) の割合が有意に高かった。また生存曲線は CD24 陽性群では陰性群に比べ有意に予後が悪かった (5 年生存率 62 % vs 86 %, $p=0.03$)。以上のことから、子宮頸癌において、CD24 は予後悪化因子であることが明らかとなり、脈管侵襲、リンパ節転移が有意に高いことから、CD24 は子宮頸癌において浸潤に関わる可能性が示唆された。

2.1 浸潤アッセイでは、CD24 を過剰発現させた CaSki 細胞は陰性コントロールと比較して有意に浸潤能が亢進した (89.2 ± 20.8 vs 37.1 ± 6.5 , $p<0.05$)。

2.2 ウェスタン・ブロット法において CD24 を過剰発現させた CaSki 細胞は Akt や ERK のリン酸化が亢進し、Akt の下流のシグナルである NF- κ B のリン酸化や MMP9 の誘導も認められ、CD24 を過剰発現させた細胞ではこれらのシグナルを介して浸潤能が増加している可能性が示唆された。

2.3 RT-PCR 法にて CD24 発現ベクターを lipofectamine 法で導入した CaSki 細胞では、CD24 が過剰発現していることを確認した。CD24 を過剰発現させた CaSki 細胞は EMT 現象にかかわる因子のなかで Slug が発現していることを確認した。また、EMT 現象に関係するタンパクの発現の解析では、CD24 を過剰発現させた細胞では上皮系細胞間の接着分子である E-cadherin の減弱が、さらに間葉系細胞の接着分子である N-cadherin の増強が認められた。以上から、CD24 を過剰発現させた細胞では、転写因子である Slug を介して EMT 現象を起こしている可能性が示唆された。

《結 論》

本研究で CD24 の強発現は子宮頸癌において予後悪化因子であることが明らかとなり、脈管侵襲、リンパ節転移が有意に高いことから、浸潤転移に関わる可能性が示唆された。また、*in vitro* において CD24 を過剰発現させた細胞は、Akt、ERK、NF- κ B のシグナル発現を介した MMP9 誘導による浸潤能増強、並びに転写因子である Slug を介する EMT 現

象を起こしている可能性が示唆された。以上より CD24 は浸潤・転移に関わる因子である事が推測され、子宮頸癌における予後マーカーとなり得る事が示された。

論文審査結果の要旨

子宮頸癌の治療には、外科的切除および放射線治療が行われているが、依然予後は不良であり、術前あるいは術後の補助療法等の選択にかかわる適切な予後因子や、新規分子標的薬などの新たな治療を見出すことが重要である。CD24 は glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) 結合型シアロ糖タンパクで細胞間接着や細胞分化に関わる膜蛋白で、リンパ球や上皮細胞、神経細胞の前駆細胞に発現し、これらの成熟に重要な役割を担っていると考えられている。しかし近年、膵、脳腫瘍、肺癌、肝細胞癌、卵巣癌や乳癌など多種の癌種にも発現していることがわかり、予後との関連も示唆されているが、子宮頸癌においてはその発現意義や機能について未だ明らかになっていない。本研究は子宮頸癌における CD24 の発現意義と機能解析を行ったものである。

申請者は、まず免疫染色により子宮頸癌の病理組織における CD24 の発現を調べた。その結果、CD24 陽性群は陰性群と比較すると進行例が多く、リンパ脈管侵襲およびリンパ節転移の割合が有意に高かった。また生存曲線は CD24 陽性群では陰性群に比べ有意に予後が悪いことがわかり、そこに注目し機能解析を行った。

次に申請者は、CD24 を過剰発現させた細胞の浸潤能が亢進していることを *in vitro* で示した。その機序として、CD24 を過剰発現させた培養細胞株は AKT や ERK のリン酸化が亢進し、AKT の下流のシグナルである NF- κ B のリン酸化や、MMP9 の誘導も認められ、これらのシグナルを介して浸潤能が増している可能性を示した。

また、EMT 現象の解析において、CD24 を過剰発現させた細胞では上皮系細胞の結合にかかわる E-cadherin の減弱が、さらに間葉系細胞で発現する N-cadherin の増強が認められ、EMT 現象に関わる転写因子では Slug が発現していることを示した。以上から、CD24 を過剰発現させた細胞では、転写因子である Slug を介して EMT 現象を起こしている可能性が示唆された。

本研究で、子宮頸癌において CD24 は浸潤、転移に関わる因子であることが示された。このことは子宮頸癌において CD24 は重要な予後マーカーであるばかりでなく、CD24 をターゲットとした治療が期待できる可能性を示唆しており、今後の子宮頸癌の臨床にとつ

て重要な知見と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Oncology Reports 34(5): 2282-2288, 2015