

子宮頸癌に対する化学療法の効果予測

大阪公立大学大学院医学研究科 女性病態医学

今井 健至

1. 諸言

現在、局所進行子宮頸癌（IIIB-IVA 期）に対しては、白金製剤を用いた同時化学放射線療法（CCRT）が標準的な治療法であるが¹⁾、IIIB-IVB 期の子宮頸がん患者の 5 年相対生存率は 60% 未満であり、早期子宮頸癌患者と比較してかなり低いのが現状である²⁾。術前化学療法（NAC）後に手術を行う方法は、局所進行子宮頸癌患者に対する治療法の選択肢の一つと考えられているが、まだ議論の余地がある。NAC は、子宮摘出が不可能な IIIB-IVA 期の子宮頸癌患者の腫瘍を縮小させて子宮摘出を可能にすると考えられ、患者の予後を改善することができる³⁻⁵⁾。しかし、NAC で腫瘍の縮小効果が得られない場合は放射線治療を受けることになり、主治療の開始が遅れるため予後が悪くなる。局所進行子宮癌患者に対する NAC の効果予測が可能になれば、NAC が適した治療候補者を的確に選択し、予後を改善することができる可能性がある。そのため、局所進行子宮頸癌患者に対する NAC の効果を予測できるバイオマーカーの特定が急務である。

Src ファミリーキナーゼ（SFKs）は、さまざまな種類の癌において、増殖、遊走、浸潤、分化、血管新生など、幅広い細胞機能の調節に重要な役割を担っている⁶⁾。Fyn は SFKs に属する非受容体型チロシンキナーゼで、過剰発現されると抗アポトーシス活性の促進をもたらす⁷⁾。したがって Fyn は、アポトーシスを誘導して効果を発揮する抗がん剤に対する耐性を付与する重要な分子と考えられる。

本研究は、Fyn の発現と子宮頸部扁平上皮癌における白金系抗癌剤の感受性との関係性に注目した初の研究であり、局所進行子宮頸部扁平上皮癌患者における NAC の効果を予測するバイオマーカーとして Fyn 発現の価値が明らかになった。

2. 方法

1996 年 4 月から 2010 年 4 月までに大阪市立大学医学部附属病院でシスプラチンによる NAC 治療を受けた FIGO IIIB 期（FIGO 2008）の患者 44 例を対象として、後方視的に解析を行った。

NAC の有効性に寄与する因子を比較するため、患者を NAC の有効性に応じて NAC successful group および NAC failure group の 2 群に分類した。NAC successful group は腫瘍が

縮小して子宮摘出が可能となった群、NAC failure group は、腫瘍の大きさが減少せずに子宮摘出不可能で放射線治療を行わなければならなかった群と定義した。NAC はシスプラチンを用いて行われ、バルーン閉塞動脈注入法で 30 分かけて 4 週間おきに 3 回動脈内注入を行った。NAC successful group では NAC 後に子宮摘出と連続放射線療法を行い、NAC failure group では NAC 後に放射線療法のみを行った。

治療前に生検で採取した検体で免疫組織染色を行い、各々スコアリングを行った。免疫組織染色には、パラフィン包埋組織ブロックから作製した 4 μm 厚の切片を用いた。一次抗体としてウサギモノクローナル抗 Fyn 抗体 (cat.ab184276 ; 1 : 250 希釈)、二次抗体として DAKO LSAB2 Peroxidase キットに含まれるビオチン化ヤギ免疫グロブリン G 抗体を使用した。

Fyn の発現は、Weighted scoring method を用いて定量化した⁸⁾。この方法は、染色された腫瘍細胞の割合のスコアと染色強度のスコアを掛け合わせて定量化する方法である。

CaSki 細胞 (ヒトパピローマウイルス関連子宮頸部扁平上皮癌、cat.No.IFO50007) を 96 ウェルプレートで培養し (2×10^3 細胞/ウェル)、Fyn siRNA を導入した群と、コントロール siRNA を導入した対照群の 2 群に分けた。次に、両群の細胞を 10、25、50 μM シスプラチン含有新鮮培地にて 37°C で 24 時間インキュベートした。波長 450 nm で各ウェルの吸光度を測定することで、細胞生存率を測定した。

2 つの異なるグループにおけるカテゴリー変数間の関連性を判断するために Fisher の正確検定を用い、2 つの異なるグループ間の中央値および平均値を比較するために Mann-Whitney U 検定を用いた。NAC 治療の効果を予測するための Fyn スコアのカットオフ値を決定するために、Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を作成した。Kaplan-Meier 法および log-rank 検定を用いて、2 つの異なるグループ間の生存率を比較した。

3.結果

NAC successful group 23 例、NAC failure group 21 例であり、両群間の年齢、BMI、血清 SCC 値、治療前の腫瘍径に有意差はなかった。NAC 後の腫瘍径は、NAC failure group が NAC successful group に比べて有意に大きかった ($P < 0.001$)。全生存期間については、NAC successful group は NAC failure group に比べて有意に良好であった ($P = 0.01$ 、図 1)。

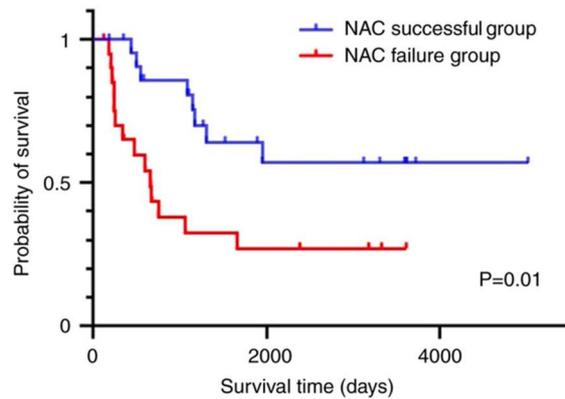


図 1 Kaplan-Meier 生存率解析で NAC successful group と NAC failure group について全生存率の比較を行った。NAC successful group の全生存率は NAC failure group に比べ有意に良好であった ($P=0.01$)。

Fyn タンパク質の発現は、主に細胞膜と細胞質で観察された (図 2)。Weighted scoring method で評価した結果、NAC failure group の発現量は NAC successful group に比べて有意に高かった ($P=0.003$ 、図 3A)。次に、NAC の有効性を予測するための weighted score のカットオフ値を ROC 曲線で評価した (図 3B)。カットオフ値 3 に基づき、weighted score が 3 以下の低発現群 ($n=25$) と weighted score が 4 以上の高発現群 ($n=19$) に分け、両群の NAC 成功率を比較した。低発現群では成功率 76%、失敗率 24%、高発現群では成功率 21.1%、失敗率 78.9%であった。低発現群の成功率は高発現群に比べて有意に高く ($P<0.001$)、Fyn の高発現は、局所進行子宮頸癌患者において NAC に対する感受性を低下させることに寄与していることが示唆された。

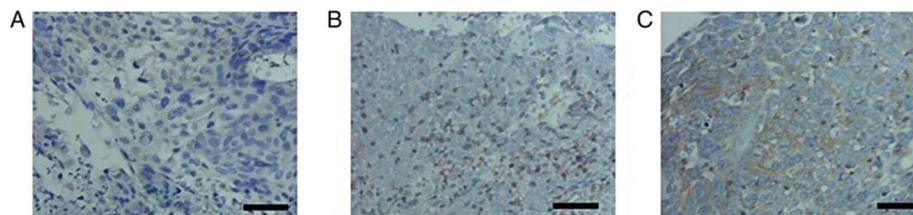


図 2 ヘマトキシリンで染色した子宮頸部扁平上皮癌標本における Fyn の免疫組織化学的染色。Weighted score が (A) 0、(B) 6、(C) 12。スケールバー、 $50\ \mu\text{m}$ 。

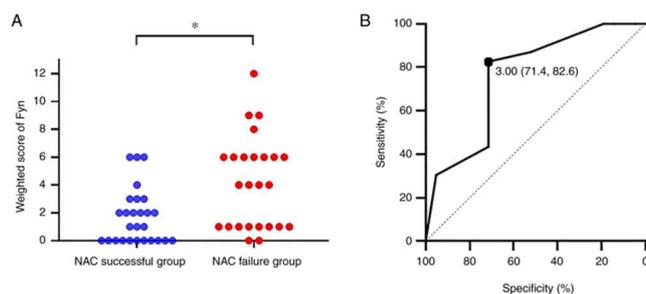


図3 Fyn の発現を Weighted score で解析した。(A) NAC successful group と NAC failure group に分けて Weighted score の比較を行った。NAC successful group のスコアは NAC failure group に比べ有意に低かった ($P=0.003$)。 (B) NAC の有効性を予測するための Fyn カットオフスコアを決定するための Receiver operator characteristic curve。感度 82.6%、特異度 71.4% のカットオフ値 3 が最適であり、曲線下面積値 0.759、95%信頼区間 0.613~0.905 であることが示された。

次に、ヒト子宮頸癌細胞を用いて、シスプラチン感受性に対する Fyn のノックダウンの影響を *in vitro* で評価した。Fyn の発現は、si-Fyn のトランスフェクションによりノックダウンした。図 4A に示すように、Fyn mRNA の発現は、コントロール siRNA を導入した対照細胞と比較して、処理細胞において有意に抑制された ($P<0.05$)。Fyn をノックダウンした細胞は、10、25、50 μM のシスプラチンで処理した場合、コントロールの siRNA を導入した細胞に比べて細胞生存率が有意に低かった (図 4B)。

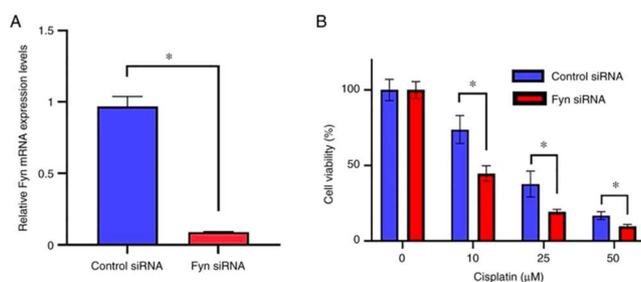


図4 シスプラチン感受性に対する Fyn ノックダウンの効果を検討した。(A) コントロールおよび Fyn ノックダウン細胞における相対的な Fyn mRNA 発現量を比較したところ、si-Fyn のトランスフェクション後、Fyn mRNA の発現レベルはコントロール細胞よりも有意に低かった ($P<0.05$)。 (B) 数種の異なる濃度のシスプラチンで細胞を処理した後、コントロール siRNA 群と Fyn siRNA 群について子宮頸癌細胞の細胞生存率の比較を行った。10、25、または 50 μM のシスプラチンで処理した場合、Fyn siRNA 群の細胞生存率は、コントロール siRNA 群の細胞生存率よりも有意に低いことが示された。データは平均値 \pm SD で示した。

4. 考察

局所進行子宮頸癌患者に対しては、NAC後に手術を行うことが標準的な治療法と考えられており、NACの有効性を明らかにした研究も多数ある^{4,5,9,10)}。

現在、局所進行子宮頸癌、特にIIIB～IVA期の患者に対しては、CCRTが標準治療となっているが¹⁾、その予後は不良である²⁾。予後を改善する戦略として、NACに続いて手術が候補に挙がるが、NACが有効でない場合、主治療の開始を遅らせることになる。したがって、NACの有効性を事前に予測することができれば、治療開始前にNACが有効に作用する患者を選択することができる。Fynは非受容体型チロシンキナーゼであり、細胞膜の内側に局在しているが、活性化されると核などの他の細胞成分に移動する¹¹⁾。

Fynは、脳機能調節に寄与する神経でのシグナル伝達、T細胞受容体を介したシグナル伝達、生理的条件下での接着を介したシグナル伝達など、多様な生物機能を示すことが報告されている。また、Fynは細胞増殖、細胞死、細胞運動、移動の制御を通じて、いくつかの悪性腫瘍の発生と進行に寄与することが報告されており、がんの発生、進行、転移に必須の因子と考えられている¹²⁾。

Fynは癌の受容体チロシンキナーゼ(EGFR、VEGF、platelet-derived growth factor receptor、fibroblast growth factor)経路に関与していることが報告されており、Ras非依存的経路(PIK3/Akt、STAT3、FAK、 β -catenin、VAV1、paxillin、SHCを介して)およびRas依存的経路(Ras/MEK/ERKを介して)においてシグナル伝達する¹³⁾。これらの経路への関与を通して、Fynは成長因子によって誘導されるAkt/PKBの抗アポトーシス作用を媒介する¹⁴⁾。Fynによるアポトーシスの制御により、Fynの発現と抗がん剤への感受性の相関を示す報告もいくつかある。Fynをノックダウンすると、ドキソルビシンによるアポトーシスが促進され、ドキソルビシン耐性細胞ではドキソルビシンに対する感受性が上昇する¹⁵⁾。Fynの発現と抗がん剤感受性の相関についても、いくつかの報告がある¹⁶⁻¹⁸⁾。

今回、局所進行子宮頸癌に対するシスプラチンを用いたNACの有効性においてFynの高発現が負の相関を示し、Fynのノックダウンにより*in vitro*の子宮頸がん細胞でシスプラチンに対する感受性が上昇することが明らかになった。これらの知見が蓄積されることで、NAC治療の効果をより正確に予測できるようになる可能性がある。

本研究では、Fynが患者の予後に寄与することが示されたが、本研究は単一施設からの比較的少数の症例によるレトロスペクティブ研究であるため、今回示された結果を確認するためには、複数の施設、理想的には複数の異なる国の患者によるさらなる大規模プロスペクティブ研究が必要であると考えられる。

5. 結語

本研究は、Fynの発現が、局所進行子宮頸部扁平上皮癌患者の生検標本を用いて容易に評

価できる NAC の効果予測バイオマーカーとして有用である可能性を示している。また、Fyn が子宮頸癌の治療において有望な分子標的である可能性を示唆している。

6.文献

- 1) Gennigens C, De Cuypere M, Hermesse J, Kridelka F and Jerusalem G. Optimal treatment in locally advanced cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2021; 21: 657-671.
- 2) Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE and Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022 ;72: 7-33.
- 3) Ishiko O, Sumi T, Yasui T, Matsumoto Y, Kawamura N, Ogita S, et al. Balloon-occluded arterial infusion chemotherapy, simple total hysterectomy, and radiotherapy as a useful combination-therapy for advanced cancer of the uterine cervix. *Oncol Rep.* 2000; 7: 141-144.
- 4) Nguyen VT, Winterman S, Playe M, Benbara A, Zelek L, Pamoukdjian F et al. Dose-intense cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy increases survival in advanced cervical cancer: An up-to-date meta-analysis. *Cancers (Basel).* 2022; 14: 842.
- 5) Sala P, Bogliolo S, Barra F, Fazio A, Maramai M, Cassani C, et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by radical surgery versus concurrent chemo-radiotherapy in the treatment of locally advanced cervical cancer: A multicenter retrospective analysis. *J Invest Surg.* 2022; 35: 308-314.
- 6) Yeatman TJ. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 470-480.
- 7) Fresno Vara JA, Cáceres MA, Silva A and Martín-Pérez J. Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Mol Biol Cell.* 2001; 12: 2171-2183.
- 8) Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ and Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1995; 55: 237-241.
- 9) Mori T, Hosokawa K, Sawada M, Kuroboshi H, Tatsumi H, Koshiha H, et al. Neoadjuvant weekly carboplatin and paclitaxel followed by radical hysterectomy for locally advanced cervical cancer: Long-term results. *Int J Gynecol Cancer.* 2010; 20: 611-616.
- 10) Shoji T, Takatori E, Furutake Y, Takada A, Nagasawa T, Omi H, et al. Phase II clinical study of neoadjuvant chemotherapy with CDDP/CPT-11 regimen in combination with radical hysterectomy for cervical cancer with a bulky mass. *Int J Clin Oncol.* 2016; 21: 1120-1127.
- 11) Campbell EJ, McDuff E, Tatarov O, Tovey S, Brunton V, Cooke TG et al J. Phosphorylated c-Src in the nucleus is associated with improved patient outcome in ER-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2008; 99: 1769-1774.
- 12) Saito YD, Jensen AR, Salgia R and Posadas EM. Fyn: A novel molecular target in cancer. *Cancer.* 2010; 116: 1629-1637.
- 13) Comba A, Dunn PJ, Argento AE, Kadiyala P, Ventosa M, Patel P, et al. Fyn tyrosine kinase, a downstream target of receptor tyrosine kinases, modulates antiglioma immune responses. *Neuro*

Oncol. 2020; 22: 806-818.

14) Elias D and Ditzel HJ. Fyn is an important molecule in cancer pathogenesis and drug resistance. Pharmacol Res. 2015; 100: 250-254.

15) Gu Y. miR-381 induces sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin by inactivation of MAPK signaling via FYN. Eur J Pharmacol. 2018; 839: 66-75.

16) Elias D, Vever H, Lænkholm AV, Gjerstorff MF, Yde CW, Lykkesfeldt AE et al. Gene expression profiling identifies FYN as an important molecule in tamoxifen resistance and a predictor of early recurrence in patients treated with endocrine therapy. Oncogene. 2015; 34: 1919-1927.

17) Grosso S, Puissant A, Dufies M, Colosetti P, Jacquel A, Lebrigand K, et al. Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors. Mol Cancer Ther. 2009; 8: 1924-1933.

18) Liu G, Ji L, Ke M, Ou Z, Tang N and Li Y. miR-125a-3p is responsible for chemosensitivity in PDAC by inhibiting epithelial-mesenchymal transition via Fyn. Biomed Pharmacother. 2018; 106: 523-531.

7.成果発表

学会発表

・ Shigenori Nanno, Takeshi Fukuda, Takuya Noda, Eijiro Uchikura, Yuichiro Awazu, Kenji Imai, Makoto Yamauchi, Tomoyo Yasui, Toshiyuki Sumi. FYN expression predicts the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for locally advanced uterine cervical cancer. 2022 年第 74 回日本産科婦人科学会学術講演会. 福岡. 2022.