



Title	子宮体部上皮性腫瘍ならびに膀胱細胞におけるPSFの発現 [全文の要約]
Author(s)	朴, 鐘建
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13021号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70545
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2400
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Jongkun_Park_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文 (要約)

子宮体部上皮性腫瘍ならびに
膵癌細胞における PSF の発現

(PSF expression in uterine endometrial neoplasms
and pancreatic cancer cells)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

朴 鐘建

緒言

生理的な真核生物の細胞分裂は厳密な制御機構の中で行われるが、悪性腫瘍の本質的な異常は無秩序な細胞増殖であり、細胞分裂の制御機構の破綻にある。細胞分裂の過程では、DNA複製の起点で複数のタンパク質アセンブリーを形成し、秩序だったDNA複製が行われる。この制御システムは種にわたって高度に保存されている。DNA複製の起点部では、不活性状態でDNA上に存在するMCMとORCが結合し、引き続きCdc45、GINS複合体と結合し、CMG(Cdc45-MCM-GINS)複合体が形成される。さらにDNAポリメラーゼ- α が動員されることでDNA複製が開始される。

GINS複合体は進化的に非常に良く保たれており、Sld5, PSF(Partner of Sld Five) 1, PSF2, PSF3の4つのサブユニットで構成されている。GINS複合体はDNA複製プロセスの開始と伸長に必須であり、真核生物のDNA複製において中心的な役割を果たしている。

生理的には、GINS複合体は発生の段階において重要な役割を果たしており、GINS遺伝子の欠損では胚盤胞の内部細胞塊の細胞分裂が障害されるため、胎生6日目の段階で致死性である。一方、成体においてGINS複合体の発現は骨髄、胸腺、精巣などの限られた臓器と、消化管の粘膜や表皮の基底層など増殖と再生の活発な一部の細胞において観察される。

最近の報告により、GINS複合体のサブユニットが結腸癌、乳癌、肝内胆管癌、肺癌などの悪性腫瘍において過剰発現していることが明らかになり、腫瘍細胞の増殖過程に関与している可能性が示唆された。

本研究では、GINS複合体のうち、PSF1, PSF3と腫瘍細胞における発現を検討した。第一章では、子宮体部上皮性腫瘍におけるPSF3発現の臨床病理学的意義を明らかにするため、PSF3発現と子宮体部上皮性腫瘍の組織学的分化度、及び臨床病理学的因子との関連性について解析を行った。第二章では、予後不良な固形癌の1つである膵臓癌由来の細胞株を用いて、PSF1とPSF3の発現、癌幹細胞マーカーや関連分子の発現について検討を行なった。

第一章

子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 発現の臨床病理学的研究

緒言

女性生殖器腫瘍において，子宮体部上皮性腫瘍は子宮頸部の上皮性腫瘍と並び頻度の高い悪性腫瘍であり，近年その発生率が増加傾向にあることが問題となっている．

子宮体部上皮性腫瘍は，Bokhman によって提案された分類法により，1 型または 2 型に分類される．しかしながら，子宮体部上皮性腫瘍の発癌に関与する遺伝子変異に関する研究の進歩により，子宮体部上皮性腫瘍は既存の分類に基づく考え方では必ずしも十分な説明が成し得ないことが明らかになってきた．加えて，子宮体部上皮性腫瘍の病理診断では，良悪の判定や組織学的分類において，診断の再現性の面でも多くの課題が残されているのが現状である，子宮体部上皮性腫瘍の病理診断では，客観性のある診断マーカーの確立を目指した研究の進展が望まれている．

本章では，子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 発現の臨床病理学的検討を行なった．

研究方法

1. 症例

2008-2012 年に北海道がんセンターにおいて摘出術が施行された子宮内膜異型増殖症 25 例，類内膜癌 123 例，非類内膜癌 32 例（漿液癌 10 例，明細胞癌 8 例，混合癌 14 例），計 180 例を対象とした．

2. 免疫組織化学染色

抗 PSF3 抗体，抗 Ki-67 抗体，抗 *p53* 抗体を用いて autostainer, iVIEW DAB 検出キットで免疫組織化学染色を行なった．PSF3 のポジティブコントロールとし

てはヒト男性セミノーマ組織切片を用いた。

3. 免疫組織化学染色の評価

陽性細胞の割合を，TPS (tumor proportion score: %) で換算し，0-20%をスコア 0，21-40%をスコア 1，41-60%をスコア 2，61%以上をスコア 3 として評価した評価した。

4. 統計解析

Pearson's χ^2 検定，Fisher's exact test，*t*-test，Wilcoxon 符号付き順位検定を解析に応じて使い，*p* 値は<0.05 を有意とした。RFS および OS の解析には，Kaplan-Meier 生存曲線を作成した。

研究結果

1. 異型増殖症と G1 類内膜癌における PSF3 発現

PSF3 の発現が，過形成病変と腫瘍性病変で異なるのか，異型増殖症と G1 類内膜癌の症例において，PSF3 免疫組織化学染色による検討を実施した。G1 類内膜癌の症例は平均 PSF3 TPS 値が 30.7%に対して，異型増殖症の平均 PSF3 TPS 値は 10.4%であり，両群間の PSF3 TPS 値は統計的に有意差を示した (*p*<0.001)。

2. 類内膜癌における PSF3 発現

G2/G3 類内膜癌の症例では PSF3 TPS 平均値 56.5%を示し，組織学的分化度に従って PSF3 TPS 値の段階的な上昇が認められた。69 例の G1 類内膜癌のうち 55 例 (79.7%) が PSF3 TPS スコアリングで 0，1 を示したのに対して，G2 と G3 類内膜癌 54 例うち 42 例 (77.7%) が PSF3 TPS スコア 2，3 であった。

3. 子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 と Ki-67 染色性の比較検討

180 症例より無作為的に 30 例を抽出し，PSF3 と Ki-67 の免疫組織化学染色を連続切片にて施行し，比較検討を行った。その結果，PSF3 発現は腫瘍細胞では Ki-67 と比較してほぼ同等であった。その一方，間質細胞では PSF3 陽性細胞は Ki-67 陽性細胞に比して少ない傾向が見られた。腫瘍細胞と間質細胞における陽性率を比較した結果，間質細胞では PSF3 陽性細胞が少なく，PSF3 が腫瘍細胞に選択的に発現していることが明らかになった。

4. G2 と G3 類内膜癌症例における PSF3 発現と *p53* 変異の関連性

PSF3 と *p53* 変異の関連について，G2 と G3 子宮内膜癌 54 例を対象として検

討を行なった。その結果、54例の中5例で変異型 *p53* 発現が確認されたが、これらの症例の PSF3 スコアに一定の傾向を認めなかった。

5. 子宮体部上皮性腫瘍病変における PSF3 TPS スコアの分布

異型増殖症は PSF3 TPS スコア 0 が 88%、G1 類内膜癌は PSF3 TPS スコア 1 が 49.3%、G2 と G3 類内膜癌、及び非類内膜癌では殆どの症例が PSF3 TPS スコア 2 以上を示した。

6. PSF3 過剰発現と臨床病理学的因子との関連性

PSF3 TPS スコア 0, 1 を PSF3 低発現群、PSF3 TPS スコア 2, 3 を PSF3 高発現群とし、臨床病理学的因子との関連性を検討した。PSF3 高発現と統計的に有意な関連性を示した臨床病理学的因子は、病理学的 T 因子 ($P=0.000$, $P=0.001$)、リンパ侵襲 ($P=0.001$, $P=0.008$) および術後再発率 ($P=0.000$, $P=0.002$) であった。

7. PSF3 発現と予後との関連性

PSF3 過剰発現と子宮体部上皮性腫瘍の予後との相関関係を調べる為に、RFS, OS について PSF3 高発現群と低発現群で Kaplan-Meier 生存曲線を作成した。PSF3 高発現群では、全組織型及び類内膜癌抽出群いずれも RFS, OS が有意差をもって短かった ($p < 0.05$)。更に、FIGO stage I と II 症例を抽出して解析した結果においても、PSF3 高発現群で予後が不良であった。

考察

子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 発現を免疫組織化学的に検討した結果、50%以上が PSF3 高発現であり、PSF3 の TPS 値が異型増殖症と G1 類内膜癌の鑑別診断、ならびに類内膜癌の組織学的分化度の評価に有用であることが明らかとなった。また、PSF3 発現の組織型による特異性は見られなかったものの、PSF3 過剰発現は病理学的 T 因子、リンパ管侵襲や術後再発など臨床病理学的因子と関連していることが明らかになった。

前駆病変である異型増殖症の 88%は PSF3 TPS 20%以内であるが、G1 類内膜癌の 69.6%は PSF3 TPS 20%を超えており、PSF3 TPS 20%が両者の鑑別において cut-off 値の参考値となる。しかしながら、G1 類内膜癌の 30.4%は PSF3 TPS 20%

以内であり、他の診断マーカーと組み合わせた検討が必要と考えられる。

本章では、全組織型、類内膜癌を抽出した群、FIGO stage I-II 群いずれにおいても、PSF3 を過剰発現している症例で予後不良であることが明らかとなった。したがって、子宮体部上皮性腫瘍において、PSF3 の検討が有用な予後予測因子になることが示唆された。

Ki-67 は、G0 期以外の細胞周期すなわち分裂期にある全ての細胞で陽性になり、腫瘍の増殖性を表わすマーカーとして広く使われている³⁴。一方、子宮体部上皮性腫瘍において、PSF3 がより選択的に腫瘍細胞に発現していることが明らかとなった。PSF3 が DNA 複製に働いているという生理的役割を考慮すると、PSF3 の増殖性マーカーとしての利用を視野においた、多種の癌腫を対象とした検討を進める必要があると考えられた。

第二章

膵癌細胞株における PSF1 及び PSF3 の発現に関する研究

緒言

浸潤性膵管癌は、原発性膵悪性腫瘍の約 8 割を占める。5 年生存率は 5% 程度で、極めて予後不良な難治性固形癌の 1 つである。発見時には進行している症例が多く、初診断時に手術可能な症例は 20% 程度である。標準的化学療法としては、ゲムシタビン単独療法が推奨されているが、治療抵抗性を呈する症例も見られ、問題となっている。

悪性腫瘍における治療抵抗性の原因の一つとして、癌幹細胞の存在が指摘されている。癌幹細胞は細胞周期静止期を保ちつつ自己複製能を保持する為、化学療法に抵抗性であり、再発や遠隔転移の原因になることが知られている。様々な癌幹細胞マーカーが報告されているが、癌幹細胞では GINS 複合体のサブユニットである PSF1 の過剰発現が見られ、特に腫瘍細胞の増殖や脈管浸潤に関わることが報告されている。

本章では、膵癌細胞株を用い、PSF1、PSF3、癌幹細胞マーカー、癌細胞の悪性形質に関わる分子の発現を検討した。

研究方法

1. 材料及び実験モデル

実験には、所属教室で樹立された膵癌細胞株である PCI43、PCI66 に加えて、一般的に広く使われている膵癌細胞株である Mia-PaCa2 を使用した。24 時間培養によって monolayer 化した CFSE 標識血管内皮細胞の上に膵癌細胞を蒔き、更に 24 時間共培養を行った。共培養後に、CFSE 陰性細胞集団として膵癌細胞を分離し、実験に使用した。コントロール群では細胞条件の一致のため、細胞数を 2 倍にして培養した。

2. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)及び Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

3. 蛍光免疫染色

チャンバースライド上に培養した細胞を、4%パラホルムアルデヒドで室温、15分間固定し、0.1% Triton X-100 で4分間の細胞透過処理を行った後、70%メタノールで室温、4分間固定した。抗体の非特異反応抑制のため、0.1%正常ヤギ血清で10分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体を室温、60分間反応させ、二次抗体として Alexa Fluor 標識ポリクローナル抗体を室温、45分間反応させた。

研究結果

1. 膵癌細胞株と HUVEC の共培養による PSF1 と 3 の変化

24時間共培養後 FACS Aria IIIにて sorting した膵癌細胞において、Real time PCR にて共培養した膵癌細胞群と単独培養群のメッセージ発現量の比較検討を行った。検討した三つの膵癌細胞株、いずれでも共培養群で統計的に有意な PSF1 と PSF3 の発現亢進を認めた。続いて、チャンバースライド上で培養した細胞の蛍光免疫染色を施行した。膵癌細胞単独培養群と比較して、CFSE 標識 HUVEC 共培養群において PSF1 (Alexa 594 により赤色に標識) の発現亢進が膵癌細胞の核で認められた。検討した膵癌細胞株 3 株で同様の結果を認めたため、以下の実験に関しては、E-cadherin を発現し、上皮性性質が保たれている PCI-43 株を用いて検討した。

2. 膵癌細胞株と HUVEC の共培養による癌幹細胞マーカーの変化

CD44 のスプライス変異体である CD44v9 は近年、胃癌や膵臓癌で癌幹細胞マーカーとして報告されている。共培養による CD44v9 の発現変化について、Real-time PCR により検討したところ、PSF1 及び PSF3 の発現亢進と連動して CD44v9 mRNA の発現の亢進が認められた。蛍光免疫染色による検討では、膵癌細胞単独培養群と比較して、CFSE 標識 HUVEC 共培養群において CD44v9 の発現亢進が膵癌細胞膜に確認された。

3. 膵癌細胞株と HUVEC の共培養による MMP14 発現の変化

癌浸潤能力の指標となる分子である MMP14 の発現変化について検討した。Real time PCR にて MMP14 mRNA 発現量を検討した結果、共培養群の膵癌細胞株において有意な発現亢進を認めた。また、蛍光免疫染色による検討では、膵癌細胞単独培養群と比較して、CFSE 標識 HUVEC 共培養群において MMP14 の発現亢進が確認された。

4. 膵癌細胞株と HUVEC の共培養による薬剤耐性能の変化

癌細胞の薬剤耐性機構において、MDR1 の発現により薬物の細胞膜外への輸送能が亢進し、多剤耐性能の獲得に関連することが報告されている。MDR1 発現に関して、蛍光免疫染色による検討では、膵癌細胞単独培養群と比較して、CFSE 標識 HUVEC 共培養群において MDR1 の発現亢進が認められた。

5. 膵癌細胞株における PSF1 発現と共培養細胞種による相違

共培養時に観察される膵癌細胞株の性質変化が共培養する細胞種による相違があるのか検討を行なった。膵癌細胞株とヒト線維芽細胞株 (NHDF) を共培養し、HUVEC 共培養時の PSF1 発現変化と比較した結果、NHDF との共培養に比べ、HUVEC との共培養を行なった際に膵癌細胞における PSF1 発現がより亢進することが明らかになった。

考察

悪性腫瘍において、脈管侵襲や間質浸潤能の獲得は悪性形質を反映する因子であり、診断や治療の両面で癌の生物学的悪性度を理解する上で重要な指標となる。既報の報告では、マウスの Lewis 肺癌モデルの実験系で、脈管侵襲を示す腫瘍細胞において GINS 複合体のサブユニットである PSF1 の発現が亢進しているとの報告がある。また、トリプルネガティブ乳癌細胞株において PSF2 が高発現していること、PSF2 をサイレンシングすることで癌浸潤マーカーの 1 つである MMP9 の発現が低下し、腫瘍浸潤能を抑制することが報告されている。

これまでに浸潤性膵管癌における PSF1 及び PSF3 発現を検討した報告はないが、今回の検討により、血管内皮細胞との共培養を行った膵癌細胞群で PSF1 および PSF3 の発現亢進を認めた。癌細胞単独培養時に比べて、癌幹細胞マーカー

である CD44v9 や癌浸潤能を推定する指標である MMP14 の発現亢進を，細胞質には薬剤耐性機構に関わる MDR-1 の発現亢進を認めた．本研究結果により，GINS 複合体サブユニットである PSF は癌細胞における悪性形質に関連する分子と連動して発現が誘導されている可能性が考えられた．

今回の実験で NHDF との共培養より HUVEC と共培養を行った際に PSF1 の発現が亢進したことは，非常に興味深い部分であり，今後 HUVEC と膀胱癌細胞株の相互作用に着目した詳細な解析を進めることで，癌細胞の幹細胞化を含む悪性形質獲得のメカニズムが明らかになることが期待される．

総括

以上の研究により，生理的には DNA 複製に働く GINS 複合体のサブユニットである PSF の過剰発現が腫瘍増殖や悪性形質と関連している可能性が考えられた．今後の課題としては，より多くの症例や多種の癌腫を対象とした解析を行うことで，臨床病理学的な診断マーカーとしての有用性を確認する必要があると考えられる．また，PSF 発現誘導のメカニズムを明らかにすること，発現誘導された PSF が果たして GINS 複合体を形成し，生理的作用と同等の機能を発揮しているのか，あるいは癌細胞において別機能を発揮しているのか，分子メカニズムの詳細を明らかにしていくことで，将来的には治療ターゲットとして癌の治療戦略に一助となることが期待される．