

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09769

研究課題名(和文)新規免疫チェックポイント分子B7H3経路による子宮体癌転移能獲得の分子基盤解明

研究課題名(英文) B7H3 as a promising therapeutic target for endometrial cancer

研究代表者

井平 圭 (Ihira, Kei)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：50813820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規免疫チェックポイント分子B7H3は、癌細胞に対する免疫細胞の攻撃力を弱め、癌細胞悪性形質の獲得にも寄与する。本研究では、独自に樹立した高浸潤性亜株及び癌幹細胞様sphere細胞を用い、体癌細胞悪性形質の獲得におけるB7H3の役割とmiR-199aまた変異型p53によるB7H3発現の制御機構の解明を試みた。研究の結果、CTDSPL及びmiR-199aの発現低下、また変異型p53が、B7H3の高発現を引き起こし、下流のPI3K/AKT及びSTAT3経路を活性化することで、体癌細胞の悪性形質の獲得に寄与することが明らかになり、B7H3が体癌の新しい治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体癌は最も頻度の高い婦人科悪性腫瘍の一つであり、患者数(特に若い世代)は年々増加傾向にある。体癌の進展に関わる分子基盤は十分には理解されておらず、依然として有望な創薬標的分子の同定は急務である。そこで、体癌において、癌の進展の促進に重要な役割を果たすB7H3を見出して、その関連分子経路を解明した。今後B7H3を標的することで、体癌細胞の転移能を阻害することができれば、体癌の新しい治療法を創出する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The new immune checkpoint molecule B7H3 reduces the capacity of immune cells to target cancer cells and leads to cancer progression. Using our previously established highly invasive subline and cancer stem cell-like sphere cells and the CRISPR/Cas9 method, we attempted to elucidate the role of B7H3 in the acquisition of malignant features in endometrial cancer cells as well as the regulatory mechanism of B7H3 expression by CTDSPL, miR-199a, and mutant p53. Down-regulation of the CTDSPL gene and miR-199a, as well as mutant p53, all contribute to the acquisition of malignant features in endometrial cancer cells by increasing B7H3 expression and activating downstream PI3K/AKT and STAT3 pathways, implying that B7H3 is a novel therapeutic target for endometrial cancer. According to our results, B7H3 may be a potential therapeutic target for endometrial cancer.

研究分野：婦人科癌

キーワード：B7H3 子宮体癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 体癌は最も頻度の高い婦人科悪性腫瘍の一つであり、患者数(特に若い世代)は年々増加傾向にある。体癌の進展に関わる分子基盤は十分には理解されておらず、依然として有望な創薬標的分子の同定は急務である。

(2) 癌組織中に、薬剤耐性及び高転移性を示す癌幹細胞が存在する。また、上皮系の癌細胞は上皮間葉転換 (EMT) によって、転移能、薬剤耐性と癌幹細胞性など悪性形質を獲得する。更に、癌幹細胞は EMT の形質を呈することが知られ、EMT と癌幹細胞様形質を制御するメカニズムの解明は、体癌進展の抑制に向けた治療法の開発の鍵である。

(3) 癌細胞表面に発現する「免疫チェックポイント」分子である B7H3 は、T 細胞の機能を阻害して、免疫監視機構をすり抜ける重要な免疫チェックポイント分子である。B7H3 は様々な腫瘍に発現亢進し、PI3K/AKT また STAT3 経路が活性化することにより、癌細胞の増殖と浸潤の促進に大きな影響を与えることが近年の研究によって明らかとなった。我々は、体癌における B7H3 の発現を調べて、周辺の正常組織に比べ体癌組織中の B7H3 の発現は有意に上昇することを独自に発見した。これまで、体癌細胞悪性形質の獲得における B7H3 の役割とその機序はまだ不明である。

(4) 非翻訳 RNA は、20 塩基程度の microRNA (miRNA) に代表される短鎖非翻訳 RNA と数百から数万塩基長の長鎖非翻訳 RNA に大別できる。miRNA は、部分的に相補的な標的 mRNA と結合し、転写後の翻訳を抑制することで、腫瘍細胞の増殖、浸潤などを制御する。一方、長鎖非翻訳 RNA は、転写因子やクロマチン修飾因子、更に miRNA との相互作用によって、RNA ネットワークを形成し、遺伝子の転写と翻訳を制御することで、腫瘍の進展に関与する。長鎖非翻訳 RNA である HOTAIR は、体癌を含む多くの腫瘍の形成と転移を促進する役割を果たしていることを明らかになった。B7H3 の過剰発現の制御に関与する非翻訳 RNA ネットワークの検討は、体癌の悪性化機序と免疫逃避機構の解明に資するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、B7H3 の体癌進展における促進的役割と非翻訳 RNA ネットワークによる B7H3 発現制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 我々の研究室で体癌細胞株から樹立された EMT 形質を示す高浸潤性亜株と癌幹細胞様 sphere 細胞を使い、体癌細胞における B7H3 遺伝子の機能的役割をノックアウト (CRISPR/Cas9) と過剰発現により解析した。

(2) miR-26a/199a、CTDSPL 遺伝子、また変異型 p53 及び TMPO-AS1 による B7H3 発現の制御機構を中心に、B7H3 発現制御を担うシグナル伝達経路を解明し、体癌進展の分子機構を検討した。

4. 研究成果

(1) B7H3 は子宮体癌細胞の EMT 形質を増強して、子宮体癌の進展と抗癌剤耐性の獲得を促進することを発見した。

(2) B7H3 の下流シグナル伝達経路の全体像を解明するためには、B7H3 の過剰発現とノックアウトによる遺伝子発現量の変化を Agilent microarray により網羅的に解析し、発現量が有意に変動する遺伝子群を抽出した。

(3) Gene Ontology、Gene Set Enrichment Analysis、生物学的 KEGG 経路の解析を行い、潜在的下流シグナルを解明した。B7H3 の発現変動に伴う PI3K/AKT また STAT3 経路分子の発現変化を Western blot 法により検討することで、B7H3 の高発現によって、PI3K/AKT また STAT3 経路が活性化して、EMT が誘導され、子宮体癌の進展と抗癌剤耐性が促進される分子機序が示唆された。

(4) 網羅的な発現解析により、体癌進展に関与する複数の miRNA、長鎖非翻訳 RNA と遺伝子を同定した。

(5) 定量 PCR で、その miRNA、長鎖非翻訳 RNA と遺伝子発現の変動を確認した。

(6) 我々の研究室で、体癌細胞から独自に樹立された高浸潤性亜株また癌幹細胞様 sphere 細胞

と親株を用いて、miRNA、長鎖非翻訳 RNA 及び遺伝子の発現を比較することで、高浸潤性亜細胞株また癌幹細胞様 sphere 細胞で、特異的に発現量が変動する miRNA、長鎖非翻訳 RNA 及び遺伝子を同定した。

(7) 体癌の進展と癌幹細胞性の形成に關与する複数の miRNA、長鎖非翻訳 RNA 及び複数の癌關連遺伝子を候補として発見した。そして B7H3 mRNA の 3-非翻訳領域を直接に標的する miRNA 群を in silico で予測した。その結果、miR-199a などの発現低下により、B7H3 遺伝子の発現が生じることが明らかになった。発見した候補 miRNA と照合し、miR-199a などを最終的に同定した。

(8) luciferase reporter assay を行い、miR-199a が B7H3 の 3-非翻訳領域に直接結合することで、B7H3 遺伝子の発現を抑えることを証明した。長鎖非翻訳 RNA 候補である TMPO-AS1 の発現を変動させ、B7H3 発現を Western blot 法で検討し、B7H3 を制御する TMPO-AS1 を同定した。

(9) miR-199a 及び TMPO-AS1 の機能を細胞アッセイにより解析した。TMPO-AS1 が miR-199a の発現を抑えることで、B7H3 の発現を増加させ、EMT が誘導され、子宮体癌の進展と抗癌剤耐性が促進される分子機序を解明した。

(10) CTDSPL 発現の調節機構について、CTDSPL 遺伝子のメチル化状態を Bisulfite sequencing で解明することで、CTDSPL 発現の発現低下は、DNA メチル化が深く關与することを明らかにした。

(11) DNA メチル化阻害剤(5-AZA)を添加した結果、体癌細胞株で見られた CTDSPL 発現の減少は有意に回復した。このことから、CTDSPL 遺伝子の発現制御に DNA メチル化の關与が示唆され、CTDSPL は miR-26a を介して、B7H3 を発現低下させる可能性を見出した。

(12) miRNA による CTDSPL 発現制御に関しては、メラノーマで miR-181 は CTDSPL を標的し、また miR-181 は体癌で発現亢進することが報告されたから、miR-181 による CTDSPL と B7H3 発現の制御を luciferase assay で解明することによって、体癌細胞において miR-181 は CTDSPL を直接に標的し、その発現を抑制する研究成果を得られた。

(13) 変異型 p53 と miR-199a の機能的な關連をクロマチン免疫沈降法と luciferase assay により分析したところ、変異型 p53 が miR-199a の発現を抑制することで、間接的に B7H3 のレベルを増加することを明らかにした。

(14) 以上の研究成果によって、B7H3 遺伝子の過剰発現による体癌転移能獲得の分子メカニズムの一端が解明され、体癌の根絶を目指す癌研究に大きな貢獻が期待できると考える。今後 B7H3 を標的することで、体癌細胞の転移能を阻害することができれば、体癌の新しい治療法を創出する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Dong Peixin, Xu Daozhi, Xiong Ying, Yue Junming, Ihira Kei, Konno Yosuke, Watari Hidemichi	4. 巻 12
2. 論文標題 The Expression, Functions and Mechanisms of Circular RNAs in Gynecological Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1472 ~ 1472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12061472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Dong Peixin, Xiong Ying, Konno Yosuke, Ihira Kei, Xu Daozhi, Kobayashi Noriko, Yue Junming, Watari Hidemichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Critical Roles of PIWIL1 in Human Tumors: Expression, Functions, Mechanisms, and Potential Clinical Implications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 425-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.656993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhang Ruitao, Zhao Guannan, Shi Huirong, Zhao Xinxin, Wang Baojin, Dong Peixin, Watari Hidemichi, Pfeffer Lawrence M., Yue Junming	4. 巻 160
2. 論文標題 Zinc regulates primary ovarian tumor growth and metastasis through the epithelial to mesenchymal transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 775 ~ 783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Xu Daozhi, Dong Peixin, Xiong Ying, Chen Rui, Konno Yosuke, Ihira Kei, Yue Junming, Watari Hidemichi	4. 巻 8
2. 論文標題 PD-L1 Is a Tumor Suppressor in Aggressive Endometrial Cancer Cells and Its Expression Is Regulated by miR-216a and lncRNA MEG3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 598205-598221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.598205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Dong Peixin, Xiong Ying, Yue Junming, Xu Daozhi, Ihira Kei, Konno Yosuke, Kobayashi Noriko, Todo Yukiharu, Watari Hidemichi	4. 巻 38
2. 論文標題 Long noncoding RNA NEAT1 drives aggressive endometrial cancer progression via miR-361-regulated networks involving STAT3 and tumor microenvironment-related genes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 295 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-019-1306-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhao Guannan, Wang Qinghui, Wu Zhongzhi, Tian Xinchun, Yan Huan, Wang Baojin, Dong Peixin, Watari Hidemichi, Pfeffer Lawrence M., Guo Yuqi, Li Wei, Yue Junming	4. 巻 18
2. 論文標題 Ovarian Primary and Metastatic Tumors Suppressed by Survivin Knockout or a Novel Survivin Inhibitor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 2233 ~ 2245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Asano Hiroshi, Hatanaka Kanako C., Matsuoka Ryosuke, Dong Peixin, Mitamura Takashi, Konno Yosuke, Kato Tatsuya, Kobayashi Noriko, Ihira Kei, Nozaki Ayako, Oku Akira, Matsuno Yoshihiro, Hatanaka Yutaka, Watari Hidemichi	4. 巻
2. 論文標題 L1CAM Predicts Adverse Outcomes in Patients with Endometrial Cancer Undergoing Full Lymphadenectomy and Adjuvant Chemotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-08103-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xu Daozhi, Dong Peixin, Xiong Ying, Yue Junming, Ihira Kei, Konno Yosuke, Kobayashi Noriko, Todo Yukiharu, Watari Hidemichi	4. 巻 11
2. 論文標題 MicroRNA-361: A Multifaceted Player Regulating Tumor Aggressiveness and Tumor Microenvironment Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1130 ~ 1130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11081130	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Xu Daozhi, Dong Peixin, Xiong Ying, Yue Junming, Konno Yosuke, Ihira Kei, Kobayashi Noriko, Todo Yukiharu, Watari Hidemichi	4. 巻 9
2. 論文標題 MicroRNA-361-Mediated Inhibition of HSP90 Expression and EMT in Cervical Cancer Is Counteracted by Oncogenic lncRNA NEAT1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 632 ~ 632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9030632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Daozhi Xu, Peixin Dong, Kei Ihira, Yosuke Konno and Hidemichi Watari
2. 発表標題 MicroRNA-361 directly targets HSP90 to repress EMT and invasion in cervical cancer cell
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Peixin Dong, Daozhi Xu, Kei Ihira, Yosuke Konno and Hidemichi Watari
2. 発表標題 Long non-coding RNA NEAT1 drives aggressive endometrial cancer progression via sponging microRNA-361
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Peixin Dong, Daozhi Xu, Kei Ihira, Yosuke Konno and Hidemichi Watari
2. 発表標題 lncRNA NEAT1-mediated miR-361 downregulation contributes to EMT and sphere formation of cervical cancer cells via increasing HSP90 expression
3. 学会等名 The 2020 xDigital Annual Global Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 董 培新
2. 発表標題 子宮頸癌悪性化におけるPD-L1の促進的役割の解明とその発現制御に関する基礎的検討
3. 学会等名 第28回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 DONG PEIXIN
2. 発表標題 Control of PD-L1 expression by miR-140/142/340/383 in cervical cancer
3. 学会等名 The 2nd World Conference of Immuno-Oncology-2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://researchmap.jp/2853

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	董 培新 (Dong Peixin) (50602504)	北海道大学・医学研究院・特任助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------