

令和元年6月18日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11139

研究課題名(和文) 婦人科腫瘍における不活性化センダイウイルス粒子の有用性の検討とその作用機構の解明

研究課題名(英文) The effectiveness and mechanism of HVJ-E for gynecological cancer

研究代表者

木村 敏啓 (KIMURA, TOSHIHIRO)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90584524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌細胞株10種類を用いてHVJ-Eの抗腫瘍効果を測定し3種類において20%程度の抗腫瘍効果を確認した。それらの細胞株での蛋白発現を比較したが、アポトーシス関連の発現に明らかな変化は見られなかった。子宮頸癌でのHVJ-Eの抗腫瘍効果はアポトーシス以外の系によるものと考えられる。子宮頸部異型上皮の三次元培養については培養細胞塊は作成可能であったが、その細胞塊の組織学的な確認やその特性等を解析するには至らなかった。子宮頸部異型上皮の皮下移植モデルマウスの作成については移植後腫瘍が増大は見られず、細胞塊の増殖に関する問題であるのか移植の条件によるものであるのかの検討を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌は主治療は手術療法、放射線化学療法で妊娠可能年齢の女性の妊孕性を犠牲にする重大な疾患である。ワクチン接種や子宮がん検診により子宮頸癌発症の防止及び早期発見により子宮頸部異型上皮、上皮内癌の段階での治療により妊孕性温存を可能にする。子宮頸部異型上皮、上皮内癌の治療である子宮頸部円錐切除術は妊孕性温存は可能であるが早産率の上昇が問題となる。

HVJ-Eはその抗腫瘍作用により子宮頸部異型上皮、上皮内癌、子宮頸癌に対して新しい治療法としての可能性をもっている。HVJ-Eにより妊孕性を維持し治療できることは社会的意義を持つと考えられる

研究成果の概要(英文)：The anti-tumor effect of HVJ-E was measured using 10 types of cervical cancer cell lines, and the anti-tumor effects for the three lines among them were confirmed.

Although protein expression in these cell lines was compared, no apparent change in apoptosis-related protein expression was seen. The antitumor effect of HVJ-E in cervical cancer is considered to be due to other than apoptosis. Although spheroid could be prepared for three-dimensional culture of cervical intraepithelial neoplasia, it was not possible to analyze histologic confirmation of the cell mass or its characteristics. For the preparation of subcutaneous transplant model mice of cervical cervical intraepithelial neoplasia cells, it is not seen that the tumor grows after transplantation, and it is necessary to examine whether it is a problem concerning cell mass growth or the condition of transplantation.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸部異型上皮 子宮頸癌 HVJ-E 三次元培養

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は子頸癌検診の普及により比較的早期で発見されることが多い。また、性交開始の低年齢化による子宮頸癌発生の若年化や晩婚化による妊娠出産年齢の上昇がみられ、子宮の温存が求められる機会が多くなってきている。子宮頸癌の前がん病変 CIN (異形成～上皮内癌) の段階で治療が開始される例も多い。その主な治療方法として円錐切除術が行われている。子宮温存は可能であるが、円錐切除術後の妊娠では早産率が上昇する (1.5 倍 2 倍) という問題も生じており、円錐切除術のような侵襲を与えない治療法の確立が求められている。近年不活化センダイウイルス (HVJ-E) はその抗腫瘍効果や、抗腫瘍免疫賦活により、癌に対する新しい治療法として注目され、前立腺がんやメラノーマでは臨床試験が進められている。子宮頸癌や子宮頸部異型上皮に対しても同様の効果が期待される。

2. 研究の目的

子宮頸癌、子宮頸部異型上皮にたいする非侵襲的な新しい治療法として用いることが可能かどうかを検討し、そのメカニズムの解明と、臨床応用することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 子宮頸癌に対する HVJ-E の *in vitro* での抗腫瘍効果の検討とその分子メカニズムの解明
子宮頸癌細胞株を用いる。子宮頸癌細胞株に HVJ-E を作用させ 48 時間後に細胞を回収し、コントロール群とのアポトーシス関連タンパクの発現を比較する。これまでの報告より caspase3, caspase8, RIG-I, MAVS などの発現があがることが予想される。HVJ-E を作用させた子宮頸癌細胞株を TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法によりアポトーシスの過程で生じる断片化 DNA を検出する。

(2) 子宮頸部異型上皮の三次元培養の確立と抗腫瘍効果の検討

同意の上得られた子宮頸部異型上皮の臨床検体より三次元培養細胞塊を作成する。得られた臨床検体を細切し、collagenase や dispase などを用いて細胞を分離する。分離した細胞を collagen やその他様々な足場の上で培養する。培養には無血清培地を用いる。そこに様々な growth factor を添加し、培養に必要な条件を設定する。こうして得られた子宮頸部異型上皮の三次元培養が組織学的に異型上皮であることを確認し、どの程度の期間維持できるかについて検討する予定である。培養の条件設定を決定した後、臨床検体を増やし、CIN1-3 すべてに関して培養細胞塊を準備する。

(3) 子宮頸癌細胞株、子宮頸部異型上皮のマウス皮下移植モデルの確立とそれらを用いた HVJ-E による *in vivo* での抗腫瘍効果の検討

免疫不全マウスに子宮頸癌細胞株や子宮頸部異型上皮の初代培養細胞を皮下移植しモデルマウスを作製する。作成したモデルマウスにて HVJ-E を投与しその抗腫瘍効果を検討する。投与方法は 腫瘍に直接投与 腫瘍以外の部分に投与の 2 通りの系で試みる。

腫瘍に直接投与し、HVJ-E の抗腫瘍効果 (アポトーシスの誘導) について検討: マウスに皮下移植した腫瘍のサイズを測定し、評価する。またサイズ計測後腫瘍を摘出し、前述のアポトーシス関連タンパクの検出や、TUNEL 法によりアポトーシスが起きていることを *in vivo* で確認する。さらにコントロール群との間で、腫瘍サイズの変化を中心に、中長期的に観察しその効果の持続期間等についても検討する。

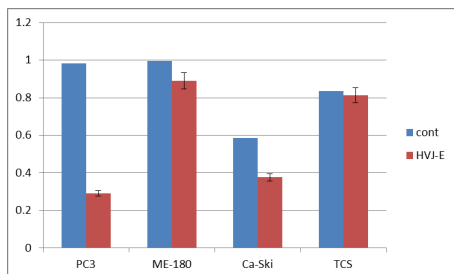
腫瘍以外の部位に投与しその効果を検討する。: 腫瘍以外の部位に HVJ-E を作用させた場合、抗腫瘍免疫活性の上昇により、抗腫瘍効果を発揮すると考えられる。腫瘍サイズの測定をコントロール群との比較を中心に評価していく。次に様々なモデルマウス (nude mouse, SCID mouse, NOD SCID mouse など) を用いることにより、抗腫瘍免疫活性を担っているメカニズムを推測することを試みる。

(4) HVJ-E によるヒトへの投与に関する臨床試験への応用

子宮頸癌、子宮頸部異型上皮に対する治療法として不活化ウイルス粒子を用いるというこれまでの治療法と違う新たな方法を用いるという特色がある。子宮頸癌に対する治療として非侵襲的である優位性があり、さらに子宮頸部異型上皮に対して治療を行うことにより、癌の発生を抑制できる可能性がある。前立腺癌、メラノーマではすでに臨床試験に至っており、HVJ-E 投与の安全性、その投与方法については確立している。またヒトにおいて子宮頸癌、子宮頸部異型上皮は発生部位が腔より体外に露出しており、直視できるため直接腫瘍に投与することが十分可能であり、その臨床応用の可能性が極めて高いことより本研究において子宮頸癌 子宮頸部異型上皮に対して治療法を確立する意義がある。

4. 研究成果

子宮頸癌細胞株 10 種類を用いて HVJ-E の抗腫瘍効果を測定した。



3種類において20%程度の抗腫瘍効果を確認した。前立腺癌細胞株での細胞増殖抑制に比較すると軽度ではあるが有意な細胞増殖抑制効果を認めた。それらの細胞株での蛋白発現を比較したが、アポトーシスに關与する蛋白の発現に明らかな変化は見られなかった。子宮頸癌でのHVJ-Eの抗腫瘍効果はアポトーシス以外の系によるものと考えられる。続いて子宮頸部異型上皮の三次元培養を行った。臨床検体を処理し、無血清培地に特定のgrowth factorを加えることにより培養細胞塊を作成した。培養細胞塊は数日で崩壊しその維持、増殖に關する因子の特定には至らず最適な培養条件を見出すことはできなかった。最適なgrowth factorの検討については試行錯誤を繰り返す、他癌での条件やその他の三次元培養(オルガノイドの作成)などの条件を文献より参考にgrowth factorの調整を行ったが維持、増殖に十分な条件は得られていない。得られる臨床検体が予想より少なく、検討を重ねることが不十分となったことも問題となった。その細胞塊の組織学的な確認やその特性等を解析するには至らなかった。子宮頸部異型上皮の皮下移植モデルマウスの作成については三次元培養の確立が不十分なためマウスを用いた検討に移ることができず進めていない。今回の検討では、子宮頸癌、子宮頸部異型上皮の三次元培養の確立ができておらずそれ以上の検討に進むことができなかったが、HVJ-Eの子宮頸癌に対する抗腫瘍効果は認められたため、新しい低侵襲な治療法としての可能性があると考えられる。今後も検討を重ねることにより低侵襲な子宮頸癌、子宮頸部異型上皮の治療法として臨床応用まで進めることが重要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉野 潔

ローマ字氏名：Yoshino Kiyoshi

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：90362730

研究分担者氏名：上田 豊

ローマ字氏名：Ueda Yutaka

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：10346215

研究分担者氏名：小林 栄仁

ローマ字氏名：Kobayashi Eiji

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：50614773

研究分担者氏名：松崎 慎哉

ローマ字氏名：Matsuzaki Shinya

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部付属病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：00467565

研究分担者氏名：高田 友美

ローマ字氏名：Takata Tomomi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：30437420

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。