

令和元年6月11日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20135

研究課題名(和文) iPS細胞による癌幹細胞モデルを活用した全く新しいdecoy療法開発の試み

研究課題名(英文) Establishment the experimental model of the cancer stem cell and to develop the novel therapeutic method, naming decoy therapy.

研究代表者

多賀谷 光 (TAGAYA, Hikaru)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：50418711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請当初は癌幹細胞モデル樹立とそれを利用した新規の治療法の開発を目指すものであったが、研究遂行が困難となったため、ヒトパピローマウイルス(HPV)の持続感染とウイルスゲノムのホストゲノムへの組み込みが癌化の重要なきっかけとなる子宮頸癌において、正常細胞には存在しないHPVを標的とした癌の管理並びに治療方法の可能性を検討することとした。子宮頸癌とその前癌病変での血中HPV DNAの検索を行い、病勢や治療効果を反映する腫瘍マーカーとして有用である可能性を見出した。今後は、検出方法のさらなる改良を行い、鋭敏で偽陽性の少ない優れた腫瘍マーカーとして確立させたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の存在を示す腫瘍マーカーは、良性の疾患においても高値を示すことは少なからずあり、必ずしも「癌特異的」ではない。一方、子宮頸癌はヒトパピローマウイルス(HPV)の持続感染から癌化が始まり、腫瘍細胞には99%以上の確率でHPVの遺伝子が存在する。本研究は、血中からHPVの遺伝子を検出することにより、この多寡が癌の病勢や治療効果を示す腫瘍マーカーとなり得るか、あるいは癌の早期発見や再発リスクの高い症例の指標になり得るかについて検討したものである。これにより、子宮頸癌とその前癌病変症例の予後改善につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：At the beginning of this project, we attempted to establish the experimental model of the cancer stem cell and to develop the novel therapeutic method using the model. However, we could not perform these studies because of methodological difficulties. Therefore, we decided to study the novel management and therapy of the HPV induced uterine cervical cancer. To do this, we investigated the existence and level of HPV DNA in the peripheral blood of the patients with advanced and early cervical cancer. We detected HPV DNA in the blood from the advanced cervical cancer patients. From these results, the HPV DNA in the blood might be useful marker judging the progression and therapeutic effect of the cervical cancer. In order to establish the clinical importance of this marker, the studies to improve the sensitivity and specificity of the detection method of the HPV DNA in the blood must be carried out in the future our study.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：癌幹細胞 ヒトパピローマウイルス ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請当初は癌幹細胞モデルを樹立し、その特性の解析と改変を積み重ね、病巣中の癌幹細胞を、人為的に操作して機能しなくなった幹細胞にすり替えてしまうような治療法を開発することを目標としたものであった。しかし、培養癌細胞株に iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) 技術を用いて作成する癌幹細胞モデルの樹立の再現に難航し、特性解析を進めることができなかった。また、進行癌症例の臨床検体からの細胞分離も安定しなかった。

そのような中で、「癌細胞特異的な治療」の代替として、ヒトパピローマウイルス (HPV) の持続感染とウイルスゲノムのホストゲノムへの組み込みが癌化の重要なきっかけとなる子宮頸癌において、正常細胞には存在しない HPV を標的とした癌の管理並びに治療方法の可能性を検討することとした。近年、子宮頸癌並びに前癌病変である子宮頸部上皮内腫瘍 (cervical intraepithelial neoplasia : CIN) は若年者において顕著に増加傾向である一方、子宮頸癌検診受診率は以前のまま目立った増加はなく、また、諸外国で接種が普及し子宮頸癌罹患率低下につながることを示された HPV ワクチン接種も、本邦では普及させ難い状況にある。今後、現時点で普及している一次予防、二次予防とも浸透しない状況の中で、HPV 感染状況を子宮頸癌検診以外の手法でモニタリングするとともに、子宮頸癌の治療効果判定を目的として、現在での腫瘍マーカーとして活用する可能性について検討することとした。

子宮頸癌は、まず子宮頸部粘膜上皮細胞に HPV 感染に伴う形態をきたし、HPV 感染が長期持続するうちに、HPV ゲノムがホストゲノムに組み込まれ、排除困難な状態となり、その後、p53 遺伝子や Rb 遺伝子の異常発現が誘導され、細胞の無限増殖能や浸潤能が生じるとされている。

一方、子宮頸癌の 70~80% は扁平上皮癌であり、血清 SCC 抗原が腫瘍マーカーとなるが、この値は、皮膚呼吸器疾患や腎機能などに影響を受け、偽陽性が多く特異性にかける。また子宮頸部病変の 20~30% を占める腺系病変においては、一定の腫瘍マーカーが存在しないため先に述べたような稀な病状のモニタリングはもとより、早期病変を検出する有用なマーカーが存在しない。

また、基本的に上皮内癌あるいは CIN3 と呼ばれる上皮内病変であれば子宮頸部の部分切除で治癒可能とされているが、非常に稀には、部分切除である子宮頸部円錐切除術の病理検体では詳細な検索にても基底膜を犯す浸潤病変は指摘できない病状あったにも関わらず、数年後に多発のリンパ節転移や遠隔転移をきたした症例が報告されており、術後管理は慎重にならざるを得ず、リスクを評価できる指標の存在が期待されている。

2. 研究の目的

- (1) 進行子宮頸癌 (遠隔転移やリンパ節転移を伴う症例) における血中 HPV DNA の検出
治療開始前あるいは治療経過での血中 HPV DNA の測定を行い、治療効果や再発の有無、血清 SCC 抗原などとの相関を見る。
- (2) CIN や原発局所に限局する早期癌症例における血中 HPV DNA の検討
一般的には 上皮内病変のうちに HPV ゲノムを保有する腫瘍細胞が末梢血中に循環していることは考えにくいですが、前述のような症例は報告されているため、測定感度を調整して HPV DNA の検索を行う。
- (3) HPV 陽性培養子宮頸癌細胞株でのゲノム編集による腫瘍細胞特性の変化の検討

3. 研究の方法

- (1) 進行子宮頸癌症例の末梢血を用いた、real time RT-PCR 法による HPV DNA の検出
研究に関して同意が得られた子宮頸癌症例から採取した血液 (全血) から DNA の抽出を行い、Takara PCR Human papillomavirus Detection Set® (HPV 16 型、18 型、33 型を検出) を用いて、あらかじめ原発病巣で検出されている HPV 型に応じて primer を選択し、real time PCR による半定量を行い、測定系の調整を行う。検出不良の検体については nested PCR 法による微量 DNA の検出を検討する。また、同一症例において、治療経過での DNA 量を追跡し、臨床経過との比較を行う。
- (2) (1)と同様の手法で早期症例、CIN 症例での検討を行う。
- (3) HPV DNA E6 および E7 領域をターゲットとしたガイド RNA をデザインし、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターコンストラクトを作成し、Hela 細胞、SiHa 細胞、CaSki 細胞などの子宮頸癌培養細胞の CRISPR/Cas9 システムによる上記遺伝子領域をノックアウトするゲノム編集を行い、得られた細胞株について、細胞増殖能などの特性解析を行う。

4. 研究成果

- (1) 子宮頸癌 B 期症例における血中 HPV DNA の検出
HPV DNA は検出された (図 1)。進行症例においては、血中に cell free の HPV DNA が検出された。Nested PCR を必要とした検体においては、非特異的反応により、検出こんなんであった。今後は、さらなる感度の調整や、プローブの再設定、あるいは検出方法の検討が必要である。
- (2) 理想的な HPV 検出法が確立できたときに利用するために様々な病状の検体を収集している。本研究を通して、real time PCR 法での検討では、早期症例でも検出可能とする手法の 1 つと

して、近年目覚ましい技術進歩を遂げている次世代シーケンサーを使用しての HPV 特異的な遺伝子の塩基配列を検出する手法が有用であると予測しており、今後は、新たな検出系の確立を目指したい。

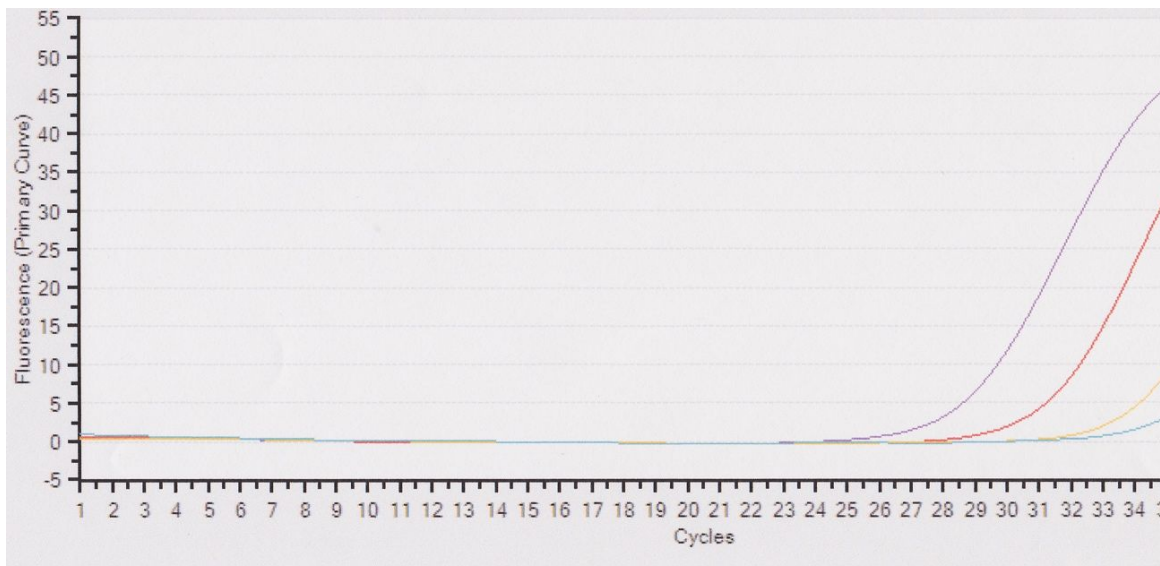


図1 子宮頸癌 B期症例での real time PCR 結果
(曲線は、左から DNA 抽出検体×1、×10 希釈、×100 希釈、ブランク)

ゲノム編集については、技術習得中の段階であるが、前述マーカーが確立できれば、編集効率を評価する上でも有用な指標になりうると推測される。

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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(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。