

令和元年6月17日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11164

研究課題名(和文) 子宮頸癌における細胞分泌エクソソームを用いた次世代ドラッグデリバリー治療の開発

研究課題名(英文) A novel approach for cervical cancer using exosome

研究代表者

林 正美 (Hayashi, Masami)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00551748

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)：子宮頸癌は早期発見により予後は改善しつつあるが、進行癌では依然として予後不良である。エクソソームは、細胞から分泌されるナノサイズの細胞外顆粒で、遺伝子発現調節因子を内包し、血清、尿、母乳などの体液中に分泌される。今回我々は、microRNA(miRNA)の一つであるmiR-22を高濃度に含むエクソソームを作成し、子宮頸癌の放射線感受性への効果を検討した。miR-22を高濃度に発現するエクソソームを子宮頸癌細胞に投与すると、子宮頸癌細胞におけるMYCBPおよびhTERTの発現が減少し、放射線感受性が上昇した。miR-22を含んだエクソソームが新たな子宮頸癌の治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

siRNA、miRNA等の核酸薬剤は、遺伝子治療において注目されているが、細胞への導入の際に、無毒化したウイルスベクターやリポフェクタミン等の導入剤が用いられることより、ウイルスベクターの生体内への安全性や、核酸薬剤が細胞内に導入される前に生体内で分解される可能性等の課題が残る。本研究では、生体内で分泌・運搬されるエクソソームをDDSに用いるため、毒性が低くかつ免疫原性のない治療になりうると考えられる。さらに、従来の薬剤と作用点が異なるため、従来の抗腫瘍薬との併用・相乗効果も期待でき、既存の治療に難治性を示す進行子宮頸癌への新たな治療戦略として大きなアドバンテージが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cervical cancer (CC) is the fourth most common cancer in women with approximately 570000 new cases annually worldwide. Over the years, screening and early effective treatment has reduced the incidence and mortality of CC. However, the prognosis of advanced cervical cancer remains poor. Exosomes are isolated from many types of cells and contain many compounds such as proteins, lipids and nucleic acids including miRNA. In the current study, we extracted miR-22-highly contained exosomes and treated CC cells to investigate the effect of radiation therapy. Treatment of miR-22-highly contained exosomes into CC cells suppressed the expression of c-myc binding protein (MYCBP) and one of the c-myc target genes human telomerase reverse transcription (hTERT). Furthermore, administration of miR-22-containing exosomes showed increased radiation sensitivity in clonogenic assay. These results indicated that exosomal miR-22 can be a novel therapeutic tool for CC.

研究分野：産婦人科学

キーワード：miRNA exosome

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

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の罹患数は年々増加しており、特にこの40年間で20代~30代の罹患率は倍増している。早期子宮頸癌の5年生存率は90%以上と良好であるが、隣接臓器への浸潤を伴う進行癌では約55%、遠隔転移を認める場合は10%未満と、進行子宮頸癌の予後は依然として不良である。

microRNA(miRNA)は、約22塩基と非常に短い1本鎖RNAで、一つのmiRNAで複数の遺伝子の発現調節を行い、細胞内の新たな遺伝子調節機構として近年注目されている(Nature 2008;455:58)。miRNAは癌との関連も示唆されており、miRNAを利用した診断や治療について世界中で研究開発中である。我々はこれまでに子宮頸癌細胞株において、癌遺伝子c-mycの作用を促進するc-myc binding protein (MYCBP)の遺伝子発現が、miRNAの一つであるmiR-22により抑制されることを見出した。さらに、miR-22を子宮頸癌細胞株に遺伝子導入するとその増殖が抑制され、逆にmiR-22をノックダウンすると子宮頸癌細胞株の遊走能が亢進することを確認した。これらの知見より、miR-22を子宮頸癌の制御に利用できる可能性があると考えた。

エクソソームは、細胞から分泌されるナノサイズの細胞外顆粒で、体液中を循環することで遠く離れた細胞まで物質を伝達する可能性が示唆され、細胞間コミュニケーションツールとしてここ数年飛躍的に注目されるようになってきている。そこで我々は、エクソソームを次世代Drug Delivery System (DDS)に応用しmiR-22を癌に輸送することができれば、進行・再発子宮頸癌の克服への大きな一歩となりえると考えた。

2. 研究の目的

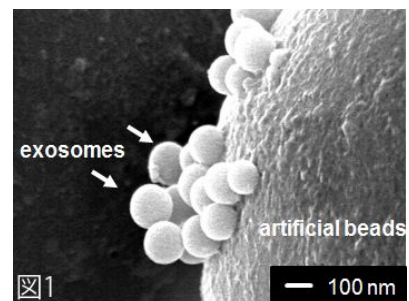
miR-22を高濃度に内包したエクソソームを作成しDDSに応用することを目的とした。遺伝子導入細胞として使用されるHEK293細胞にmiR-22を遺伝子導入し、内部にmiR-22を含有するエクソソームを回収する。そして、進行子宮頸癌治療の中核となる放射線治療への効果を検討する。

3. 研究の方法

i)HEK293細胞にmiR-22を遺伝子導入し、ii)その細胞が分泌するエクソソームを回収する。エクソソーム内部にmiR-22が高濃度に含まれていることを確認したのち、iii)このエクソソームを子宮頸癌細胞株に投与する。投与により子宮頸癌細胞株に取り込まれていることを確認したのち、iv)上記エクソソームを投与した子宮頸癌とコントロールエクソソームを投与した群とで、放射性感受性に変動があるか否か検討する。

4. 研究成果

(1)HEK293細胞に、miR-22の前駆体あるいはコントロールmiRNAをtransfectionしたのち、各々の細胞から分泌されるexosomeを超遠心法で回収した。Exosome粒子の確認として、Western blotによりエクソソームの表現マーカーの存在を確認し、ナノ粒子解析システム装置により粒子径は約110nmであることを確認し、電子顕微鏡にて粒子径が均一であることを確認した(図1)。次に、回収したexosome内のmiR-22の発現レベルをreal-time PCR法にて検証したところ、miR-22を遺伝子導入したHEK293細胞から抽出したexosome(exo-miR22)では、コントロールmiRNA導入HEK293細胞から抽出したexosome(exo-cont)群と比べて、miR-22の発現量が有意に上昇していた。

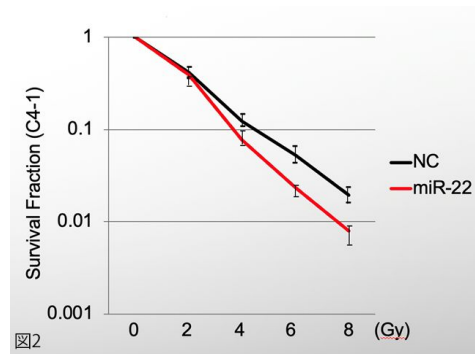


(2)上記で回収したexosomeを、子宮頸癌細胞株に投与した。投与後の子宮頸癌細胞における

miR-22 の発現量を、real-time PCR 法にて検討したところ、exo-miR22 を投与した子宮頸癌細胞株で miR-22 発現量が有意に上昇していた。

(3)exo-miR22 投与後の子宮頸癌細胞株において、MYCBP 発現量が変動するか否か、real-time PCR 法にて検討したところ、exo-cont 投与群と比べて exo-miR22 投与群では、MYCBP mRNA が有意に低下した。さらに、c-myc の機能への影響を検討するため、human telomerase reverse transcriptase component (hTERT)の発現量を調べた。Exo-miR22 投与群では、exo-cont 投与群と比べて hTERT 発現量が有意に低下していた。

(4)最後に、exo-miR22 の放射線感受性への効果を検討するため、exo-miR22 あるいは exo-cont を子宮頸癌細胞株に投与し、clonogenic assay を行ったところ、exo-miR22 を投与した子宮頸癌細胞では、exo-cont を投与した子宮頸癌細胞と比較して、放射線感受性が増強することを見出した(図2)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. Hiromi Konishi, Masami Hayashi, Shinichi Terada, Kana Kokunai, Natsuho Nakamura, Sayaka Taga, Satoe Fujiwara, Hiroshi Sasaki, Yoshito Terai, Masahide Ohmichi. New approaches using exosome for cervical cancer treatment. 第71回日本産科婦人科学会学術講演会 (2019)
2. 中村真由美、林正美、橋田宗祐、丸岡寛、小西博巳、前田和也、田中良道、佐々木浩、寺井義人、大道正英. MicroRNA-22を介した子宮頸癌の分子標的治療への応用 第69回日本産婦人科学会学術講演会 (2017)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大道 正英

ローマ字氏名：Ohmichi, Masahide

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10283764

研究分担者氏名：田中 良道

ローマ字氏名：Tanaka, Yoshimichi

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：10625502

研究分担者氏名：田辺 晃子

ローマ字氏名：Tanabe, Akiko

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：非常勤講師

研究者番号（8桁）：70454543

研究分担者氏名：佐々木 浩

ローマ字氏名：Sasaki, Hiroshi

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：80432491

研究分担者氏名：寺井 義人

ローマ字氏名：Terai, Yoshito

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：非常勤講師

研究者番号（8桁）：90278531

研究分担者氏名：藤原 聡枝

ローマ字氏名：Fujiwara, Satoe

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：90707960

(2)研究協力者

該当なし

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。