

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11300

研究課題名(和文) マイクロRNAを用いた子宮頸がんの分子診断開発と分子標的薬への治療応用

研究課題名(英文) molecular diagnosis and target therapy for cervical cancer by microRNA

研究代表者

藤井 多久磨 (FUJII, TAKUMA)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：10218969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸がんの早期発見と新たな治療開発のための研究である。頸管粘液中のmiRNAを探索したところ、4つのmiRNAが前がん病変から検出され、病期の進行に伴い、その発現のレベルが上昇していた。この方法は補助診断として有効な手法と考えられる。4つの中の1つであるmiR-126-3pはがんの増殖に関わるタンパクの発現を抑制し、細胞死を抑制することが培養細胞の実験で明らかとなった。miR-126-3pを細胞内で強制的に発現させることで癌細胞の増殖を抑制することが可能であり、新たな治療法確立の可能性が見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸がんスクリーニング法は細胞診で行われているが、欧米諸国の臨床試験の結果では感度7割と高くない。頸管粘液中のmiRNAには頸部前がん病変から過剰発現しているものがあり、それを計測することで早期補助診断が可能であることが分かった。このmiRNAは細胞内に強制的に発現すると癌細胞の増殖を抑制することがわかり、新たな子宮頸がんに対する分子標的治療開発の可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) play important roles in the regulation of gene expression during cervical carcinogenesis. Four miRNAs (miR-126-3p, -20b-5p, -451a, and -144-3p) in cervical mucus were significantly upregulated in precancer and cancer compared with normal, and their expression levels correlated with the disease severity. miRNAs in cervical mucus are promising biomarkers for cervical cancer and its precursor lesions.

Next, we investigated the effects of enforced miR-126-3p expression in the cervical cancer cell line, HeLa. In miR-126-3p-transfected cells, p85b, p110a, p-PDK1, p-AKT, p-GSK3b, CyclinD1, MRCKa, ROCK1, and p-PLCg1 were downregulated, Bad and Bax were upregulated, whereas Bcl-xL expression was downregulated, resulting in increased caspase3/7 activity and apoptosis. High levels of miR-126-3p may inhibit cervical carcinogenesis, and targeting the PI3K/PDK1/AKT pathway via miR-126-3p could represent a new approach for treating patients with cervical cancer.

研究分野：婦人科

キーワード：子宮頸がん マイクロRNA 子宮頸部異形成 検診 分子標的治療 分子診断 細胞増殖 マイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸がんは HPV 感染とそれに伴う細胞周期の変調、がん関連分子の異常発現、免疫機構の破たんなどが原因といわれている。子宮頸部発がん機構には HPV 感染が重要な役割を果たしていることが明らかとなっているが、HPV 型の違いによる発がん機構の違いなど、その詳細なメカニズムについてはいまだ不明の点が多い。申請者等は子宮頸部のがん化機構の解明をヒトパピローマウイルス (HPV) の感染を中心として解析し、その結果を診断や治療へ導く研究を続けてきた。子宮頸がん患者の血清には HPV E7 抗体が存在することを明らかにした (JJCR, 86, 28, 1996)。前がん病変の細胞診検体から E6/E7 の mRNA が検出できることを明らかにし、がん検診への応用の可能性を示した (Gynecol Oncol, 58, 210, 1996)。特に mRNA 検出方法は今、最も臨床的に有用性が高いとされている市販の HPV 検査に活用されている。申請者はウイルスだけでなく宿主のタンパクにも着目し、P16 タンパクの発現解析が診断に役立つバイオマーカーであることを報告してきた (Int J Gynecol Pathol, 22, 2003, Int J Gynecol Cancer, 16, 2006, Virchows Arch, 453, 535, 2008, Int J Clin Oncol, 20, 2015)。一方、治療戦略においては HPV の初期遺伝子の転写機構の一端を明らかにし (J Biol Chem 276, 867, 2001) 転写抑制に働く分子を同定した (Clin Cancer Res 9, 5423, 2003) siRNA を用いた silencing 効果により HPV 遺伝子発現を抑制することで腫瘍増殖抑制効果を示すなど、(Int J Oncol, 16, 541, 2006) 首尾一貫して子宮頸部のがん化メカニズムを研究し、臨床応用の可能性について探求している。

マイクロ RNA (miRNA) はヒトにおいておよそ 2800 種類同定されており、子宮頸部発がんにおいても様々な分子の発現制御にかかわっていることが明らかとなってきている (Int J Mol Sci, 15, 15700, 2014)。miRNA は子宮頸部発がん機構において、mTOR/Akt, STAT3 などの分子標的治療の候補となる遺伝子発現調節やオートファジーにも関わるということが明らかとなってきている (Tumor Biol, 2016)。いままで、生体内分子間の発現調節機構について明らかでなかった部分が miRNA の関与で説明できることもわかってきた。本研究課題では、子宮頸部発がん機構に miRNA がどのように関わっているかを分子生物学的に調べ、その結果を臨床応用へと導く礎を確立する。申請者は平成 26-28 年の科研費基盤 (C) において子宮頸部腫瘍患者の体液に特異的に発現する miRNA の解析を目的として、子宮頸部腫瘍患者および対照として細胞診異常のない患者から子宮頸管粘液と擦過細胞検体および血清を採取して予備的な解析を行ってきた。その結果、組織診断により患者を 5 群 (normal, CIN1, CIN3, SCC, Adenocarcinoma; AD) にわけてマイクロアレイ解析したところ、検体として頸管粘液を用いた解析では高位病変になるに伴い、その発現が上昇しているものが 75 種類選出された。その中には未知の miRNA が同定されていた (未発表データ)。そこで、これらの miRNA が子宮頸がんの診断マーカーとして有用か否かについて多数の臨床検体を用い、統計解析を用いて調べるとともに、分子標的診断・治療として有効な分子を制御しているか否かを分析した。

## 2. 研究の目的

子宮頸がんはヒトパピローマウイルス (HPV) 感染とそれに伴う細胞周期の変調、がん関連分子の異常発現、免疫機構の破たんなどが原因といわれている。しかしながら、その詳細なメカニズムについては不明な点もいまだ多い。申請者は従来より、子宮頸部発がんの分子機構を解明し、その結果を臨床応用へと結び付けてきた。マイクロ RNA (miRNA) は発がんに関わる分子の発現制御をおこなっている。そこで、本研究課題では臨床検体を用い子宮頸部発がんのこれらの分子機構の異常について miRNA を中心として解析した。子宮頸がんにて特異的な発現挙動を示す miRNA が

臨床診断に有用か否かを検証するとともに、これらの miRNA が制御している分子機構を解明することで、新たな診断・創薬へとつなげる研究である。

### 3 . 研究の方法

子宮頸がん患者の頸管粘液中において、特異的に発現レベルが高い miRNA を網羅的に抽出した。その中で発現強度が特に高い 4 種類の miRNA を選び、正常群との比較によりカットオフ値を決定し、検査としての精度を解析した。さらに個々の患者においては組織診断、細胞診判定、HPV 型判定の結果との相関を調べた。

in silico 解析により標的遺伝子候補の絞り込みを行い、培養細胞を用いて生物活性の挙動をルシフェラーゼ転写活性、タンパク発現レベルをウエスタンブロット法で解析し、migration/invasion assay でその機能を調べた。更にはアポトーシス関連タンパクの発現レベルの挙動を調べた。

### 4 . 研究成果

( 1 ) 子宮頸がんおよび前がん病変の患者の頸管粘液中において特異的に強い発現をしている miRNA をみつけるために、マイクロアレイを用い健常人の検体との比較を行いながら網羅的に検索した。その結果、76 種類の miRNA が選択された。そこで、realtime RT-PCR 法を用い、その発現の多寡の正当性を確認したところ、22 種類の miRNA の発現が高いことがわかった。この中で、特に健常人との発現レベルの差が大きい 4 種類の miRNA ( miR-126-3p,-20b-5p,-451a,-144-3p ) を選び、合計 230 人の臨床検体を用いてその発現レベルが病変の推移に伴って増強するか否かを検討した。

正常、前がん病変(CIN)、がんにおいて発現強度は病変の進行に伴い増加することがわかった。統計解析を行ったところ、正常と CIN1 では有意差が認められないが、CIN2 以上の病変では有意差をもって、異常値を示した。細胞診の判定においても、NILM,LSIL では差は認められないが、HSIL 以上の病変を有する場合に有意差が認められた。HPV の感染の有無について解析したところ、HPV 未感染に比べ、ハイリスク型 HPV の感染において有意差をもって発現強度の違いが認められた。

次に検査としての性能を調べるため、異常値のカットオフ値を決定し、病変の検出感度、特異度を調べたところ、浸潤がんの病変を検出する感度は miR-126-3p,-20b-5p,-451a,-144-3p においてそれぞれ 0.81, 0.74, 0.83, 0.87 であり、特異度はそれぞれ 0.91,0.93,0.91, 0.89 であった。陽性尤度比はそれぞれ、9.0, 10.57, 9.22,7.91 陰性尤度比はそれぞれ 0.21,0.28,0.19,0.15 であり、補助診断法としては有用である可能性が示唆された。

( 2 ) 4 つの miRNA の中で患者間での発現量の多寡に大きな差を認めない miR-126-3p を選び、さらにその発現の局在を in situ hybridization 法にて解析したところ、腫瘍細胞内のリンパ管内皮だけでなく扁平上皮・腺がん細胞の両方で発現していることが明らかとなった。そこで、miR-126-3p が子宮頸部発がんに及ぼす効果について子宮頸癌由来培養細胞を用いて評価することにした。培養細胞に miR-126-3p を遺伝子導入し、増殖能、細胞移動能、浸潤能、アポトーシスとこれらに関連するタンパクの発現の多寡を解析した。遺伝子導入により増殖能、細胞移動能、浸潤能は抑制され、PI3K,PDK1、リン酸化 AKT の発現低下が観察

された。そこで、PI3K/PDK1/AKT シグナル伝達経路にある関連タンパクの発現を解析したところ、GSK3b、Cyclin D1,p70S6K,S6,PAK1,ROCK1 MRCKa,PLCg1 の発現低下が示された。一方、BAD, BAX の発現は上昇するも BCL-xL は発現低下し、Caspase3/7 の発現が上昇していたことから、アポトーシスは促進していた。miR-126-3p 遺伝子導入により細胞増殖の抑制がみられ、アポトーシスが観察されたことから、PI3K/PDK1/AKT シグナル伝達経路を標的とした新たな子宮頸癌治療開発の可能性が示唆された。

本課題は臨床検体を材料として分子生物学的な解析を行い、臨床上有用な補助診断法の開発の基礎となるデータを示した。さらに、その結果をもとに、培養細胞を用いて更なる生物機能解析を行なったところ、細胞内シグナル伝達経路が子宮頸がんに対する新たな分子標的治療のターゲットとして有用な可能性を示した点に意義があると申請者は考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujii Takuma, Kawai Satoshi, Kukimoto Iwao, Yamada Hiroya, Yamamoto Naoki, Kuroda Makoto, Otani Sayaka, Ichikawa Ryoko, Nishio Eiji, Torii Yutaka, Iwata Aya	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25310-1	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 Kawai Satoshi, Torii Yutaka, Kukimoto Iwao, Fujii Takuma	4. 巻 62
2. 論文標題 A case of primary signet-ring cell carcinoma of the cervix containing full genome of human papillomavirus 16	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Indian Journal of Pathology and Microbiology	6. 最初と最後の頁 146~146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.4103/ijpm.ijpm_507_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 藤井多久磨	4. 巻 70
2. 論文標題 臨床に必要なヒトパピローマウイルス型とゲノムの基礎知識	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本気管食道科学会会報, 70(2):75-76	6. 最初と最後の頁 75~76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishio E, Kawai S, Akita E, Fujii T	4. 巻 4
2. 論文標題 Successful fertility-sparing surgery and chemotherapy for stage c3 ovarian cancer with the postoperative use of the traditional Japanese herbal formulation hachimijiogan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Traditonal & Kampo medicine	6. 最初と最後の頁 124-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohwaki Akiko, Nishizawa Haruki, Aida Noriko, Kato Takema, Kambayashi Asuka, Miyazaki Jun, Ito Mayuko, Urano Makoto, Kiriyama Yuka, Kuroda Makoto, Nakayama Masahiro, Sonta Shin-Ichi, Suzumori Kaoru, Sekiya Takao, Kurahashi Hiroki, Fujii Takuma	4. 巻 38
2. 論文標題 Twin pregnancy with chromosomal abnormalities mimicking a gestational trophoblastic disorder and coexistent fetus on ultrasound	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology	6. 最初と最後の頁 1~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01443615.2017.1401598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terasawa Sumire, Kato Asuka, Nishizawa Haruki, Kato Takema, Yoshizawa Hikari, Noda Yoshiteru, Miyazaki Jun, Ito Mayuko, Sekiya Takao, Fujii Takuma, Kurahashi Hiroki	4. 巻 1
2. 論文標題 Multiplex PCR in noninvasive prenatal diagnosis for FGFR3-related disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12278	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 藤井多久磨	4. 巻 53
2. 論文標題 コルボスコピー検査(解説)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 東海産科婦人科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 43-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 河合智之、鳥居 裕、大谷清香、市川亮子、植田高弘、藤井多久磨	4. 巻 35
2. 論文標題 当院における腹腔鏡下子宮体癌手術の術前診断の精度	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本婦人科腫瘍学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 寺澤すみれ、鳥居 裕、宮崎 純、大脇晶子、小川千紗、坂部慶子、野田佳照、大谷清香、伊藤真友子、市川亮子、宮村浩徳、西澤春紀、西尾永司、藤井多久磨	4. 巻 53
2. 論文標題 当院での子宮頸部円錐切除術後出血に関する検討	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 東海産科婦人科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 293-297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 野田佳照、廣田 穰、秋田絵理、大脇晶子、宮崎 純、河合智之、坂部慶子、伊藤真友子、大谷清香、藤井多久磨、小川千紗、酒向隆博	4. 巻 5
2. 論文標題 高度ダグラス窩癒着症例に対する子宮全摘術 - Three-step total laparoscopic hysterectomy - の手術成績	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 東海産婦人科内視鏡手術研究会雑誌	6. 最初と最後の頁 53-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Otani S, Fujii T, Kukimoto I, Iwata A, Ichikawa R, Tsukamoto T.
2. 発表標題 Cytokine profile of the cervical mucus in patients with cervical cancer and its precursor lesions
3. 学会等名 The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawai S, Otani S, Ichikawa R, Torii Y, Nishio E, Fujii T
2. 発表標題 MicroRNAs in the cervical mucus are promising biomarkers for cervical cancer and cervical neoplasia
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井多久磨
2. 発表標題 臨床に必要なヒトパピローマウイルス型とゲノムの基礎知識
3. 学会等名 第70回日本気管食道科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井多久磨
2. 発表標題 mir-126-3pは子宮頸部の発がん過程においてPI3K/AKT経路を制御している
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷清香、市川亮子、鳥居 裕、西尾永司、藤井多久磨
2. 発表標題 頸管粘液中のmicro RNAは子宮頸がんおよびその前癌病変診断のバイオマーカーとして有用である
3. 学会等名 第7回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷清香、市川亮子、塚本徹哉、平澤 浩、藤井多久磨
2. 発表標題 高齢者においてHSILと判定された患者の組織診断の特徴
3. 学会等名 第38回日本臨床細胞学会東海連合会総会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Kawai S, Imanishi N, Fujii T
2. 発表標題 Surgical anatomy of gynecologic malignancies by cadaveric study
3. 学会等名 The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井多久磨
2. 発表標題 専攻医教育プログラム 1-2 コルポスコピー検査
3. 学会等名 第137回東海産科婦人科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井多久磨
2. 発表標題 HPVワクチンを取り巻く環境 HPVワクチンの世界での現状と課題
3. 学会等名 第59回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井多久磨、柊元巖
2. 発表標題 マイクロRNAによる子宮頸癌スクリーニング法の開発
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井多久磨
2. 発表標題 婦人科悪性腫瘍手術においては手術解剖に熟知することが重要である
3. 学会等名 第30回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井多久磨
2. 発表標題 ロボット支援下手術の普及に必要なこと
3. 学会等名 第6回日本婦人科ロボット手術研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 子宮頸がん検査用検体	発明者 藤井多久磨	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-118960	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 子宮頸がん検査用検体	発明者 藤井多久磨	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-127622	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----