

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09791

研究課題名(和文)複合的癌免疫治療による子宮頸癌治療の革新的開発

研究課題名(英文)Research on treatment of cervical cancer by combined cancer immunotherapy

研究代表者

林 正美 (Hayashi, Masami)

大阪医科薬科大学・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、miR-22がMYCBPの3'UTRに結合し、子宮頸癌細胞株のMYCBP発現を抑制することで、c-mycの標的遺伝子であるhTERT遺伝子の発現が低下し、放射線感受性が向上することを見出した。そこで、miR-22を含むエクソソームを調製し、子宮頸癌細胞株に投与して放射線治療の効果を検討したところ、hTERTの発現が低下し、放射線感受性が向上することが確認できた。次に、癌細胞の免疫逃避に關与するPD-L1に着目し、miRNAによりPD-L1の発現を抑制し、前述のmiR-22内包エクソソームと併用して子宮頸癌に対する放射線治療の効果をさらに高めることができないか検討しているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年miRNAと疾患との関わりが注目されており、治療やバイオマーカーとしての応用が始まっているが、PD-L1遺伝子を制御するmiRNAに関しては近年解析が始まったところで子宮頸癌での報告は少ない。本研究では、miRNAを介した放射線の感受性増強のみならず、癌微小環境によりブレーキがかかった逃避相の状態における免疫の攻撃力の復活をも目的としており、作用点が異なるため相乗効果が期待できる。また、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えると考えられ、新たな治療戦略となりうることを期待される。

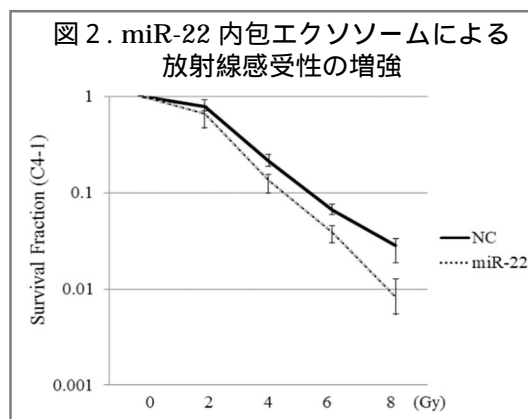
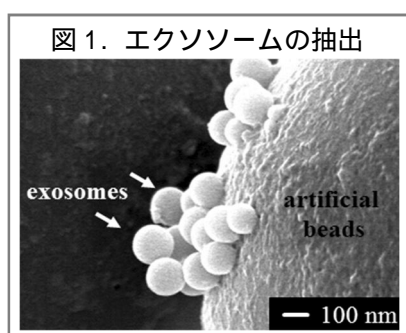
研究成果の概要(英文)：We found that miR-22 binds to the 3'UTR of MYCBP and suppresses MYCBP expression in cervical cancer cell lines, resulting in decreased expression of the hTERT gene, a c-myc target gene, and increased radiosensitivity. Next, we prepared exosomes containing miR-22 and administered them to cervical cancer cell lines to examine their radiotherapeutic effects. As a result, we confirmed that administration of exosomes containing miR-22 decreased the expression of hTERT and enhanced radiosensitivity. Next, we focused on PD-L1, which is involved in immune escape of cancer cells, and decided to investigate whether the effect of radiotherapy for cervical cancer could be further enhanced by inhibiting PD-L1 expression and immune checkpoints with miRNA in combination with the above miR-22-containing exosome. This is currently under investigation.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸癌 放射線治療

## 1. 研究開始当初の背景

エクソソームは、細胞から分泌される膜小胞体で、血液、尿、唾液、母乳などの体液中に存在し、タンパク質や、mRNA、microRNA (miRNA)などの遺伝子発現調節因子を内包しており、エクソソームを取り込んだ細胞内でタンパク質や核酸分子が機能することから、核酸医薬の新規ドラッグデリバリーシステム(DDS)のキャリアーとして近年飛躍的に注目されるようになっている。我々は子宮頸癌細胞株において、miR-22の遺伝子導入により、c-myc 結合蛋白(MYCBP)の発現が抑制され、c-mycの標的遺伝子であるhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT)遺伝子の発現が低下し、放射線感受性が増強することを *in vitro* および *in vivo* にて見出した。そこで、miR-22の子宮頸癌治療への応用を目標に、miR-22を高濃度に内包したエクソソームを製し、子宮頸癌細胞株に添加したところ、miR-22の遺伝子導入時と同様、放射線感受性が増強することを確認した(図1,2)。



癌微小環境において、癌抗原特異的な細胞障害性T細胞(CTL)が活性化され、癌細胞の増殖を阻害することが知られているが、免疫系の活性化による癌細胞の排除の一方で、免疫系による排除から逃れる免疫回避能力を有した細胞が選択的に増加する、癌の免疫編集機構の存在が最近注目されている。免疫編集により免疫細胞の攻撃を免れた癌細胞が癌として顕在化することに着目した、免疫チェックポイント阻害薬(抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体)が近年開発され進行・再発非小細胞肺癌や悪性黒色腫に対し臨床応用されている。免疫チェックポイント阻害薬の子宮頸癌への有用性は15-20%の患者に限られるとされ、効果の向上にはさらなる工夫が必要とされる。

PD-L1遺伝子はc-mycの標的遺伝子であることが近年報告された。我々はmiR-22によりc-mycの標的遺伝子hTERTが低下することをこれまでに確認しており、PD-L1遺伝子もmiR-22により発現が低下するのではないかと考え、子宮頸癌の放射線治療において、miR-22が、hTERTの発現抑制を介した放射線感受性の増強と、PD-L1の発現抑制を介した免疫チェックポイントの阻害という2つの経路に作用することで、放射線治療への相乗効果が期待できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

これまでの癌治療の主体は手術療法や放射線療法、化学療法であったが、癌細胞は免疫監視システムによる排除をくぐり抜ける免疫編集機構を持つことで、癌として増殖し続けることが分かってきた。これにより、近年、癌免疫チェックポイント阻害剤が開発され注目されている。そこで、miR-22のPD-L1発現調節を介した免疫チェックポイント阻害作用の可能性に着目し、miR-22によるhTERT抑制を介した放射線感受性増加による癌治療効果と、PD-L1抑制を介した癌免疫治療としての癌治療効果の相乗効果を目指した新規子宮頸癌治療の開発を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

癌免疫編集機構により免疫逃避の状態にある癌微小環境において、miR-22が、PD-L1の発現低下ひいては免疫チェックポイント阻害効果を発揮するか、放射線の感受性増強との相乗効果が認められるか、数種類の子宮頸癌細胞株を用いて検討する。

#### 4 . 研究成果

我々が保有する子宮頸癌細胞株の中で miR-22 の発現量が少なかった細胞株(C4-1, SKG-11)に、miR-22 を遺伝子導入し、PD-L1 発現量の変動を qRT-PCR 法にて検討した。miR-22 の遺伝子導入により PD-L1 発現量が低下すると予想していたが、発現量の明らかな低下は見られなかった。

そこで、我々がこれまでに卵巣癌において進行期および予後との相関があることを確認している miR-34a について検討することとした。卵巣癌においては、進行癌では早期癌と比較して有意に miR-34a が低下しており、予後のバイオマーカーとなりうることを報告している。それ以外にも、miR-34a は癌細胞の増殖、上皮間葉形質転換、浸潤、転移などに関与しており、おもにそれらを抑制する腫瘍抑制因子として機能することが様々な癌種で知られている。

miR-34a を子宮頸癌細胞株に遺伝子導入したところ、PD-L1 発現量は有意に抑制された。そこで miR-34a が PD-L1 の 3' UTR 領域に結合し直接阻害するのか否か確認するため、ルシフェラーゼリポーターアッセイを行い、miR-34a が PD-L1 の 3' UTR を標的とし転写抑制をもたらすことを確認した。

放射線治療により腫瘍内の PD-L1 発現量が増加することが他癌腫で報告されている。そこで、miR-22 含有エクソソームを利用した子宮頸癌の放射線治療に、miR-34a を介した PD-L1 発現抑制を併用すれば、放射線照射後に残存している腫瘍に対しても抗腫瘍効果が得られるのではないかと考えている。現在、これら 2 種の miRNA の投与時期や投与方法について、最適な効果が得られる条件を検証しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiromi Konishi, Masami Hayashi, Shinichi Terada, Kana Kokunai, Natsuho Nakamura, Sayaka Taga, Satoe Fujiwara, Hiroshi Sasaki, Yoshito Terai, Masahide Ohmichi
2. 発表標題 New approaches using exosome for cervical cancer treatment.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小西博巳、林 正美、佐々木浩、田中智人、田中良道、大道正英
2. 発表標題 miR-22含有エクソソームの子宮頸癌放射線治療への応用
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	大道 正英  (Ohmichi Masahide)  (10283764)	大阪医科薬科大学・医学部・教授   (34401)	
研究分担者	田中 良道  (Tanaka Yoshimichi)  (10625502)	大阪医科薬科大学・医学部・講師   (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐々木 浩  (Sasaki Hiroshi)  (80432491)	大阪医科薬科大学・医学部・講師    (34401)	
研究分担者	古形 祐平  (Kogata Yuhei)  (80829953)	大阪医科薬科大学・医学部・助教    (34401)	
研究分担者	寺井 義人  (Terai Yoshito)  (90278531)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師    (34401)	
研究分担者	田中 智人  (Tanaka Tomohito)  (90411363)	大阪医科薬科大学・医学部・講師    (34401)	
研究分担者	藤原 聡枝  (Fujiwara Satoe)  (90707960)	大阪医科薬科大学・医学部・講師    (34401)	

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