

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18647

研究課題名(和文) 子宮頸部上皮内病変の細胞極性蛋白発現異常症例に対するBCG療法の有用性検討

研究課題名(英文) Validation of treatment efficiency by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) for cervical intraepithelial neoplasia with aberrant expression of atypical protein kinase C as cell polarity regulator.

研究代表者

水島 大一 (MIZUSHIMA, Taichi)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：80835059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌およびがん前駆病変である子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)に対する新たな薬物治療の可能性について検討をした。膀胱上皮内癌の治療や再発抑制効果のあるBacillus Calmette-Guérin (BCG)に子宮頸癌細胞株の腫瘍増殖抑制効果を認めた。細胞極性制御因子であるatypical Protein Kinase C(aPKC)の機能異常が子宮頸癌の浸潤能と関連し介在する遺伝子を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CINの標準治療は外科治療であるがBCGによる腫瘍増殖抑制効果が示唆され、今後保存的治療の可能性が期待される。また、子宮頸癌の発がんに対する分子標的治療薬は限られており進行子宮頸がんの予後は依然として不良である。これまでに、細胞極性制御因子であるaPKCの発現異常が病変の進行と関連している可能性が示されていた。本研究によりその機序が浸潤能力の増強であり、介在する複数の遺伝子も明らかとなり、aPKCが分子標的治療の標的分子として有力な候補となった。

研究成果の概要(英文)：We studied to create new chemotherapy and molecular targeted therapy for cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. Bacillus Calmette-Guérin (BCG), which is clinically used for bladder cancer treatment, suppressed cell proliferation of cervical cancer cell line. We proved that atypical Protein Kinase C(aPKC), cell polarity regulator, related to cancer cell invasion ability modulated by several genes.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸癌 子宮頸部上皮内腫瘍

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は HPV ワクチンで予防が可能になったが、既感染後の HPV を排除する特異的な治療方法はないため、今後も CIN や浸潤子宮頸癌の排除には数十年の時間を要する。子宮頸がんの前駆病変である子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN) は自然治癒が見込まれるが、一部の症例は病変が持続し長期の通院・検査を要する。手術以外の標準的治療はなく、長期化するほど「治るか分からない心理的な負担」や「通院の負担」も大きくなる。CIN は妊孕能を温存した子宮頸部円錐切除術の適応となるが、この疾患は若年女性の罹患が多く術後に妊娠した際の早産リスクが問題視されている。そこで、低侵襲で合併症の少ない保存的な治療の開発が望まれている。また、浸潤がんに対する分子標的治療薬の選択肢が限られており、CIN と浸潤がん両方に対する分子標的療法が開発が期待されている。

ウシ結核菌弱毒株である BCG の膀胱内注入療法は、膀胱上皮内癌治療の第一選択で保険適用されている。BCG が腫瘍細胞を直接もしくは免疫を介して間接的に抑制する。子宮頸癌において BCG の腫瘍抑制効果を評価し治療応用の可能性を検討する。

CIN は細胞の極性が喪失していることが病理学的な特徴の一つである。細胞極性制御蛋白 atypical Protein Kinase C / (aPKC) 正常な上皮では細胞の極性を制御すると共に、がん遺伝子であると示唆されている。私たちはこれまでに がん前駆病変である CIN で aPKC が核に異常局在する、異常局在が CIN の病変進行を予測する、aPKC の異常局在と既存のマーカーである HPV 型は独立な因子である点を見いだした。子宮頸癌における aPKC の発現異常とがんの進行に関する機序は十分に解明されておらず治療標的とするための評価が必要とされている。

2. 研究の目的

CIN および aPKC の新しい薬物療法の開発のための基礎となる解析として、本研究では「aPKC 経路の分子を標的とした治療」もしくは「BCG による治療」を実現化するための基礎データを収集することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BCG による子宮頸癌細胞の増殖抑制効果の検討

・子宮頸癌細胞株 HeLa に BCG を異なる濃度で暴露し細胞増殖能力を比較検討する。

(2) aPKC の発現量とがんの進展に関する解析

・子宮頸癌細胞株の aPKC 遺伝子ノックダウン細胞を樹立して、細胞増殖を MTT アッセイ・細胞浸潤遊走能をボイデンチャンバーで評価する。また、NOD-SCID マウスの皮下腫瘍形成モデルで腫瘍の増殖能力を評価する。

(3) aPKC の局在異常とがんの進展に関する解析

・子宮頸癌細胞株の内在性 aPKC をノックダウンして核に局在する変異体(aPKCA120E)を発現する細胞を樹立する。細胞増殖を MTT アッセイ・細胞浸潤遊走能をボイデン

チャンバーで評価する。

(4) 遺伝子

- ・ aPKC の局在異常と関連する遺伝子を見いだすために、対照の細胞と aPKC 遺伝子をノックダウンした細胞と変異型 aPKC 遺伝子を発現した細胞での遺伝子発現をマイクロアレイで比較し、2) 3) で評価した表現型に關与する遺伝子をスクリーニングする。
- ・ スクリーニングした遺伝子をノックダウンすることで、腫瘍の増殖能力や浸潤の力に影響を及ぼすか検証する。

4. 研究成果

(1) BCG による子宮頸癌細胞の増殖抑制効果の検討

- ・ 子宮頸部不死化ケラチノサイト(図1)および子宮頸癌細胞株(図2)に BCG を異なる濃度で暴露し細胞増殖抑制効果を評価した。いずれの細胞においても細胞増殖抑制効果が濃度依存的に認められた。

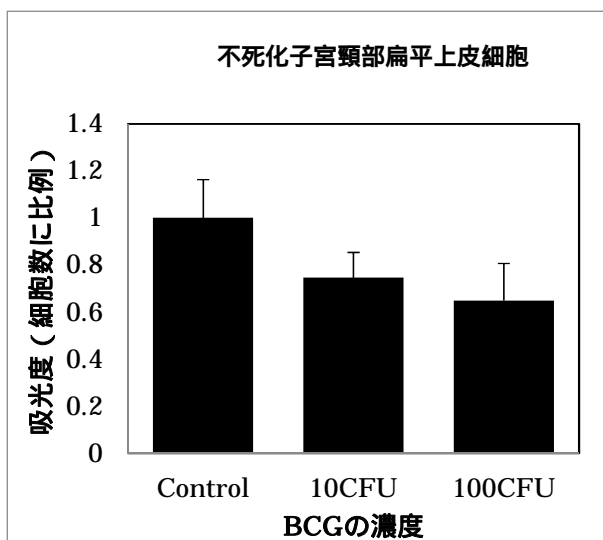


図1. 細胞増殖能 MTT アッセイ: 子宮頸部扁平上皮不死化細胞に BCG(10CFU/cell, 100CFU/cell)を暴露して細胞増殖抑制効果を評価した

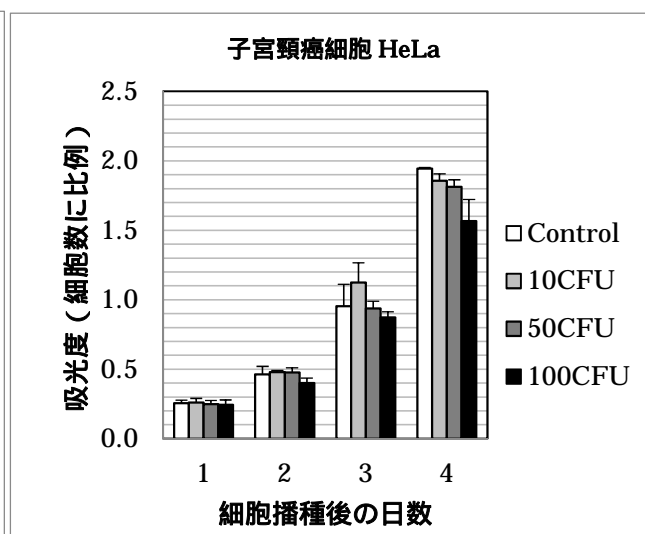


図2. 細胞増殖能 MTT アッセイ: HeLa に BCG(10CFU/cell, 100CFU/cell)を暴露して、1/2/3/4日後の細胞増殖抑制効果を評価した。

(2) aPKC の発現量のがんの進展に関する解析

- ・ 子宮頸癌細胞株の HeLa および CasKi のおよび SiHa の内在性 aPKC の遺伝子発現をレンチウイルスによるノックダウン細胞を樹立して、ウエスタンブロットによる蛋白発現が対照の 10%程度に低下していることを確認した。播種細胞の細胞数を播種から 1 日後、2 日後、3 日後、4 日後で評価をしたが細胞数に差を認めなかった。
- ・ HeLa 細胞の細胞遊走能と浸潤能をポイデンチャンバーを用いたアッセイで比較を

行ったが、aPKC 遺伝子発現抑制の効果を認めなかった。

- ・ NOD-SCID マウスに HeLa 細胞及び aPKC ノックダウン細胞を皮下に移植して 60 日間腫瘍の大きさを観察したが、有意な差を認めなかった（図 3）。
- ・ 以上より aPKC の発現量が大きく関与しない可能性が考えられた。

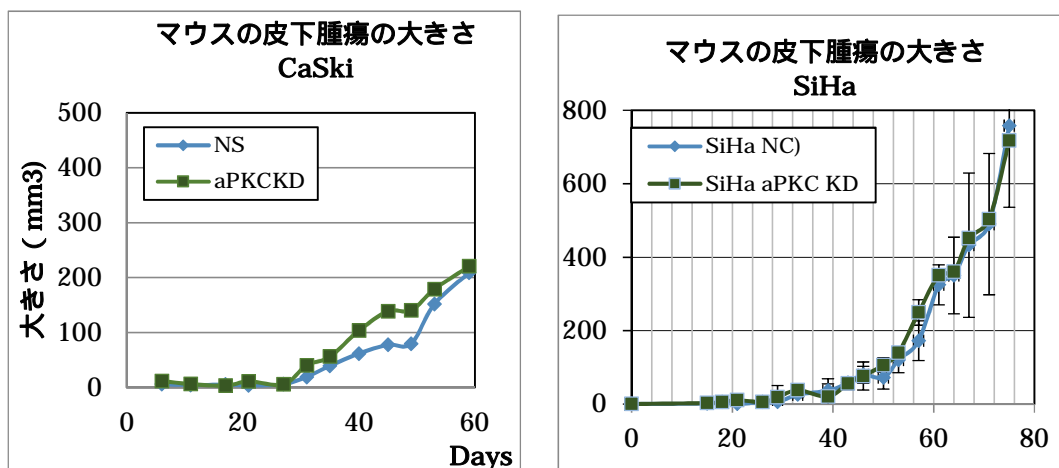


図 3 マウス皮下腫瘍形成能：HeLa および SiHa 細胞それぞれの対照細胞と内在性 aPKC ノックダウン細胞を NOD-SCID マウスの皮下に移植し皮下腫瘍の体積を比較した

(3) aPKC の局在異常とがんの進展に関する解析

- ・ 子宮頸癌細胞株 HeLa の内在性 aPKC をノックダウン（前述 2）で作成した細胞に、核に局在する aPKC の変異体(aPKCA120E)を発現させて、その核内への発現を狭焦点顕微鏡による蛍光染色で確認した（図 4）。
- ・ 対照細胞と aPKCA120E 発現細胞の細胞増殖能を MTT アッセイで評価をしたが、細胞増殖能の増加は認めなかった（図 5）一方で、ボイデンチャンバー法では細胞浸潤遊走能の増加を認めた。aPKC の偽基質により浸潤能力は低下した。
- ・ 以上の結果は異常な局在が浸潤能力と関連している可能性を示している。

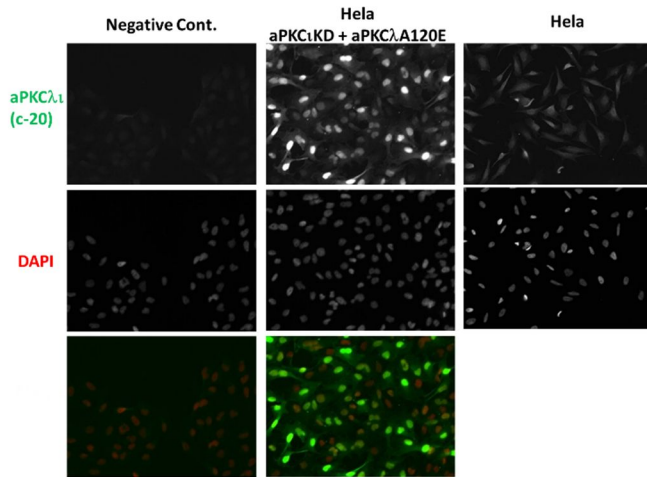


図 4 . aPKC の蛍光染色 : HeLa 対照・HeLa 内在性ノックダウン細胞 (Negative Cont.)・HeLa aPKCA120E 発現細胞

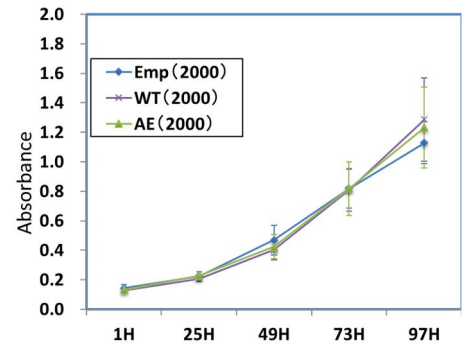


図 5. 細胞増殖能 MTT アッセイ : HeLa 対照・HeLa 内在性ノックダウン細胞・HeLa aPKCA120E 発現細胞

(4) aPKC の局在異常の浸潤能力に関連する遺伝子のスクリーニング

- aPKC の局在異常と関連する遺伝子を見いだすために、マイクロアレイで 54,675 個のプロープの中で、絶対的なシグナル強度が上位 10,000 個に限定し、さらに変異型 aPKC 遺伝子を発現した細胞での遺伝子発現が 4 倍以上に増加する遺伝子と 25% 以下に減少する遺伝子を比較スクリーニングした (図 6) . さらに、遺伝子発現の増加/減少を Q-PCR で検証した .
- 遺伝子発現が増加した候補遺伝子は発現ベクターを作成し、減少した候補遺伝子に対して siRNA を作成して、浸潤能力が変化するか検証した . その中で、aPKC が RAB20, SORBS2, COL18A1, GAGE1, TSPAN18 等の発現調を介して細胞浸潤能を増強する点を明らかにした .

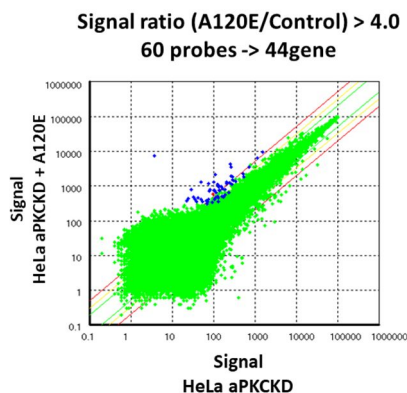


図 6. マイクロアレイ : HeLa 内在性ノックダウン細胞を対照として、HeLa aPKCA120E 発現細胞の遺伝子発現を比較した . マイクロアレイで 54,675 個のプロープ (緑の点で表示) の中で、絶対的なシグナル強度が上位 10,000 個に限定し、遺伝子発現が 4 倍以上に増加する遺伝子を青い点で示す .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizushima T, Miyamoto H.	4. 巻 8
2. 論文標題 The Role of Androgen Receptor Signaling in Ovarian Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 E176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8020176	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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