

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20845

研究課題名（和文）子宮頸癌に対する転写因子HOXD9を標的とした新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapy targeting the transcription factor HOXD9 for cervical cancer

研究代表者

菅原 正貴（SUGAWARA, MASAKI）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：80906686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：転写因子HOXD9は、正常子宮頸部組織と比較し子宮頸癌組織において高発現しており、子宮頸癌の悪性化に深く関与している。今回我々は、HOXD9の発現を抑制するsiRNAおよび低分子化合物の探索を行い、子宮頸癌細胞株を用いて発現抑制および細胞増殖抑制効果を検証した。一部のsiRNA配列においてはHOXD9 mRNAの発現減少ならびに細胞増殖抑制効果が確認され、化合物XにおいてはHOXD9 mRNAは上昇したものの、HPV-E6/E7の発現減少と細胞増殖の抑制が確認された。今後、さらに詳細な解析を行うことで作用機序の解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた知見は、転写因子HOXD9が子宮頸癌の治療標的となり得る可能性を示唆するものと考えられる。HPVは扁平上皮癌や通常型腺癌だけでなく小細胞癌や神経内分泌癌などの難治性子宮頸癌にも普遍的に検出されるほか、肛門癌の90%、中咽頭癌の50%、陰茎癌の60%においてもHPV感染が発癌の原因とされており、これらのHPV関連腫瘍の治療にも応用可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The transcription factor HOXD9 is highly expressed in cervical cancer tissues compared to normal cervical tissues and is deeply involved in the malignant transformation of cervical cancer. In this study, we examined siRNAs and small-molecule compounds that inhibit HOXD9 expression and cell proliferation in cervical cancer cell lines. We found that some siRNA sequences reduced HOXD9 mRNA expression and inhibited cell proliferation. Compound X decreased the expression of HPV-E6/E7 and inhibited cell proliferation, but increased the expression of HOXD9 mRNA. In the future, we aim to elucidate the mechanism of action by further detailed analysis.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：子宮頸癌 HPV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は、主にヒトパピローマウイルス (HPV) が子宮頸部に感染することが原因で生じる悪性腫瘍であり、固形癌としては種と比較して治療薬の選択肢が極めて少ないのが現状である。再発子最も若年発症で、特に AYA 世代 (15-39 歳) で増加傾向が著しい。再発子宮頸癌は極めて難治性で、根治的な手術療法や放射線療法の適応となることは少なく、病変の進行を遅らせる治療として化学療法が選択される。しかし、子宮頸癌で有効とされる抗がん剤はプラチナ製剤、タキサン製剤などに限られ、他の癌宮頸癌における標準治療である TP (Taxol + Cisplatin) 療法に耐性を獲得した症例では他の有効な治療の選択がなく、新たな治療薬の開発は喫緊の課題である。

HOX 遺伝子は DNA 結合ドメイン (Homeobox domain) を有する転写因子であり、他の遺伝子の発現を制御する遺伝子群で、これまでに 39 種が同定されている。近年、この HOX 遺伝子が癌の分野で注目され、多くの癌で過剰発現し、癌の増殖・浸潤・転移や抗がん剤耐性に密接に関与することが報告されている (Nature Review;361,2010)。

我々は、これまでに HPV16 型陽性子宮頸癌細胞株および患者腫瘍における HOX 遺伝子の発現と臨床病理学的因子を検討したところ、HOXD9 の発現が上昇していることが判明した。そこで、その分子メカニズムについて解析を行い、HOXD9 が HPV 初期プロモーターに結合し、HPV 初期遺伝子である HPV-E6 および HPV-E7 の発現を促進することで子宮頸癌の悪性化形質に決定的な役割を果たすことを明らかにした (Hirao N. et al. *Gynecol Oncol.*155:340,2019)。HPV は扁平上皮癌や通常型腺癌だけでなく小細胞癌や神経内分泌癌などにも普遍的に検出され、HOXD9 を標的とした薬剤の開発は、これまで有効な治療がない難治性子宮頸癌の新規治療の開発にもつながると考えた。さらに子宮頸癌のほか、肛門癌の 90%、中咽頭癌の 50%、陰茎癌の 60%においても HPV 感染が発癌の原因とされており、これらの HPV 関連腫瘍の治療にも応用可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、転写因子 HOXD9 を標的とした治療薬を開発するため、(1) HOXD9 の発現を抑制する核酸医薬品 (特に siRNA) の探索および高効率なドラッグデリバリーシステムの確立を目指すとともに、(2) 既存薬ライブラリーを用いて HOXD9 抑制剤のスクリーニングを行い、Drug Repositioning の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 子宮頸癌細胞株における HOXD9 発現抑制の検証

HPV 陽性子宮頸癌細胞株 SiHa (HPV16 型) および HeLa (HPV18 型) を用いて、siRNA および低分子化合物による HOXD9 mRNA の発現抑制をリアルタイム PCR、HOXD9 の抑制が細胞増殖に与える影響を WST-1 assay を用いて解析した。なお、HOXD9 mRNA を標的とする siRNA は siDirect (<http://sidirect2.rnai.jp/>) を用いて設計した。既存薬ライブラリーを用いたスクリーニングには人工知能 LIGHTHOUSE (株式会社 Q イノベーション) を用いた。

(2) 患者由来子宮頸癌オルガノイドの樹立

慶應義塾大学病院産婦人科にて、手術あるいは生検により採取した子宮頸癌組織より HPV 陽性子宮頸癌患者由来オルガノイドを樹立した。

4. 研究成果

予備実験として、過去に論文での実績のある siRNA による HOXD9 のノックダウンを行い、遺伝子発現に与える影響を調べたところ、いずれの siRNA においても HOXD9 mRNA の発現抑制が確認されたが、レンチウイルス shRNA を用いた先行研究と比較すると発現抑制の効果は限定的であり、細胞増殖の有意な抑制は確認できなかった。既存の siRNA は全て HOXD9 exon を標的配列としていたため、siDirect にて 3'UTR をターゲットに設計した siRNA を用いて同様の検討を行ったところ、siRNA 処理 48 時間後において HOXD9 mRNA 発現は抑制され、一部の siRNA では処理後 120 時間後において細胞増殖の抑制が確認された。

一方で、低分子化合物における検討については、基礎研究においては HOX 遺伝子群の発現に影響されることが知られている低分子化合物 X を用いて上記と同様の検討を行ったところ、1 μ M 以上の濃度において、いずれの細胞株においても HOXD9 mRNA の発現レベルは濃度依存的に上昇した。しかしながら、HOXD9 mRNA とは反比例して、HPV-E6/E7 遺伝子の mRNA 発現減少や細胞増殖の顕著な抑制が確認されたことから、この化合物 X が HOXD9 の翻訳阻害や HPV 初期プロモーターへの結合阻害に関与している可能性がある。さらに、人工知能 LIGHTHOUSE を用いて HOXD9 に結合する候補化合物 (化合物 X を含む) の探索を行ったところ、HOXD9 との関与が高いと予想される化合物を数種類獲得した。

今後は、今回獲得した候補化合物による薬剤感受性試験を行い、薬剤スクリーニングを実施するとともに、その作用機序の解明を目指す。さらに樹立した患者由来オルガノイドを用いて HOXD9 siRNA および薬剤 X の ex vivo モデルにおける効果を検証する。良好な結果が得られた場合には、PD-L1 や各種サイトカインの産生など、免疫関連分子の発現を通して癌の免疫微小

環境に影響を与えるか検討する。

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〕

〔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
---------	---------