

氏名	佐藤 尚人
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 448 号
学位授与年月日	平成 26年 3月 19日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第2項該当
学位論文名	RNA干渉を応用した子宮頸癌に対する新規分子標的治療法の開発を目的とした基礎的研究
論文審査委員	(委員長) 教授 岡本 宏明 (委員) 准教授 久米 晃啓 准教授 穂積 康夫

論文内容の要旨

1 研究目的

子宮頸癌は全世界で女性の癌による死亡原因の第3位を占め、毎年約50万人が罹患し、そのうち1/3が死亡する。進行子宮頸癌に対しては手術療法、放射線療法、化学療法、あるいはそれらの併用が行われるが、進行例の予後は依然として不良であり、30年前に比べて子宮頸癌全体の治療成績の改善はみられていない。分子標的治療などの新しい治療戦略は子宮頸癌の治療成績改善につながる可能性がある。子宮頸癌新規分子標的治療法の開発を目的に、インドールアミン酸素添加酵素抑制による分子標的治療ならびに悪性型ヒトパピローマウイルスのE6/E7を標的とした遺伝子治療に関する基礎的研究を行った。

前者について、インドールアミン酸素添加酵素(IDO)は必須アミノ酸であるトリプトファン

の代謝律速酵素である。臨床的にはIDOは前立腺癌、大腸癌、膵臓癌、胃癌などの悪性腫瘍で高頻度に発現が認められている。腫瘍はIDOを高発現することにより周囲のトリプトファンを欠乏させ、高キヌレニン状態とし、細胞傷害性T細胞(CTL)やNatural killer(NK)細胞などの免疫担当細胞を抑制し免疫寛容を得る。婦人科領域においても、子宮頸癌、子宮体癌、卵巣癌でIDO発現が認められており、またその高発現と予後との関連が報告されている。本研究では、IDO発現と子宮頸癌の進展との関連を明らかにするため、子宮頸癌細胞のIDO発現をshRNAベクターを用いて実験した。さらに、IDOを標的とした子宮頸癌新規分子標的治療法の開発を目的に、子宮頸癌の進展におけるNK細胞の役割を検討した。

次に後者について、子宮頸癌は高リスク型ヒトパピローマウイルス(HPV)感染が引き金になって発癌し、前癌病変である子宮頸部上皮内新生物(CIN)を経由し発症する。発癌機序として、高リスク型HPVが子宮頸部上皮基底細胞に持続感染し宿主の染色体にインテグレーションすると、HPVのE6およびE7が高発現し、癌抑制遺伝子p53およびRbを不活化し癌が惹起される。従ってE6およびE7の発現を抑制できれば、子宮頸癌は治療が可能である。また、E6およびE7の発現は子宮頸癌病変部のみに限局しており、子宮頸部を含む正常組織には発現していない。E6およびE7を特異的に阻害する治療法は、病変部のみに作用し正常組織には影響を与えない、安全な治療と考えられる。siRNAは転写後の標的遺伝子発現を特異的に効率よく抑制できる優れた方法である。この手法を用いて高リスク型HPVのE6とE7を強力にかつ長期

間抑制できるようにするため、アデノ随伴ウイルス(AAV)を非病原性ウイルスベクターとして用い、shRNA (shE6E7)搭載 AAV ベクター(AAV-shE6E7)を作製し遺伝子導入を行った。高リスク型 HPV の E6 と E7 を標的とした子宮頸癌治療はいまだ行われていない。HPV 16 型 E6 と E7 を標的とした AAV-shE6E7 を用いた特異性の高い子宮頸癌新規治療法の開発を目的に、基礎的研究を行った。

2 研究方法

インドールアミン酸素添加酵素抑制による分子標的治療に関する基礎的研究は、以下の方法で検討を行った。

1)9 種の子宮頸癌細胞株(SKG-I、-II、-IIIa、-IIIb、CaSki、SiHa、BOKU、HCS-2、ME-180)を対象に、インターフェロン- γ 刺激後の IDO 発現を Western blot 法で観察した。2)IDO を発現する子宮頸癌細胞株 CaSki に IDO のショートヘアピン型 siRNA 発現ベクターを遺伝子導入し、IDO 抑制株(CaSki/shIDO)を樹立した。3)CaSki/shIDO の *in vitro* 細胞増殖、および *in vivo* マウス皮下移植腫瘍増殖をコントロールと比較した。4)CaSki/shIDO と NK 細胞(KHYG-1)を *in vitro* で共培養し、72 時間後の生細胞数をコントロールと比較した。

悪性型ヒトパピローマウイルスの E6/E7 を標的とした遺伝子治療に関する基礎的研究は、以下の方法で検討を行った。

5 種の 16 型 HPV 陽性子宮頸癌細胞株(BOKU、CaSki、SiHa、SKG-IIIa、SKG-IIIb)

を対象に、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの血清型(1~9)別感染効率を β -ガラクトシダーゼ発現を指標に比較した。2) HPV16 の E6 および E7 を同時に発現抑制できるショートヘアピン型 siRNA を搭載した 2 型 AAV ベクター(AAV2-shE6E7)を作製した。3)AAV2-shE6E7 を子宮頸癌細胞に感染させ、E6、E7、p53、p21、pRb、p16 発現を Western blot 法で観察した。4)子宮頸癌細胞または非腫瘍性不死化細胞(HEK293)に AAV2-shE6E7 を感染させ、*in vitro* 細胞増殖、Annexin V を指標としたアポトーシス細胞数をコントロールと比較した。5)子宮頸癌細胞由来のマウス皮下移植腫瘍に AAV2-shE6E7 を直接接種し、効果を検討した。

3 研究成果

インドールアミン酸素添加酵素抑制による分子標的治療に関する基礎的研究は、以下の研究成果であった。

1)子宮頸癌細胞株 9 種中、SKG-IIIb を除く 8 種に IDO の発現が認められた。2) CaSki/shIDO の *in vitro* 細胞増殖はコントロールと差がみられなかった。一方、*in vivo* マウス皮下移植腫瘍増殖はコントロールに比べて有意に抑制され、摘出腫瘍間質に NK 細胞の集積を認めた。3)NK 細胞と共培養後の CaSki/shIDO の生細胞数は、コントロールに比べて有意に少なかった。

悪性型ヒトパピローマウイルスの E6/E7 を標的とした遺伝子治療に関する基礎的研究は、以下の研究成果であった。

1)5 種の子宮頸癌細胞株に対して AAV ベクター 2 型が最も高い感染効率を示した。2)AAV2-shE6E7 感染後、HPV E6 と E7 の mRNA 発現低下が認められた。3) AAV2-shE6E7 感染後、E6、E7、p16 の発現低下と、p53、p21、pRb の発現増加が認められた。4) AAV2-shE6E7 感染後の子宮頸癌細胞の増殖は抑制され、多数のアポトーシスが確認された。一方、非腫瘍性不死

化細胞に対する影響はみられなかった。5) AAV2-shE6E7 接種後の腫瘍は縮小した。マウスおよび接種部位に異常はみられなかった。

4 考察

子宮頸癌細胞では IDO 産生能が高頻度に認められること、また IDO 抑制により NK 細胞への感受性が増強し、腫瘍増殖が阻害されることが明らかとなった。

AAV2-shE6E7 による E6 および E7 の発現抑制により、p53、pRb などの癌抑制遺伝子が正常に機能しアポトーシス誘導作用を正常に機能させることが明らかとなり、実際に *in vitro* および *in vivo* 実験で著明な増殖抑制効果を認めた。

5 結論

子宮頸癌の進展に IDO を介した免疫抑制が関与することが示され、IDO は有用な分子標的と考えられた。

AAV2-shE6E7 による新規遺伝子治療の効果が確認され、子宮頸癌に対する臨床応用が期待された。

RNAi を応用した分子標的治療などの新しい治療戦略は、子宮頸癌の治療成績改善につながる可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

提出された学位論文は二部構成になっており、「悪性型ヒトパピローマウイルスの E6/E7 を標的とした子宮頸癌初期病変に対する遺伝子治療」、次いで「インドール酸素添加酵素抑制による子宮頸癌に対する分子標的治療」の順に記載されていたが、審査員の指摘により順番を逆にしたうえで一つに統合され、細部も修正のうえ再提出された。表題も研究内容が反映された総括的な表題に書き改められた。ここでは再提出された学位論文についての審査結果を記述する。

進行子宮頸癌に対して手術療法、放射線療法、化学療法、あるいはそれらの併用が行われているが、その予後は不良であり、30 年前に比べて子宮頸癌全体の治療成績の改善はみられていない。そこで申請者は種々の悪性腫瘍がインドールアミン酸素添加酵素 (IOD) の高発現により免疫監視機構から回避していることに着目し、子宮頸癌に対する新規分子標的治療法の開発を目的として子宮頸癌細胞株における IOD 発現を shRNA ベクターを用いて抑制し、頸癌の進展における NK 細胞の役割を検討した。その結果、IOD の発現抑制は *in vitro* で子宮頸癌細胞の NK 細胞への感受性を亢進させ、*in vivo* で NK 細胞の子宮頸癌腫瘍間質への集積を促進することが分かった。すなわち、IOD の発現抑制は NK 細胞の腫瘍細胞傷害活性を促進し、子宮頸癌の腫瘍増殖を抑制したと考えられた。

子宮頸癌は高リスク型ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染が引き金になって発癌することが明らかにされている。すなわち、高リスク型 HPV が子宮頸部上皮基底細胞に持続感染し宿主の染色体に組み込まれると、HPV の E6 及び E7 が高発現し、癌抑制遺伝子 p53 及び Rb が不活化され、癌が惹起される。そこで、申請者は HPV16 型 E6 及び E7 を標的とした shRNA (shE6E7)

搭載 AAV ベクター (AAV-shE6E7) を用いた、特異性の高い子宮頸癌新規治療法の開発を目的として子宮頸癌細胞株をターゲットとして基礎研究を行った。AAV2 ベクターが最も高い遺伝子導入効率を示した。そこで AAV2-shE6E7 を用いて検討した結果、*in vitro* では濃度依存的な増殖抑制効果が、*in vivo* では著明な腫瘍縮小効果が認められた。

臨床応用に向けて越えなければならないハードルは多々あるが、申請者はそれをよく理解しており、考察にもそれが的確に表現されていた。本研究は RNA 干渉を応用した分子標的治療が子宮頸癌の治療成績向上に繋がる可能性があることを示した新規性及び発展性のある研究であり、今後の子宮頸癌の治療法の発展に資する研究成果を示した点で学位授与に相応しいと審査員全員が評価し、合格と判定された。

最終試験の結果の要旨

口頭発表も最初に提出された学位論文と同様に二部構成になっており、「悪性型ヒトパピローマウイルスの E6/E7 を標的とした子宮頸癌初期病変に対する遺伝子治療」、次いで「インドール酸素添加酵素抑制による子宮頸癌に対する分子標的治療」の順に発表された。それに対して、審査員より、論文の記述の順番を逆にしたうえで一つに統合し、研究内容全体を反映した総括的な表題に変更するよう指摘があった。また、解析に用いられた子宮頸癌株はいずれも「浸潤癌」由来であり、現在の悪性腫瘍に対する遺伝子治療が進行癌などで代替治療の存在しない疾患を対象としていること、また *in vivo* 実験においても粘膜内病変に対する効果を検討していないことを踏まえ、「子宮頸部初期病変」に関する記述を削除すべきであるとの指摘があった。申請者はこれらの指摘の意図をよく理解し、指摘を受けた項目すべてに真摯に対応し学位論文を再提出した。提出された修正論文を審査員全員が校閲し、学位授与に相応しい内容に書き改められていることを確認した。なお、「インドール酸素添加酵素抑制による分子標的治療」についての研究内容は Peer Review を受け、既に *Oncol Rep* 誌 (28: 1574-1578, 2012) に掲載されている。「悪性型ヒトパピローマウイルスの E6/E7 を標的とした遺伝子治療」については、投稿準備中とのことであったが、AAV2-shE6E7 による遺伝子治療効果が十分に検討され、合格点に達していると認められた。

口頭試問に対して、的確な回答を行い、学術的に十分な学識と研究能力を有することが示された。応用研究への意欲も示され、学位を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。