

課題番号 10

vasohibin family を対象とした婦人性器がん 分子標的・遺伝子治療の開発

[1] 組織

代表者：嵯峨 泰

(自治医科大学産科婦人科)

対応者：佐藤 靖史

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

高橋 詳史 (自治医科大学産科婦人科)

葭葉 貴裕 (自治医科大学産科婦人科)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

がん治療に応用可能な因子の研究・開発は、近年ますますその重要性を増している。われわれはこれまで、vasohibin (VASH) family が婦人性器がんの進展に重要な役割を果たしていることを報告してきた。最近、VASH family が微小管の活性に関わる脱チロシン化作用を持つことが相次いで報告された。婦人科がん化学療法のキードラッグであるパクリタキセル (PTX) の作用機序は微小管の活性阻害である。VASH family、PTX の両者が微小管制御に関与するので、VASH family と PTX とは相互作用を示す可能性がある。子宮頸がん細胞を対象に CRISPR/Cas9 による VASH2 ノックアウトと PTX 感受性との関係を検討した。以下、研究活動状況の概要を記す。

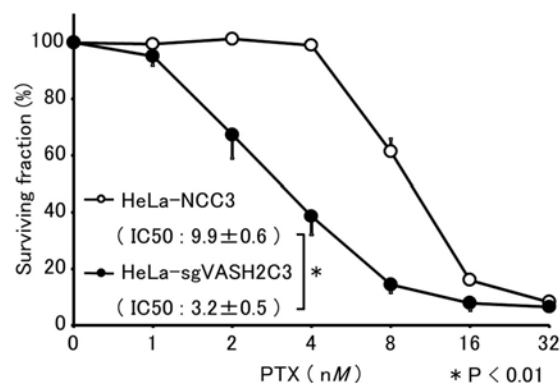
1) VASH2 のエクソン 4 を標的とした単ガイド RNA 発現ベクターと、コドンヒトに最適化した A 群溶連菌由来の Cas9 発現ベクターとを、4 種の子宮頸がん細胞に遺伝子導入してゲノム編集、クローニングした。標的配列を含むプライマーペアと含まないプライマーペアとを用いた定量的 PCR 法と、サンガーシーケンスで VASH2 の変異導入を確認した。

2) VASH2 発現を定量的 RT-PCR 法で評価した。3) PTX と CDDP 感受性を WST-1 アッセイで検討した。これらの成果は東北大学加齢医学研究所の共同研究者に主に電子メールで報告し今後の方針を討論した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1) ゲノム編集クローンでは 4 株とも標的配列を含むプライマーペアを用いた PCR の効率が著しく低下した。またサンガーシーケンスにより標的配列の変異が確認された。VASH2 ノックアウト株が樹立された。2) 4 つの VASH2 ノックアウト株全てにおいて、各々のコントロール株に比べて VASH2 の mRNA 発現が顕著に低下した。3) VASH2 ノックアウト株のうち 2 株において PTX 感受性がコントロールに比べて増強した。この 2 株は CDDP 感受性に差は認められなかった。CRISPR/Cas9 による VASH2 ノックアウトは子宮頸がん細胞の PTX 感受性を増強させた。VASH2 を標的とした治療戦略では血管新生阻害のみならず、PTX 感受性増強も期待できる可能性が示唆された。



図：HeLa 細胞における VASH2 ノックアウトと PTX 感受性

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、子宮頸癌における VASH2 と PTX 感受性との関係が示唆された。われわれが開発を進めている VASH2 を標的とした子宮頸がん治療戦略は、血管新生阻害のみならず、PTX 感受性増強効果も期待できるかもしれない。これらの知見が臨床応用されれば、近年全く改善のみられない進行子宮頸がん症例の予後に対して、大きなインパクトをもたらす可能性がある。

[4] 成果資料

(1) Yoshiba T, Saga Y, Urabe M, Uchibori R, Matsubara S, Fujiwara H, Mizukami H. CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6. *Oncol Lett* **17**: 2197-2206, 2019

(2) Matsushita C, Fujiwara H, Takei Y, Saga Y, Machida S, Taneichi A, Takahashi S, Yoshiba T, Koyanagi T, Takahashi Y, Morisawa H, Suzuki M. New criteria for the omission of lymphadenectomy in endometrioid carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2019 pii: ijgc-2019-000044. doi: 10.1136/ijgc-2018-000044

(3) Takei Y, Takahashi S, Machida S, Taneichi A, Yoshiba T, Takahashi Y, Yoshida C, Saga Y, Matsubara S, Fujiwara H. Impact of the number of removed lymph nodes on recurrence-free survival in stage I ovarian clear cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* **23**: 930-935, 2018

(4) Kurosaki F, Uchibori R, Sehara Y, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Hagiwara K, Kume A. AAV6-Mediated IL-10 Expression in the Lung Ameliorates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Hum Gene Ther* **29**: 1242-1251, 2018

(5) Sato N, Saga Y, Uchibori R, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Fujiwara H, Suzuki M, Ozawa K, Mizukami H. Eradication of cervical cancer in vivo by an AAV vector that encodes shRNA targeting human papillomavirus type 16 E6/E7. *Int J Oncol* **52**: 687-696, 2018