

氏 名	中村 真由美
(ふりがな)	(なかむら まゆみ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 1132 号
学位審査年月日	令和2年1月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	MicroRNA-22 enhances radiosensitivity in cervical cancer cell lines via direct inhibition of c-Myc binding protein, and the subsequent reduction in hTERT expression (miR-22 は、MYCBP を直接的に抑制し、それに続く hTERT の減少を介して子宮頸癌の放射線治療感受性を高める。)
論文審査委員	(主) 教授 二瓶 圭二 教授 大須賀 慶悟 教授 東 治人

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《目 的》

子宮頸癌は検診の普及による早期発見により死亡率は低下傾向にある。しかし 20～40 歳代の若年層では罹患率が増加傾向にあり、進行子宮頸癌の予後は依然として不良である。局所進行子宮頸癌では放射線療法が治療の中心であるが、予後改善のため新しい治療の介入が強く望まれる。最近の報告では、子宮頸癌では、miR-22 の発現低下は予後不良と関連していることが示されたが、子宮頸癌治療における miR-22 の役割は不明である。また別の報告では miR-22 は MYCBP を直接的に抑制し、それに続く c-Myc 活性の低下により腫

瘍抑制因子となり得ることが近年報告されたが、放射線治療への影響の有無については検討されていない。

本研究では c-Myc の標的遺伝子に human Telomere Reverse Transcriptase (hTERT) があることに着目した。hTERT はテロメラーゼ活性の調節に関与し、がんの腫瘍形成、増殖にとって重要である。hTERT 発現の低下は、子宮頸癌細胞の放射線感受性を高めることが報告されているが、子宮頸癌において、miR-22 と hTERT に関する報告はみられない。本研究では、子宮頸癌細胞における miR-22 の MYCBP に対する作用を調べ、それに続く hTERT 発現への影響と子宮頸癌細胞の放射線感受性における miR-22 の役割を分析した。

## 《方 法》

### 1. 子宮頸癌細胞株の内因性 miR-22 の発現量の測定と miR-22 の発現調節による MYCBP の発現量への影響の検討

子宮頸癌細胞株 3 種 (C-4I、SKG-II、SiHa) の miR-22 の発現量を qRT-PCR 法を用いて検討した。C-4I と SKG-II に、Pre-miR-22 を transfection し、SiHa に Anti-miR-22 を transfection した。miR-22 の発現量の変化により MYCBP の発現量がどのように変化するか qRT-PCR 法で検討した。

### 2. 子宮頸癌細胞株において miR-22 は MYCBP 3'UTR に直接作用するか

miR-22 が MYCBP3'UTR に直接作用するか否かルシフェラーゼアッセイを行い検討した。C-4I に Pre-miR-22 もしくは control miR と、野生型ヒト MYCBP3'UTR のレポータークローンである plasmid pEZX-MT05 を co-transfection した。SiHa には Anti-miR-22 もしくは control miR と、plasmid pEZX-MT05 を co-transfection して、それぞれ 48 時間後に培地を回収し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

### 3. miR-22 は hTERT の発現を調節するか

C-4I および SKG-II に Pre-miR-22 を transfection し、control miR と比較して c-Myc

と c-Myc の標的遺伝子の一つである hTERT の発現がどのように変動するか qRT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて解析した。同様に SiHa には Anti-miR-22 を transfection し、control miR と比較して c-Myc および hTERT の発現の変動を qRT-PCR 法とウェスタンブロット法で control miR の transfection 群と比較検討した。

#### 4. *in vitro* における、miR-22 と子宮頸癌細胞株の放射線感受性の検討

子宮頸癌細胞株の放射線感受性におよぼす miR-22 の効果を調べるため、Pre-miR-22 または control miR を transfection した子宮頸癌細胞株 C-4I と SKG-II に、放射線 (2、4、6、8Gy) を照射した。SiHa にも同様に Anti-miR-22 または control miR を transfection し、放射線 (2、4、6、8Gy) を照射した。それぞれ、照射の 14 日後にコロニー (50 細胞以上) 形成数をカウントし、生存曲線を作成した。

#### 5. 子宮頸癌細胞株の *in vivo* における放射線感受性への miR-22 の効果の検討

レンチウイルスを用いて miR-22 または control miR を子宮頸癌細胞株 C-4I に形質導入し、ヌードマウスに皮下移植した。腫瘍形成後に放射線を照射し、経時的に腫瘍サイズを測定した。また、腫瘍摘出後に重量を測定し、摘出した腫瘍のパラフィン切片を作成し、Ki-67 免疫染色と TUNEL Assay を行った。

### 《結 果》

1. 子宮頸癌細胞株 (C-4I、SKG-II、SiHa) において、内因性 miR-22 の発現は SiHa で高く、SKG-II および C-4I で低かった。そこで、miR-22 の機能獲得実験には SKG-II と C-4I を使用し、miR-22 の機能欠失実験には SiHa を使用した。SKG-II と C-4I において miR-22 を過剰発現させると MYCBP の発現は有意に低下し、SiHa において miR-22 の発現を低下させると MYCBP の発現は有意に増加した。
2. C-4I に Pre-miR-22 とルシフェラーゼで標識した MYCBP 3'UTR レポータークローン

を co-transfection すると、cont miR に比べルシフェラーゼ活性が低下した。また SiHa に Anti-miR-22 と MYCBP 3'UTR レポータークロンを co-transfection すると control miR に比べルシフェラーゼ活性が増加した。これらの結果から、子宮頸癌細胞株において miR-22 が MYCBP 3'UTR に直接的に作用し、MYCBP mRNA の発現を有意に抑制することが示された。

3. C-4I と SKG-II において miR-22 を過剰発現させると hTERT の発現が有意に低下し、SiHa において miR-22 の発現を抑制すると hTERT 発現が有意に増加した。miR-22 の発現量の変動しても、c-Myc の発現量は変化しなかった。これらの結果により、miR-22 は c-Myc mRNA の発現には直接影響せず、miR-22 による MYCBP の直接的な抑制により c-Myc の標的遺伝子である hTERT の発現量が低下することが示唆された。
4. control miR と比較して、miR-22 を過剰発現させた C-4I と SKG-II の放射線照射後の細胞生存率は低かった。逆に miR-22 の発現を低下させた SiHa は、control miR 導入群と比較して放射線照射後の細胞生存率が高かった。
5. コントロール (L-cont-C-4I) 群と比較して、miR-22 を形質導入した C-4I (L-miR22-C-4I) を移植した群では放射線照射後の腫瘍の縮小効果が有意に増強された。Ki-67 index は、L-cont-C-4I 群よりも L-miR22-C-4I 群で有意に低かった。さらに、TUNEL index は L-cont-C-4I 群よりも L-miR22-C-4I 群の方が有意に高く、miR-22 の放射線照射後のアポトーシス誘導が示唆された。

## 《結 論》

本研究では、子宮頸癌細胞株において miR-22 が MYCBP 3'UTR を標的とし、MYCBP mRNA 発現を直接的に抑制することにより、それに続く hTERT の発現を低下させ、子宮

頸癌細胞の放射線感受性が増加することを示した。特に注目すべきは、**miR-22** の発現増加により *in vitro* および *in vivo* の両方で放射線感受性が増加したことである。これらの結果は子宮頸癌の放射線治療における **miR-22** の有用性を示唆している。

## 論文審査結果の要旨

子宮頸癌の進行症例に対する主な治療は放射線療法であるが、依然として長期予後は不良であり、新たな治療的介入が望まれる。本研究は、子宮頸癌における miR-22 と c-Myc-binding protein (MYCBP) の関係に着目するとともに、MYCBP の主な作用点である c-Myc に注目し、c-Myc の標的遺伝子 human Telomere Reverse Transcriptase (hTERT) への miR-22 の影響を検討し、hTERT の発現調節を通じて、子宮頸癌の放射線療法の新たな治療戦略への可能性を検証したものである。

申請者は、子宮頸癌細胞株(C-4I、SKG-II、SiHa)に miR-22 を遺伝子導入し、MYCBP の発現量を qRT-PCR 法で検討した。その結果、miR-22 と MYCBP の発現量は逆相関することが確認された。次に、C-4I、SKG-II、SiHa において miR-22 が MYCBP 3'UTR に直接作用することをルシフェラーゼアッセイで確認した。さらに C-4I、SKG-II で miR-22 を過剰発現させると hTERT の発現量が減少し、SiHa で miR-22 の発現を抑制すると hTERT の発現量が増加することを qRT-PCR 法とウェスタンブロット法で明らかにした。さらに、miR-22 を遺伝子導入した C-4I、SKG-II および SiHa における放射線感受性を clonogenic assay を用いて分析し、miR-22 の発現を増加させると子宮頸癌細胞の放射線感受性が増加することを明らかにした。さらに、レンチウイルスにより miR-22 を形質導入した C-4I を用いて xenograft を作成し、放射線照射の効果を *in vivo* で解析した。その結果、*in vivo* においても miR-22 の過剰発現により放射線感受性が有意に増加し、腫瘍組織の Ki-67 index が減少した。また TUNEL index は増加し miR-22 の放射線照射後のアポトーシスへの影響が示唆された。特筆すべきことは、miR-22 の過剰発現により放射線感受性が増加することを複数の子宮頸癌細胞株を用いて、しかも *in vitro* および *in vivo* の両方で確認したことである。これらの成果は子宮頸癌の放射線治療において、miR-22 を利用した新たな治療への可能性を示唆するものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncology Letters 19(3): 2213-2222, 2020 Mar

doi: 10.3892/ol.2020.11344