

氏 名	小西 博巳
(ふりがな)	(こにし ひろみ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1156号
学位審査年月日	令和3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	The therapeutic potential of exosomal miR-22 for cervical cancer radiotherapy (miR-22 含有エクソソームの子宮頸癌放射線治療 への応用)
論文審査委員	(主) 教授 二瓶 圭二 教授 大須賀 慶悟 教授 朝日 通雄

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《緒 言》

子宮頸癌は、女性で4番目に多い悪性腫瘍である。スクリーニングと早期治療により、子宮頸癌の発生率と死亡率は減少したが、進行子宮頸癌の場合、予後は依然として不良である。放射線療法は進行子宮頸癌において重要な治療法となるが、放射線抵抗性や放射線療法後の再発、副作用などの問題点があり、新しい治療アプローチが必要となる。microRNA (miRNA) は、約22塩基と非常に短い1本鎖RNAで、遺伝子の発現調節を行う。miRNAの一つであるmiR-22は、癌遺伝子c-Mycの標的遺伝子プロモーターへの結合を促進するMYCBPの遺伝子の発現を抑制することが近年乳癌で報告された。miR-22は子宮頸癌の予後不良と関連することが報告されているが、そのメカニズムは解明されていない。申請者らの研究グループではmiR-22を子宮頸癌株に遺伝子導入すると、MYCBP

の発現が抑制されることを確認し、さらに、c-Myc の標的遺伝子である hTERT の発現が減少することを見出した。

一方、エクソソームは、細胞から分泌されるナノサイズの細胞外顆粒で、脂質二十膜構造に、シグナル伝達物質、mRNA や miRNA などの遺伝子発現調節因子を内包し、全身に届けられることから、新たなドラッグデリバリーシステムに応用できる可能性が示唆されている。そこで、エクソソームを用いて miR-22 を癌組織へ投与し、miR-22 と子宮頸癌細胞に対する放射線感受性に焦点を絞った研究を行い、進行・再発子宮頸癌の治療へ応用できる可能性について検討した。

《方 法》

- エクソソームを超遠心法により回収し、Western blotting、ナノ粒子トラッキング解析、走査型電子顕微鏡で回収できているかを確認した。
- miR-22 を HEK293 細胞に遺伝子導入することで、miR-22 を含有するエクソソーム (exosomal miR-22) を作成し、Real-time PCR により miR-22 が発現されているかを確認した。
- 子宮頸癌細胞に対する exosomal miR-22 の放射線増感効果を clonogenic assay を用いて確認した。また、アポトーシス誘導を確認するため、Western blotting を用いて Bax、Bcl-2 の発現を *in vitro* で評価した。

《成 果》

- 超遠心法を用いてエクソソームを回収し、エクソソームの存在を以下の方法で証明した。Western Blotting で、エクソソームのマーカースとして使用される CD63、TSG101 の発現を確認した。ナノ粒子トラッキング解析を用いて、粒子径が ϕ 118-129nm 付近にピークを持つことを確認した。走査型電子顕微鏡を用いて、エクソソームが均一な球形を呈していることを確認した。
- miR-22 を HEK293 細胞に遺伝子導入し、その細胞が分泌するエクソソームを回収した。

回収したエクソソームに **miR-22** が高発現していることを、**Real-time PCR** で確認した。**miR-22** を高発現させたエクソソームを子宮頸癌細胞株である **SKG** 細胞に投与し、**MYCBP** の発現が抑制され、さらに、**c-Myc** の標的遺伝子である **hTERT** の発現が減少することを確認し、エクソソームが **SKG** 細胞に効果的に吸収されていることを証明した。

- ・ **miR-22** を高発現させたエクソソームを子宮頸癌細胞株である **SKG** 細胞と **C4-1** 細胞に投与し、**clonogenic assay** を行った。**miR-22** を高発現させたエクソソームを投与することで、細胞の増殖率が低下し放射線感受性が増加することを **2D** 細胞培養、**3D** 細胞培養ともに確認した。アポトーシス促進性の **Bax** 発現、抗アポトーシス性の **Bcl-2** 発現を評価し、**miR-22** を高発現させたエクソソームを投与することで、**Bax** の発現が促進、**Bcl-2** タンパク質が抑制されていることから、アポトーシスが誘導されていることを確認した。

《結 語》

本研究により、**miR-22** を発現させたエクソソームの精製に成功し、子宮頸癌細胞株へ投与することによって放射線感受性の増強効果を確認した。

miR-22 を高発現させたエクソソームは、子宮頸癌の放射線療法における増感効果増強のための新しいドラッグデリバリーシステムとなる可能性が示唆される。

論文審査結果の要旨

エクソソームは、細胞から分泌されるナノサイズの細胞外顆粒で、脂質二重膜構造に、シグナル伝達物質、mRNA や miRNA などの遺伝子発現調節因子を内包し、血清、唾液、尿、母乳などの体液に分泌され全身に届けられることから、新たなドラッグデリバリーシステムに応用できる可能性が示唆されている。本論文は、miR-22 を高発現させたエクソソームの精製法を確立し、その投与によって子宮頸癌細胞の放射線感受性が増強するかどうかを確認することを目的としたものである。

申請者は、Western blotting、ナノ粒子トラッキング解析、そして、走査型電子顕微鏡を用いることで、超遠心法での回収物中にエクソソームが存在し、また、その精製度が高いことを確認した。また、miR-22 を HEK293 細胞に遺伝子導入し、その細胞が分泌するエクソソームに miR-22 が高発現していることを、Real-time PCR で確認した後、そのエクソソームを子宮頸癌細胞株である SKG 細胞に投与し、c-Myc の活性化因子である MYCBP や標的遺伝子である hTERT の発現が減少することを見出し、エクソソームが SKG 細胞に効果的に吸収されていることを証明した。さらに、miR-22 を高発現させたエクソソームを子宮頸癌細胞株である SKG 細胞と C4-1 細胞に投与し、clonogenic assay を行ったところ放射線感受性の増強が確認された。本研究の結果から、miR-22 を高発現させたエクソソームは、子宮頸癌の放射線療法における増感効果増強のための新しいドラッグデリバリーシステムとなる可能性が示唆され、今後の研究のさらなる発展と将来的な臨床応用が期待される。

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)

Cancer Biology & Therapy in press