

財団使用欄

令和5年5月1日受理
No. 5

完了報告書

(兼 会計報告書)

令和 5 年 4 月 27 日

公益財団法人 シオノ健康財団

理事長 塩野谷 貫一 殿

個人の方

氏名 小堀 宅郎



団体の方

団体名

代表者



貴財団より助成いただいた活動が完了いたしましたので、下記のとおり報告します。

活動内容	細胞内の足場を標的とした“自然免疫”チェックポイント分子の 阻害に基づく革新的卵巣明細胞腺癌免疫療法の開発
------	--

※今後の連絡に必要となりますので、全ての項目にご記入ください。

提出者に関する事項	(フリガナ) 氏名又は団体名	コボリ タクウ 小堀 宅郎	生年月日 又は設立年月日	
	(フリガナ) 提出担当者	コボリ タクウ 小堀 宅郎		
	住所	〒 584 - 8540 大阪府 富田林市 錦織北 3-11-1 (TEL) 0721-24-9374 (FAX) 0721-24-9890 (E-mail) koboritaku@osaka-ohtani.ac.jp		
	連絡先 ・ 郵送先	〒 584 - 8540 大阪府 富田林市 錦織北 3-11-1 大阪大谷大学 薬学部 臨床薬剤学講座 (TEL) 0721-24-9374 (FAX) 0721-24-9890 (E-mail) koboritaku@osaka-ohtani.ac.jp		

※提出後の住所・連絡先変更の際は、速やかに事務局までご連絡ください。

(1) 活動成果
<p>卵巣癌の主要な組織型の中でも特に日本人女性における発生頻度が高い明細胞腺癌は、化学療法及び癌免疫療法に抵抗性で極めて予後不良である。また、その罹患率・死亡率は 15～39 歳の思春期・若年成人 (AYA) 世代から急増する。このことから、我が国の AYA 世代女性における健康の保持・増進のためには、卵巣明細胞腺癌に対する新規治療戦略の構築が急務となっている。</p>
<p>マクロファージ (Mφ) チェックポイント阻害療法は、癌細胞を貪食・排除する自然免疫系細胞の Mφ を利用した次世代の癌免疫療法として注目されている。癌細胞表面に過剰発現する CD47 は、Mφ 上の受容体との結合を介して Mφ による貪食作用を抑制する自然免疫チェックポイントとして機能している。</p>
<p>Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) は、細胞内のアクチン骨格とヒト上皮増殖因子受容体 2 型 (HER2) 等の一部の細胞膜分子を連結し、“足場”として細胞表面局在・機能を調節している。本研究では、卵巣明細胞腺癌における CD47 の細胞表面局在・機能調節に果たす ERM の役割を解析した。</p>
① ヒト卵巣明細胞腺癌由来細胞株における CD47 及び ERM の発現・細胞内局在の解析
<p>米国ブロード研究所・英国サンガー研究所が提供する Depmap portal を用い、入手可能且つ解析可能なレベルの CD47 及び ERM の遺伝子発現を有するヒト卵巣明細胞腺癌由来の細胞株として、RMG-V 及び OVTOKO 細胞を選抜した。リアルタイム RT-PCR 法とウエスタンブロット法により、これらの細胞株において CD47 及び ERM が mRNA とタンパク質レベルで発現することを確認した。</p>
<p>次に、蛍光抗体法による多重免疫染色後、共焦点走査型レーザー顕微鏡にて CD47 と ERM の細胞内局在を観察した結果、いずれも細胞膜領域において高度に共局在した (図 1)。</p>
② ERM の発現抑制によるヒト卵巣明細胞腺癌由来細胞表面における CD47 発現量の変化
<p>RMG-V 及び OVTOKO 細胞へ ERM 各々に対する small interfering (si) RNA を最終濃度 2 nM となるように導入して 3 日間培養した結果、各 siRNA の標的 mRNA 及びタンパク質発現量が著明に低下した。本実験条件下、フローサイトメトリー法にて CD47 の細胞表面発現量を測定すると、Moesin siRNA 処置群においてのみ、対照群と比較して細胞表面 CD47 発現量が有意に低下した。なお、Moesin siRNA の処置は、CD47 の mRNA 発現量へ影響を及ぼさなかった。</p>
<p>以上の結果から、RMG-V 及び OVTOKO 細胞表面における CD47 の発現量は、ERM の中でも特に Moesin によって調節されている可能性が示された (図 2)。</p>
(2) 今後の課題
<p>ヒト卵巣明細胞腺癌細胞において、CD47 と ERM が結合しているかどうかを評価するために、RMG-V 及び OVTOKO 細胞それぞれの全細胞抽出液へ抗 CD47 抗体を添加して免疫沈降を行った後、ウエスタンブロット法にて ERM のタンパク質発現の有無を確認する。さらに、siRNA により Moesin をノックダウンした RMG-V 及び OVTOKO 細胞を PKH26 (赤色)、ヒト Mφ 様細胞株の U937 細胞を PKH67 (緑色) 蛍光細胞リンカーキットを用いてそれぞれ蛍光標識して共培養後、ライブセルイメージングにて癌細胞に対する Mφ の貪食作用へ及ぼす影響を時空間的に観察する。これらの検討を通して、ヒト卵巣明細胞腺癌細胞における CD47 の細胞表面局在・機能調節に果たす Moesin の足場</p>

I. 活動成果及び今後の課題

(注) 各項目の記述には必要な分量のスペースを使ってください。

としての役割を証明することができれば、細胞内の足場を標的として自然免疫チェックポイント分子 CD47 の発現・機能を阻害するという新たな概念に基づく卵巣明細胞腺癌免疫療法の開発に繋がるものと考えている。なお、本研究成果を原著論文としてまとめ、国際専門誌へ投稿予定である。

*本研究成果の一部は、以下の論文として発表した。

Kobori T., Ito Y., Sawada Y., Urashima Y., Ito T., Obata T.

Cellular Membrane Localization of Innate Immune Checkpoint Molecule CD47 is Regulated by Radixin in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells.

Biomedicines, 11 (4): 1117 (2023) (査読有)

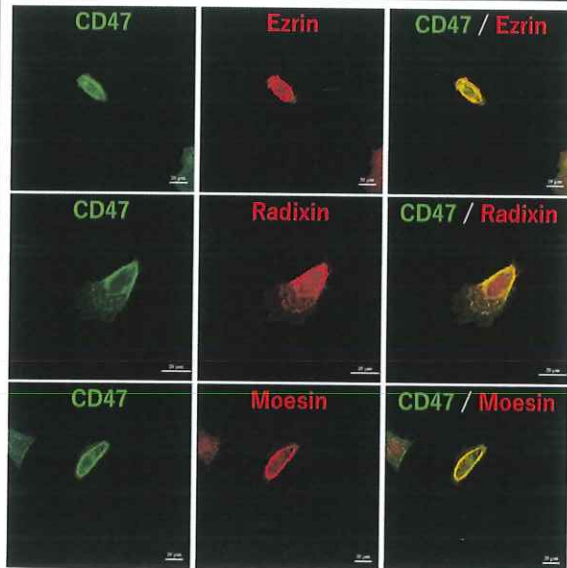


図 1. 免疫蛍光二重染色による RMG-V 細胞における CD47 と ERM の共局在解析

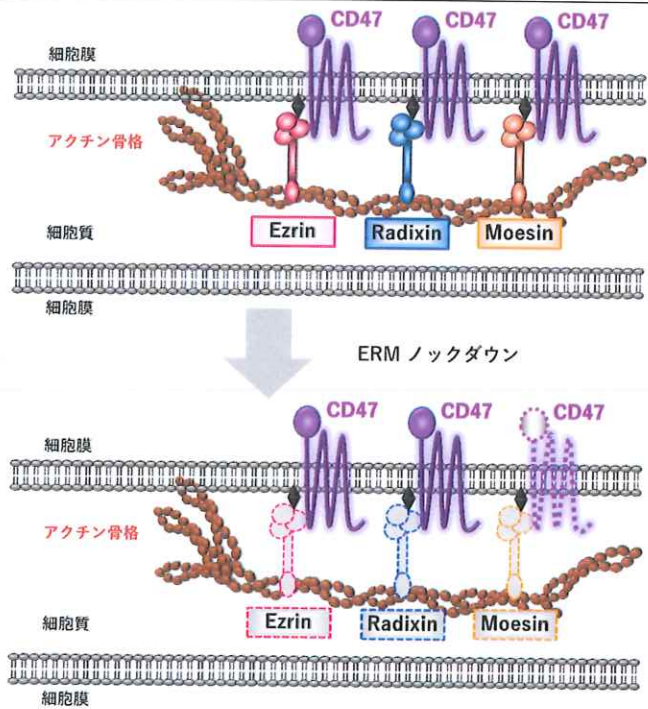


図 2. ヒト卵巣明細胞腺癌における ERM を介した CD47 の細胞表面局在調節