

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18792

研究課題名(和文)イヌ線維肉腫に対するRNA干渉を利用した治療法開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic strategies for canine fibrosarcoma by RNA interference

研究代表者

村上 麻美(Murakami, Mami)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：30597125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Fascin-1は54kDaのアクチン結合タンパクであり、生理的および病的な状態下で細胞運動に重要な役割を果たしている。犬線維肉腫は周囲への浸潤傾向が強く、外科的出後にも局所再発が多発する腫瘍であり、Fascin-1との関連性が強く示唆されている。今回、犬線維肉腫の病理組織切片を用いて免疫組織化学染色でFascin-1の発現を高度に認めている。また、犬線維肉腫細胞株においてsiRNAを用いて抑制させたところFascin-1は抑制されたとの結果が得られた。以上よりFascin-1は治療の標的として可能性があることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fascin-1 is a 54 kDa actin-binding protein and plays an important role in regulating cell adhesion as well as coordinating cell motility and invasion in physiological and pathogenic condition. Canine Fibrosarcoma is a malignant mesenchymal tumor and very locally invasive which often recurs following surgery. It is assumed that recurrence has relation with Fascin-1. Strong Fascin-1 protein expression has revealed in canine fibrosarcoma by immunohistochemistry. Furthermore, a suppressive tendency on cell migration in canine fibrosarcoma cell line by suppressing Fascin-1 was detected. Fascin-1 targeted therapy may represent a new strategy for the canine fibrosarcoma treatment.

研究分野：獣医学

キーワード：イヌ線維肉腫

1. 研究開始当初の背景

犬の線維肉腫は転移率の低い腫瘍であるものの、腫瘍細胞の周囲組織への浸潤が高度で外科的に切除したとしても、局所的な再発が高率に認められる難治性の悪性腫瘍である。しかしながら、一般的な化学療法や放射線照射以外の治療法は現在まで研究されておらず、新規治療法の開発が望まれる。

申請者はこれまでの研究から犬の自然発生腫瘍のうち、Fascin-1 が犬の口腔内悪性メラノーマで過剰発現しており、口腔内悪性メラノーマに罹患した犬の生存期間に相関している事を明らかとしている (Yamada, Murakami et al., 2011)。

さらに犬の口腔内悪性メラノーマのみならず、犬の血管肉腫や線維肉腫においても Fascin-1 の過剰発現が認められており、特に線維肉腫では、Fascin-1 の過剰発現が再発や転移、生存期間においても関与している可能性が示唆された(2014 獣医学会)。

Fascin-1 はアクチン結合タンパクであり、生理的および病的な状態下で細胞運動に極めて重要な役割を果たしているため、現在 Fascin-1 は医学領域において、乳癌、胃癌や移行上皮癌といった上皮系腫瘍で転移や再発に関わるバイオマーカーとして疫学的な調査が進んでいる。しかし、治療への応用としての研究については進んでいないため、申請者は犬線維肉腫における新規治療薬として、Fascin-1 に着目した。さらに、Fascin-1 のみでなく Fascin-1 を上流で制御する因子として示唆されている microRNA-145 (miRNA-145)、Cyclin D1 や c-Myc にも着目した。

miRNA は細胞内に存在する 20-25 塩基ほどの小さい RNA であり、mRNA の翻訳抑制あるいは切断を引き起こし、遺伝子発現を負に制御する non-coding RNA であり、がんをはじめとした様々な疾患に関与する事が知られている。さらに miRNA のうち Fascin-1 が過剰発現している悪性腫瘍では miRNA-145 の発現が減少していることも報告されている (Sachdeva et al., 2010)。さらに、また、これら 2 因子の下流には細胞周期に関連している Cyclin D1 と c-Myc が関与している事も示唆される。これまでに miRNA-145 の発現の抑制で Cyclin D1 と c-Myc の発現も減少する事が犬のメラノーマ細胞株で明らかとしており、(図未発表)。これら 2 因子が悪性腫瘍細胞

の増殖に関与している事が示唆される。

2. 研究の目的

申請者は、難治性である犬の線維肉腫において、Fascin-1 が過剰発現しており、Fascin-1 によって浸潤が抑制される事も明らかとした。本研究は、Fascin-1 および上流に存在する制御因子を用いた犬の線維肉腫の新規治療法の研究基盤を確立する事が目的である。

3. 研究の方法

本研究方法は、

(1) 着目因子が腫瘍細胞での増殖抑制や細胞移動抑制効果を示すかどうかを検証

(2) その効果が Cyclin D や c-Myc を介した機構によるものかを検証する。

その後、細胞増殖機構の発現を調整する事によって、in vivo および in vitro における抗腫瘍効果を判定する。

申請者は、着目因子を用いて、犬の線維肉腫の増殖機構を解明し、新規治療開発のための基礎的検討を行う。

4. 研究成果

犬線維肉腫の病理組織切片を用いて

Fascin-1 に対する抗体を用いて免疫化学染色を実施したところ、28例中21例で強陽性反応が得られた (図1)。

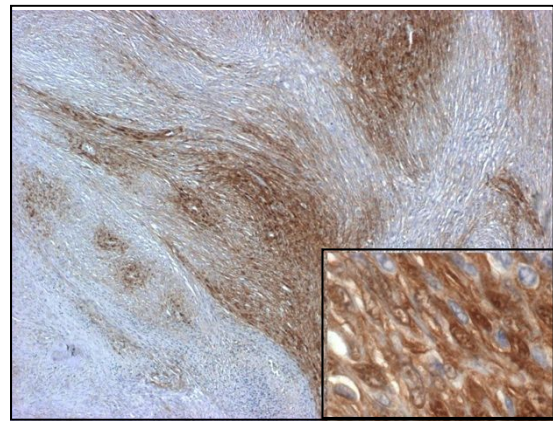


図1 線維肉腫における Fascin-1 の発現

結果を解析したところ、線維肉腫では Fascin-1 発現の有無で局所再発あるいは転移に関与することが明らかとなり予後因子となる可能性が示唆された(図2, 3)。

【再発】			
	Total Number	再発	再発までの平均日数
陽性	21	7	145.3日
陰性	7	1	329日
P=0.6334			
【転移】			
	Total Number	転移	転移までの平均日数
陽性	21	7	113.8日
陰性	7	1	88日
P=0.6334			

図2 線維肉腫における Fascin-1 の発現と生存期間

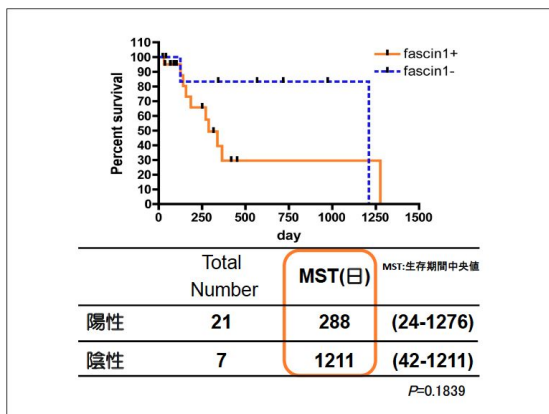


図3 線維肉腫における Fascin-1 の再発と転移

また、犬線維肉腫細胞株および人線維肉腫細胞株を用いて、ヌードマウスに対して 1×10^6 cells/head を大腿部皮下織に接種したところ、両細胞株ともに接種部位での増殖を認め、両株とも異種移植の可能な株と判明した。

さらに、犬線維肉腫細胞株においてsiRNAを用いてFascin-1の発現を抑制させたところFascin-1は10nMで浸潤が軽度に抑制されるとの結果が得られた (図4)。

【犬線維肉腫細胞株】

○ Fascin-1のノックダウン

siR-*fscn1* 濃度 10nM

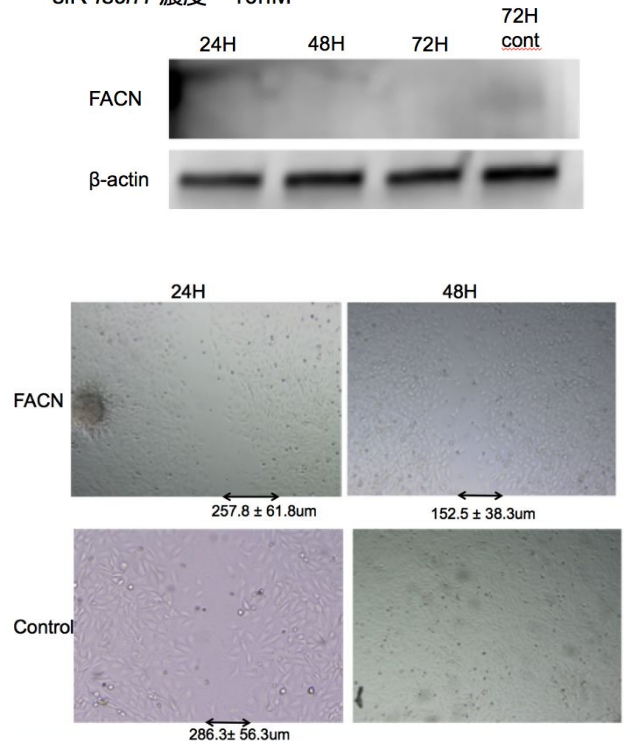


図4 犬線維肉腫株における浸潤抑制

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 麻美 (MURAKAMI, Mami)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：30597125

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()