

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16574

研究課題名(和文) スーパーアパタイトナノ粒子法を用いたmiRNAによる胆道癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment for cholangiocarcinoma with miRNA delivered by super carbonate apatite nanoparticle

研究代表者

武藤 亮 (Muto, Makoto)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：10791478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は胆道癌における腫瘍抑制性miRNAの同定とスーパーアパタイトナノ粒子法による生体内投与の有効性を示すことを目的として行われた。研究期間中では、胆管癌手術標本を用いてmiRNAマイクロアレイを実施し、胆管癌で発現が低下しているmiRNAから腫瘍抑制性miRNAの候補を絞り込んだ。候補となったmiRNAを胆管癌細胞株に導入し増殖能の評価を行った結果、miR-x1、miR-x2の投与により増殖抑制効果を認めた。当初予定していた生体内投与の有効性の検証は実施できなかったため、今後の課題である。(未発表のデータを含むので一部伏字で記載)

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の切除不能、再発胆管癌に対する抗癌剤治療は、ゲムシタピン、シスプラチンを主軸とした化学療法が中心であり、有効な治療法が限られている。本研究で胆管癌細胞株に対するmiR-x1、miR-x2の抗腫瘍効果を示したことにより、癌制御メカニズムの解明や新規抗癌治療開発に寄与し、胆管癌患者の予後を改善させる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to search the tumor suppressive miRNA of cholangiocarcinoma and to show the effectiveness of in vivo administration by super carbonate apatite nanoparticle. During the research period, the tumor suppressive miRNAs were narrowed down by miRNA microarray with cholangiocarcinoma tissue. Possible miRNAs were induced into cholangiocarcinoma cell line to evaluate proliferation ability. As a result, induction of miR-x1 and miR-x2 showed tumor suppressive effect. Further research in vitro and evaluation of in vivo administration is being planned.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：胆道癌 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

miRNA はタンパクに翻訳されない non-coding RNA のうち約 20 塩基前後の小さな RNA であり、mRNA の転写抑制により遺伝子制御を行い、正常な生命活動の維持に重要な役割を果たしている。miRNA の発現異常は細胞の異常増殖や上皮間葉移行を引き起こし、癌の増殖や転移に関わっている。そのメカニズムを利用して癌のバイオマーカーや予後予測因子としての臨床応用や、一方で癌細胞に miRNA を導入しリプログラミングすることで癌治療を行う核酸医薬品への応用の研究が進められている。しかし miRNA は易分解性で血中や間質内では不安定であり、安定した全身投与を目的とした Drug delivery system(DDS)の開発が待たれていた。

本研究で用いる新しい DDS として応用・開発されたスーパーアパタイト(Super Carbonate Apatite: sCA)ナノ粒子は、カルシウム、リン酸、重炭酸からなる 50~300nm の炭酸アパタイト(Carbonate Apatite) 粒子に、超音波刺激を加えることで 10~30nm に細粒化され、経静脈的な全身投与が可能となった。スーパーアパタイトナノ粒子に内包された miRNA は生体内で中性の環境下では安定したイオン体として存在するが、腫瘍細胞内(エンドソーム内)の酸性環境下では直ちに崩壊し内包する miRNA が細胞質へ効率よく移行する結果、mRNA の転写抑制により遺伝子制御を行うことが可能となった。

一方、胆道癌の切除不能症例、あるいは再発症例における抗癌剤治療については有効な化学療法が限られておりその予後は不良であることから、新たな治療法の開発が急務である。現在、胆道癌領域における miRNA の研究ではバイオマーカーとしての有用性を示す報告が散見されるが、治療を目的とした研究の報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では胆道癌における新規抗癌治療を目的として、治療剤となる miRNA の解析とスーパーアパタイトナノ粒子を用いた抗癌治療の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胆道癌における腫瘍制御 miRNA の同定

(2) リポフェクション法による同定 miRNA の胆道癌細胞株導入と、in vitro での抗腫瘍効果解析

(3) スーパーアパタイトナノ粒子法による胆道癌マウス皮下腫瘍への miRNA 導入と in vivo での抗腫瘍効果を解析

(4) 当該 miRNA の標的分子の探索と臨床サンプルでの発現解析

4. 研究成果

なお本研究成果は未公表のデータであるので、一部伏字として記載した。

(1) 胆道癌における腫瘍制御 miRNA の同定

miRNA マイクロアレイによる網羅的解析

胆管癌に対する手術標本を用いた miRNA マイクロアレイにより、miRNA 発現量を網羅的に解析した。正常胆管では miRNA は癌遺伝子の mRNA の転写抑制により発癌を抑制しているが、胆管癌においては miRNA の発現低下により癌遺伝子の転写異常をきたしていることが予想される。そのため、胆道癌において発現が低下している miRNA が今回の研究対象候補とした。

<結果>

手術による摘出標本から胆管癌(n=4)、正常胆管(n=4)を採取し miRNA マイクロアレイにより、発現量を比較した(図1)。胆管癌で発現の低下が認められた miRNA のうち、正常胆管に対する変動比が大きい上位の miRNA を表1に示す。このうち、これまで胆管癌での研究報告のない miR-x1、miR-x2、miR-x3、miR-x4 を研究対象の候補 miRNA とした。

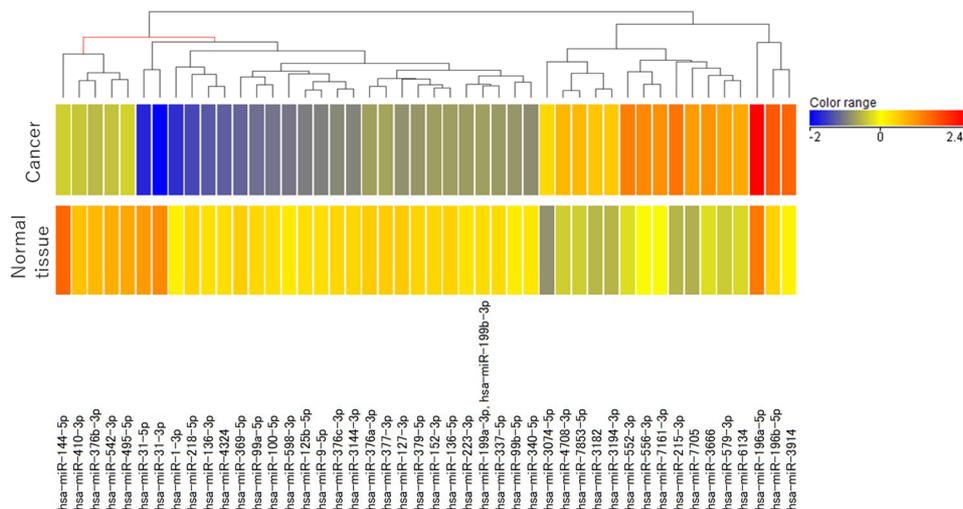


図1. miRNA マイクロアレイのクラスター解析、ヒートマップ

表1. 胆管癌で発現が低下しているmiRNA

miRNA	log ₂ FC
hsa-miR-31-3p	-3.11
hsa-miR-31-5p	-2.66
hsa-miR-218-5p	-1.89
hsa-miR-144-5p	-1.81
hsa-miR-1-3p	-1.80
hsa-miR-369-5p	-1.67
hsa-miR-136-3p	-1.61
hsa-miR-4324	-1.59
hsa-miR-99a-5p	-1.52
hsa-miR-100-5p	-1.43

FC: Fold Change

real-time PCR による miRNA の Validation

上記の4種類のmiRNAについて、新たに胆管癌(n=4)、正常胆管(n=4)に対して real-time PCR による Validation を行った。内在性コントロールには U6snRNA を用いて、U6snRNA に対する miRNA の相対発現比(Relative expression)を求めた。対象となる miRNA と内在性コントロールの Ct 値の差($Ct = Ct_{miR} - Ct_{internal\ control}$)を求め、 $Relative\ expression = 2^{-Ct}$ を計算した。1 サンプルあたり triplicate で測定を行い、胆管癌、正常胆管それぞれ4サンプルの平均値を t 検定により解析した。

< 結果 >

miR-x1(0.210±0.195 vs 1.204±0.644, p=0.025)、miR-x3(0.642±0.462 vs 1.792±0.314, p<0.001)、miR-x4(0.049±0.031 vs 0.352±0.026, p<0.001)では胆管癌で有意な発現低下を認めた(図2)。一方、miR-x2 は胆管癌で発現低下の傾向にあったが有意差は認めなかった(0.219±0.135 vs 0.474±0.312, p=0.186)。

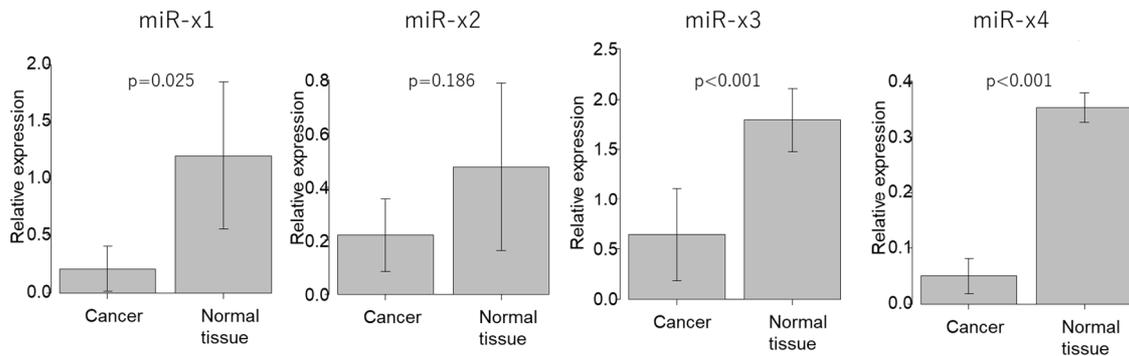


図2. 胆管癌切除標本に対する real time PCRによる Validation

(2) 胆管癌細胞株に対する miRNA 導入

候補となる miRNA の抗腫瘍効果を検証するために、胆管癌細胞株に miRNA を導入し腫瘍増殖能の評価(Proliferation assay)を行った。胆管癌細胞株は TFK-1、OZ、TYBDC-1 を用いた。miRNA mimic は miR-x1、miR-x2、miR-x3、miR-x4 と negative control mimic を使用し、LipofectamineRNAiMax を用いてリポフェクション法により細胞株に miRNA を導入した。Proliferation assay では、Cell Counting Kit-8(CCK-8)を用いて、96well プレートに 5000/well の細胞を播種し、リポフェクション後 0h, 24h, 48h, 72h の時点での 450nm の吸光度を測定した。

< 結果 >

OZではmiR-x1のリポフェクション後48h、72h、miR-x2のリポフェクション後72hでNegative control(NC)に比較して増殖の有意な抑制を認めた。TYBDC-1ではmiR-x1のリポフェクション後48h、72hで増殖の有意な低下を認めたが、miR-x2では有意差を認めなかった。TFK-1に関してはいずれのmiRNAのリポフェクションについても有意な変化を認めなかった(図3)。

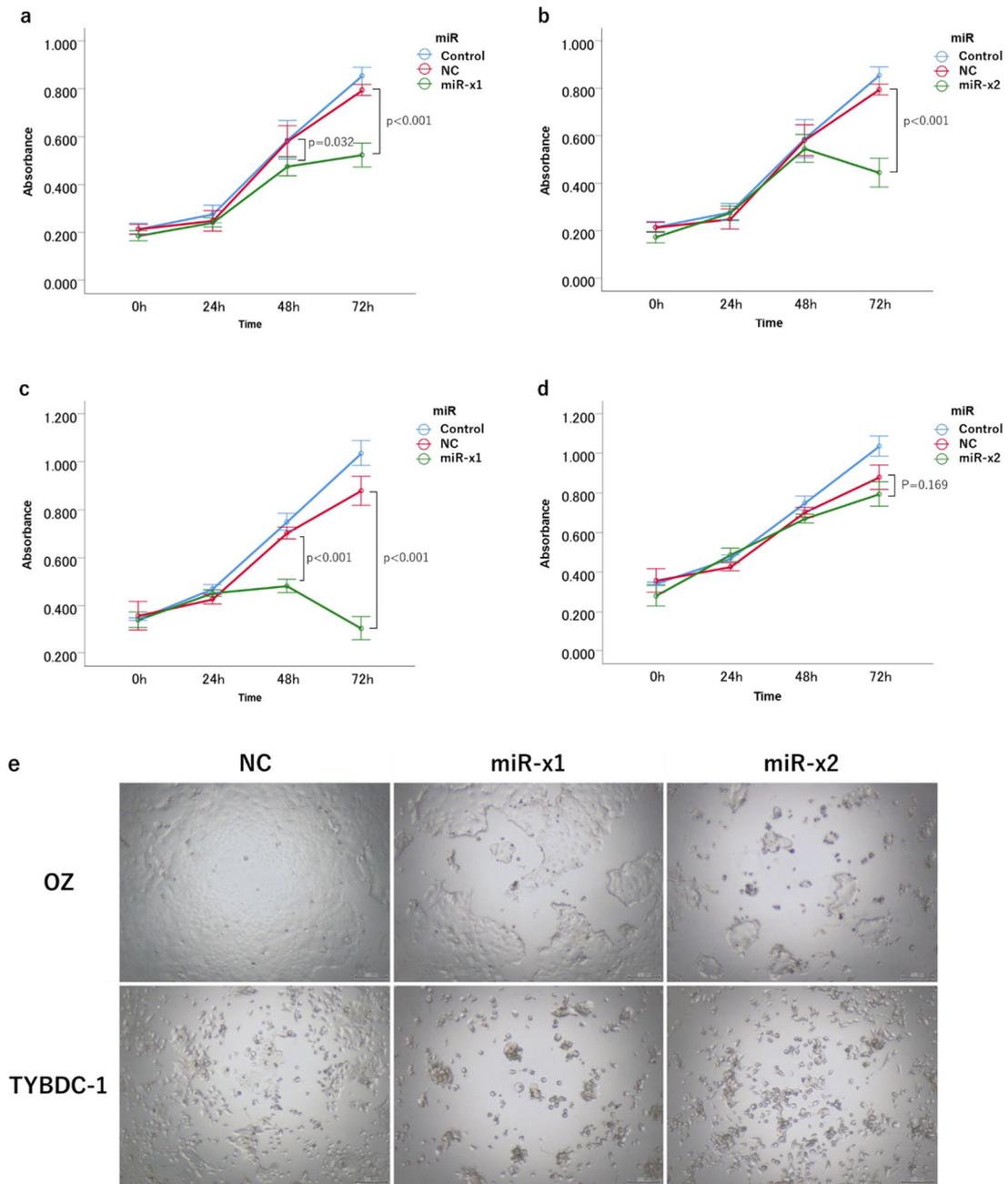


図3. Proliferation assay

(a)(b):OZ、(c)(d):TYBDC-1に対するCCK-8による測定結果
 (e):リポフェクション後72hにおける顕微鏡像(100倍)

(3) 今後の展望

胆管癌細胞株における miR-x1 投与による腫瘍増殖抑制効果を認め、miR-x2 についても可能性が示された。今後はさらに *in vitro* で浸潤能、細胞周期、アポトーシスの解析や miRNA のターゲットとなる分子の解析を行う予定である。その後に *in vivo* で胆管癌皮下腫瘍モデルマウスに対するスーパーアパタイトナノ粒子法による抗腫瘍効果の解析を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----