

平成 21年 6月 9日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580320

研究課題名（和文）siRNA を用いた小動物の腫瘍に対する治療法の開発

研究課題名（英文）Effectiveness of small interfering RNA (siRNA) against the Mcl-1 gene in a canine mammary gland tumor cell line

研究代表者

長谷川 篤彦（HASEGAWA ATSUSHIKO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：90011923

研究成果の概要：犬の乳腺腫瘍細胞株に対して、我々が解析した犬の抗アポトーシス遺伝子の塩基配列をもとに設計したリボゾーム修飾 RNAi (siRNA) を用いて細胞内の抗アポトーシス遺伝子の発現を特異的に抑制することに成功した。その結果、腫瘍細胞株のアポトーシスが誘導され、腫瘍細胞の増殖が抑制されることが確認された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：遺伝子、核酸、細胞・組織、獣医学、臨床

1. 研究開始当初の背景

近年のペットブームで、犬や猫などの伴侶動物（ペット）の飼育頭数は増加しており、それに伴い小動物の診療技術の進歩が社会的にも求められている。特に最近の犬と猫の死亡原因は、新生物（腫瘍）の割合が高く、本学部附属病院にも多くの腫瘍罹患動物が来院している。ヒトの腫瘍において、Bcl-2ファミリーの発現は腫瘍の形成や増殖および化学療法、放射線治療に対する抵抗性獲得に強く関係していると報告されている。最近ではMcl-1に対するアンチセンス法と化学療

法との併用による抗癌作用の相乗効果が報告され、臨床応用が検討されている。しかし、犬や猫の腫瘍におけるBcl-2ファミリーのアポトーシス抑制機構への関連についてはいまだ不明であり、Bcl-2ファミリー遺伝子を標的とした治療への検討もされていない。RNA interference (RNAi) 法は特定の遺伝子に対して相同性を示す2本鎖RNA (small interfering RNA: siRNA) が引き起こす強力な遺伝子発現阻害作用によって、細胞内の特定遺伝子の特異的かつ効率的に阻害する方法で、腫瘍をはじめとする疾患の治

療への応用が期待されている。そこでイヌの乳腺腫瘍細胞に対して RNAi 法を用いて *Bcl-2* ファミリー遺伝子の発現を特異的に阻害し、抗腫瘍効果について検討した。

2. 研究の目的

獣医領域でも腫瘍の化学療法および放射線療法において治療抵抗性が問題となっており、その対策が求められている。そこで、本実験では、イヌおよびネコの腫瘍細胞に対して、RNAi 法を用いて *Bcl-2* ファミリーの発現の阻害を検討する。さらにアポトーシス誘導をさせる遺伝子については、実際に RNAi を実験動物に投与して、組織移行性や毒性について検討する。

3. 研究の方法

イヌ乳腺腫瘍細胞由来株および悪性黒色腫修羅医株に対して、RNAi 法を用いて *Bcl-2* および *Mcl-1* 遺伝子に対して特異的な siRNA を合成した。陰性対照として哺乳動物遺伝子と相同性がなく RNAi 効果がないと報告されている二本鎖 RNA (Non Targeted RNA : ntRNA) を合成した。

細胞としてイヌ乳腺腫瘍由来細胞株 (CF-33) を使用し、リポフェクション法を用いて細胞内に siRNA を導入した。対照としてはリポフェクション法に用いる試薬と ntRNA を添加したもの (ntRNA)、試薬のみを添加したもの (Mock)、何も添加しないもの (Medium) を用いた。

siRNA 導入 48 時間後細胞を回収し、Real Time PCR 法と Western blot 法により *Mcl-1* の発現量と、設計した siRNA の *Bcl-2* および *Mcl-1* 遺伝子に対する特異性を調べるため *Mcl-1* と相同性の高い *Bcl-2*、*Bcl-xL*、*Bax* の発現量も比較した。

表-1RT-PCR に用いた犬の *Bcl-2* ファミリー遺伝子に特異的なプライマー

Gene	Sequence (5'-3')	Length of amplification (bp)	Accession no.
<i>Bcl-2</i>	Forward: TGG ATG ACT GAG TAC CTG AA Reverse: GGC CTA CTG ACT TCA CTT AT	206	AB116145
<i>Bcl-xL</i>	Forward: GCC TTT TTC TCC TTC GGT GG Reverse: CTC TCG GCT GCT GCA TTG TT	185	AB073983
<i>Bax</i>	Forward: GGT TGT TGC CCT CCT CTA CT Reverse: GTA AGC ACT CCA GCC ACA AA	219	AB080230
<i>Mcl-1</i>	Forward: TGT GGC CAA ACA CTT GAA GA Reverse: GTC AAA CAA AGA GGC TGG GA	120	AB093582
GAPDH	Forward: GGA GAA AGC TGC CAA ATA TG Reverse: ACC AGG AAA TGA GCT TGA CA	194	AB038240

さらに、生細胞数の測定と抗 ssDNA 抗体免疫組織染色を用いたアポトーシス細胞率の測定を行った。

4. 研究成果

siRNA 導入細胞群では対照細胞群と比較して *Bcl-2* の発現を抑制すると、*Bcl-2* 遺伝子および蛋白の発現が抑制された。

一方で *Mcl-1* の発現を抑制すると、*Mcl-1* 遺伝子および蛋白の発現が抑制された (図 1, 2)。

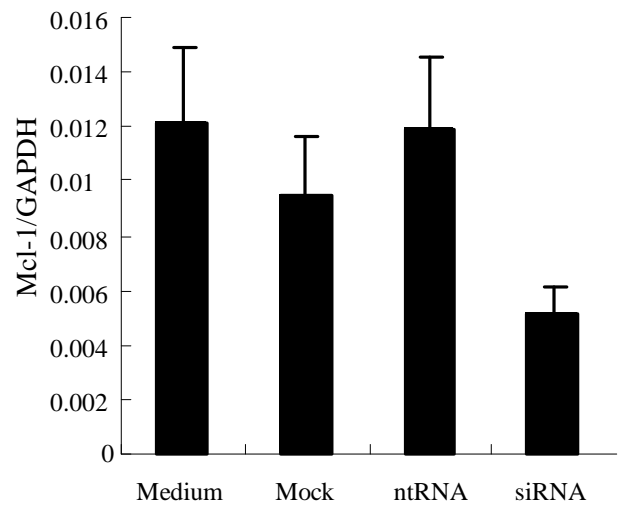


図 1 *Mcl-1* の発現の比較

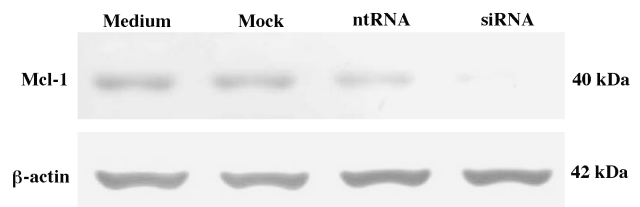


図 2 *Mcl-1* 蛋白の発現の比較

また siRNA 法で発現抑制していないアポトーシス抑制遺伝子と蛋白の発現量についても比較したが、siRNA 導入細胞群と対照細胞群の間に有意な差は認められなかった(図 3)。

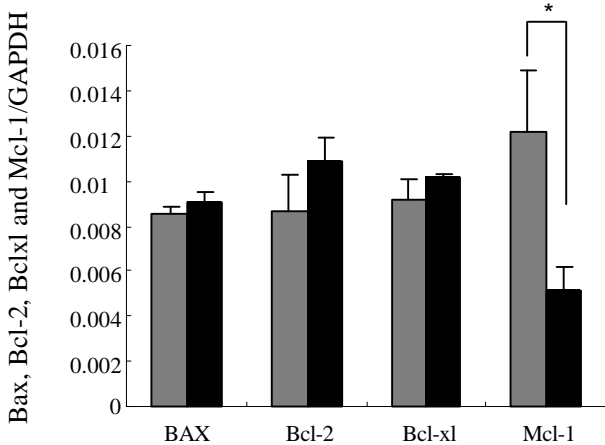


図3 *Mcl-1*の発現を特異的に抑制場合の *Bcl-2*ファミリー遺伝子発現

このことから、本法は遺伝子特異的に発現を制御することが確認された。

また生細胞数は siRNA 導入細胞群と、対照細胞群 (ntRNA、Mock、Medium) の細胞数と比較して有意に低下していた。

またアポトーシス細胞率においては siRNA 導入細胞群は、対照細胞群のアポトーシス細胞率と比較して有意に上昇していた。

Bcl-2 および *Mcl-1* 遺伝子の特異的に阻害することにより生細胞数が有意に低下し、アポトーシス率が有意に上昇したことから、イヌの *Bcl-2* および *Mcl-1* はヒトの *Bcl-2* および *Mcl-1* と同様にアポトーシス抑制機能を有する遺伝子であることが示唆された。さらに *Bcl-2* および *Mcl-1* を標的とした RNAi 法を行った結果、生細胞数の低下とアポトーシス率の上昇が認められたことから、本法が腫瘍治療に有用であると考えられた。

また *Bcl-2* および *Mcl-1* 蛋白は化学療法に対する抵抗性の獲得に関与していると考えられているので、今後はアポトーシス抑制遺伝子と化学療法との関連を検討するため抗腫瘍薬感受性の比較も行う必要があると思われる。

今回は実験動物へも siRNA を投与して、生体内における siRNA の動態および抗腫瘍効果の検討も行ないたが、残念ながら研究期間内で検討するまでには至らなかった。そ

のため、今後は実験動物における検討も行ないたいと考えている。

さらに、最近開発された *Bcl-2* ファミリー阻害薬を用いた犬の抗腫瘍効果についても研究したいと考えている。

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 3件)

Nagamatsu K, Tsuchiya F, Oguma K, Maruyama H, Kano R and Hasegawa A. (2007) The effect of small interfering RNA (siRNA) against the *Bcl-2* gene on apoptosis and chemosensitivity in a canine mammary gland tumor cell line. *Res. Vet. Sci.* 84, 49-55.

Kano R, Sato E, Okamura T, Watanabe S and Hasegawa A. (2008) Expression of *Bcl-2* in the feline lymphoma cell lines. *Vet. Clin. Pathol.* 37, 57-60.

Kano R, Yano T, Nagamatsu K, Maruyama H, Kamata H, Hasegawa A. (2009) Effectiveness of small interfering RNA (siRNA) against the *Mcl-1* gene in a canine mammary gland tumor cell line. *Res. Vet. Sci.* 87, 64-66.

[学会発表](計 2件)

小澤友美、丸山 治彦、加納 壘、長谷川 篤彦、ネコリンパ腫細胞株における抗癌剤感作時の *Bcl-2* ファミリー遺伝子の発現、第4回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2007年8月12日、京王プラザホテル

矢野 貴之、丸山 治彦、加納 壘、長谷川 篤彦、RNAi法を用いたイヌの *Mcl-1* の抗腫瘍効果について、第4回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2007年8月12日、京王プラザホテル

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 篤彦 (HASEGAWA ATSUHIKO)

東京大学・大学院農学生命研究科・名誉教授

研究者番号：90011923

(2)研究分担者

(3)連携研究者

丸山 治彦 (MARUYAMA HARUHIKO)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：60434106