

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05916

研究課題名(和文) RNase耐性microRNAを用いたイヌ血管肉腫に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for canine hemangiosarcoma using RNase-resistant microRNAs.

研究代表者

森 崇 (Mori, Takashi)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：40402218

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)：mature miR-214よりも高いヌクレアーゼ耐性を示す合成miR-214(miR-214/5AE)の抗腫瘍効果を、犬血管肉腫(HSA)モデルマウスを用いて検討した。miR-214/5AEを腹腔内投与したマウス(5AE群)は、腹腔内播種の数が有意に少なかった(数の中央値：72.5対237.5； $p < 0.05$)。5AE群は、非特異的miR群に比べて、p53と切断型カスパーゼ3の発現が増加し、Ki-67陽性細胞の割合が有意に低かった。これらの結果により、miR-214/5AEの腹腔内投与がアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制することにより、HSAモデルマウスにおいて抗腫瘍効果を示すと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA製剤開発におけるハードルのひとつは、生体内でのRNaseによる失活である。本研究で人工合成したmiR-214/5AEはRNase耐性を示すことから、生体内投与による効果が期待される。本研究で用いるアミノエチル基およびO-メチル基による化学修飾およびPassenger鎖の塩基配列の改変は、他のmiRNAにも応用可能である。そのため、本研究結果は他の疾患でのmiRNAを用いた治療に応用することができるため、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Synthetic miR-214 (miR-214/5AE), which showed higher cytotoxicity and greater nuclease resistance than mature miR-214, has been developed for clinical application. We evaluated the effects of miR-214/5AE on stage 2 HSA in a mouse model. Mice intraperitoneally administered with miR-214/5AE (5AE group) had significantly fewer intraperitoneal dissemination tumor foci (median number: 72.5 vs. 237.5; $p < 0.05$) and a lower median foci weight (0.26 g vs. 0.61 g; $p < 0.05$). Mice in the 5AE group had increased expression of p53 and cleaved caspase-3, and a significantly lower proportion of Ki-67-positive cells, than those in the non-specific miR group. These results indicate that intraperitoneal administration of miR-214/5AE exhibits antitumor effects in an intraperitoneal dissemination mouse model of HSA by inducing apoptosis and suppressing cell proliferation. These results provide a basis for future studies on the antitumor effect of miR-214/5AE for HSA.

研究分野：獣医臨床腫瘍学

キーワード：microRNA RNase resistance angiosarcoma

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、極めて予後不良であるイヌ血管肉腫細胞株において、microRNAのうち miR-214 および-126 が低発現しており、miR-214 を細胞内に導入すると、COP-1 の抑制を介してがん抑制遺伝子である p53 の発現を促進し、血管肉腫細胞株の増殖を抑制できることを発見した (Heishima, Mori, et al. PLoS One 2015)。その後、miR-214 にアミノエチル基および O-メチル基による化学修飾および Passenger 鎖の塩基配列の改変を行う (miR-214/5AE) ことで、RNase に対する耐性を認めた (Yoshikawa, Mori, et al, Vet Comp Oncol 2020)。

miRNA は細胞内に存在する 20-25 塩基ほどの非常に小さい 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 である。最近の研究では、がんをはじめとした様々な疾患に関与することが知られている (図 1)。そのため、人医学領域では、がん研究において miRNA はその重要性を急速に増している。また、miRNA はショウジョウバエからヒトまで様々な動物種で保存されており、miRNA 研究はヒトで用いられている手法をイヌにも応用可能であることが分かっている。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らが見出した血管肉腫に対するがん抑制 miRNA である miR-214 を用いて、人および犬の血管肉腫に対する臨床応用の基盤となる研究を行った。具体的には、イヌ血管肉腫腹膜播種モデルマウスを用いて、miR-214 を RNase 耐性とした人工合成 miR-214/5AE の in vivo での効果、至適投与量、投与経路、副作用について検討した。投与経路については腹腔内投与および静脈内投与とした。

3. 研究の方法

BALB/cSlc-nu/nu ノードマウスに、300 μ L の DMEM 中に 4.0×10^6 個の犬血管肉腫細胞株である Re21 細胞を右下腹部に腹腔内注射し、犬血管肉腫腹腔内播種モデルマウスを作成した。33 日後に安楽死処置を行い、血液検査および腫瘍 (マウス病巣) 数のカウントや腫瘍重量の測定を含む腹膜播種の評価が行われ、組織は組織学的検査を行なった。

4. 研究成果

miR-214/5AE を腹腔内投与したマウス (5AE 群) は、腹腔内播種の数が有意に少なく (中央値: 72.5 対 237.5 ; $p < 0.05$)、腫瘍重量中央値も低かった (0.26g 対 0.61g ; $p < 0.05$)。5AE 群のマウスは、非特異的 miR 群のマウスに比べて、p53 と cleaved caspase-3 の発現が増加し、Ki-67 陽性細胞の割合が有意に低かった。また miR-214/5AE 投与による副作用は観察されなかった。これらの結果は、HSA の腹腔内播種モデルマウスに対する miR-214/5AE の腹腔内投与が、腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制することにより、抗腫瘍効果を示したと考えられる。これらの結果は、HSA に対する miR-214/5AE の抗腫瘍効果に関する今後の研究の基盤となるものであり、また、RNA 創薬における RNase のハードルを超える一歩であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshikawa Ryutaro, Maeda Atsushi, Ueno Yoshihito, Sakai Hiroki, Kimura Shintaro, Sawadaishi Tomohiro, Kohgo Satoru, Yamada Kohei, Mori Takashi	4. 巻 46
2. 論文標題 Intraperitoneal administration of synthetic microRNA-214 elicits tumor suppression in an intraperitoneal dissemination mouse model of canine hemangiosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Research Communications	6. 最初と最後の頁 447 ~ 457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11259-021-09869-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究 分 担 者	酒井 洋樹 (Sakai Hiroki) (40283288)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------