

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14872

研究課題名(和文) イヌ腫瘍の新規診断マーカーと転移因子としてのエクソソーム分子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Exosome in Canine Tumor

研究代表者

三浦 直樹 (Miura, Naoki)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：80508036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イヌの腫瘍の診断と治療法の改善のために新規のバイオマーカーの探索を行った。特にエクソソームと呼ばれる小分子が腫瘍から分泌されることに着目した。研究ではイヌの血液からエクソソームを超遠心法と呼ばれる方法で分離抽出した。抽出したエクソソームが人で報告されているものと同じかを表面の抗原マーカーで確認した。さらに、近年、腫瘍のバイオマーカーとして注目されているマイクロRNAの分子に着目した。複数のイヌの腫瘍で特異的に発現するマイクロRNAの同定が行えた。また、エクソソーム内のマイクロRNAの発現もリアルタイムPCR方で確認できた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we seek the new molecular bio-marker for diagnosis and treatment of dog tumor. We focus specially exosome molecule which has been identified as small molecule released from tumor. We successfully isolated exosome from dog blood by ultra centrifuge. Isolated dog exosome express surface antigen as similar as human exosome. We also investigated the expression of micro RNA in dog tumor. Micro RNA has been intensively focused in human cancer biology. We can successfully identified the unique microRNAs in several dog tumor. Finally, we can measure the microRNA expression in exosome by quantitative real-time PCR.

研究分野：獣医画像診断

キーワード：マイクロRNA エクソソーム イヌ 腫瘍 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト医療と同様にイヌでも腫瘍疾患は最重要死因である。特に適切な早期診断、転移と再発の予測診断は予後を左右する最も重要な因子である。実際、転移の有無は腫瘍治療学においては非常に重要であるが、現状では画像診断による病巣検出以外の診断法は無く、細胞レベルの転移の有無は検出できない。この数年、ヒトの腫瘍学では small RNA 分子の 1 つ、microRNA が重要な役割をすることが知られている [Calin GA., Nat. Rev. Cancer. 2006]。獣医領域でも未だ少数であるが、乳腺腫瘍 [Boggs RM. *Mamm. Genome*. 2008]、メラノーマ [Noguchi S. *JVMS & Vet Comp Onc*. 2011]、リンパ腫 [Uhl E. *Genes Chrom Cancer*. 2011]に関する報告がある。研究代表者も基盤研究 B の成果として、肝細胞癌で特異的に発現変化する microRNA やメラノーマで発現上昇する microRNA を初めて発見した(肝細胞癌: 第 157 回日本獣医学会, メラノーマ: JCVIM2012, 論文リバイス中)。さらに、ヒト医療では血液癌マーカーとして microRNA が着目され、本年夏に「1 滴の血液中の microRNA を計測して、ガンを簡単に診断できる画期的な次世代診断システムの開発」が NEDD の大型プロジェクトとして発表されたのは記憶に新しい。実際にヒト医療では腫瘍特異的な血中 microRNA の報告は多くある。一方で腫瘍罹患イヌの血液中の microRNA に関する学術報告は無く、研究代表者が乳腺腫瘍で血中の microRNA-92a が増加することを報告したのみである(第 156 回日本獣医学会)。一方で、これらの microRNA がエキソソームと呼ばれる小胞体に含まれ、腫瘍を含む様々な細胞から分泌されることが知られている。分泌されたエキソソームが到達した細胞に取り込まれ遺伝子発現を変化させることも確認され、ヒト腫瘍学の新しい研究テーマとなりつつある。

本研究は、臨床で最も問題となる腫瘍(特に転移)の新規分子マーカーを獣医学に導入するものである。さらに、その新規マーカー分子(エキソソーム)を用いて転移前駆段階の病態を解明する。エキソソーム分子の small RNA を病態と結びつけるために、実際の腫瘍と細胞株を比較することで病態に特異的な分子を見つけるという挑戦は新しい試みである。さらに、実際の転移機構の一部でも発見できれば、獣医医療はもちろん、医学会にもブレークスルーを導く。

2. 研究の目的

イヌ腫瘍に関連する microRNA 解析研究(若手研究(B)H22-23)の成果である腫瘍特異的 microRNA の存在を発見させ、より詳細なイヌ腫瘍関連 microRNA の同定とエキソソームの抽出、エキソソーム含有 microRNA の検出法を確立させることが目的である。さらに、近年着目されている低酸素状況への腫瘍細胞の適応についても検討することを目的とした。達成のために以下の 4 つの大きな柱を研究する。

- (1) 複数のイヌ腫瘍で腫瘍特異的な microRNA を詳細に解析
 - (2) 各症例腫瘍から抽出したエキソソーム含有 microRNA に対する表面抗原の発現解析
 - (3) エキソソーム含有 microRNA のリアルタイム PCR 法による検出
 - (4) 低酸素培養条件(1-5%酸素濃度、通常は 21%酸素濃度で培養)で、腫瘍細胞のアポト - シス発生や治療への反応の解析
- 研究の到達目標は microRNA をイヌ腫瘍の病態解析、診断と治療のスタンダードへと確立することである。特に、メラノーマ、乳腺腫瘍、肝細胞癌、リンパ腫に関連する microRNA の選出を行い、各腫瘍の細胞株での発現変化の確認する。また、犬の腫瘍の治療法の改善(低酸素負荷と化学療法への応用

を行うために、リンパ腫の細胞株を利用して低酸素状態と化学療法治療モデルとしての可能性を検討する。

3. 研究の方法

イヌ自然発生腫瘍関連 microRNA の同定

イヌの症例から肝細胞癌、乳腺腫瘍、メラノーマを採取し、small RNAを含むRNA分子を抽出する。同時に正常な肝臓、乳腺、口腔内組織からもRNAを抽出する。抽出したRNAは精製度の確認を行い次世代シーケンス用のライブラリを作成する。ライブラリの精度の確認の後、次世代シーケンスによるRAN-Seq解析で20-25bpの核酸を中心に配列の決定を行う。得られたシーケンスリードをCLC work benchソフトで発現差、SNP、ゲノム上へのマッピングなどの解析を行う。

イヌ自然腫瘍関連microRNAの発現解析

次世代シーケンスで候補を選出し、各腫瘍でmicroRNAの発現をTaqMANプライマープローブでリアルタイムPCRで発現解析を行う。さらに、近年注目されている、より高感度に発現解析が可能なデジタルPCRで定量的に解析する。

イヌの腫瘍細胞株のmicroRNAの発現解析

肝細胞癌、メラノーマ、乳腺腫瘍の細胞株でも自然発生腫瘍と同様の方法でmicroRNAの発現解析を行う。

イヌ腫瘍症例の血液と癌性腹水からのエキソソーム分離抽出

イヌの腫瘍症例と腫瘍を発生していないコントロールのイヌの血液(血漿, 血清)から超遠心法と市販のキットを用いてエキソソームを分離抽出する。抽出したエキソソームの表面抗原の発現をウェスタンブロット法で確認する。さらに、エキソソーム中のmicroRNAの発現をリアルタイムPCRで確認する。同様のエキソソーム抽出解析を癌性腹水でも行う。

イヌ細胞株の低酸素培養の影響を確認

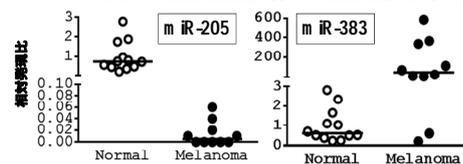
イヌリンパ腫細胞株を用いて、酸素濃度を変更(21%, 10%, 5%, 1%)して培養し、低酸素誘導遺伝子発現の確認を行う。さらに、各酸素濃度条件で培養した際の細胞の増殖能、アポトーシスの有無、抗癌剤への反応性を確認する。さらに、低酸素誘導性の抗癌剤の効果を検討する。

4. 研究成果

イヌのメラノーマ、乳腺腫瘍と肝細胞癌で次世代シーケンス解析が行えた。この結果、各腫瘍と正常組織で多数の特異的発現を示すmicroRNAを確認した。

メラノーマでは miR-205 の著しい発現低下と、miR-383 の過剰発現(同時に観察した他の腫瘍(肝細胞癌、リンパ腫、乳腺腫瘍)では上昇していなかった)を発見した

イヌメラノーマではmiR-205発現は減少し、miR-383発現は上昇している

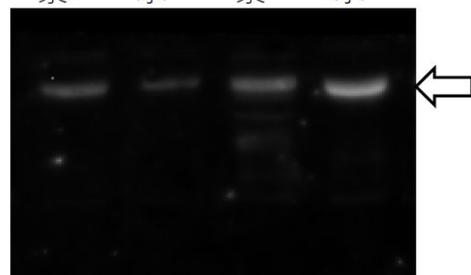


イヌ肝細胞癌ではヒト肝細胞癌と同様に miR-1 と miR-122 の発現低下を確認した。さらに、miR-1 のターゲット mRNA と考えられる c-MET 遺伝子発現が増加していること、その発現が細胞増殖速度に相関することを確認した。

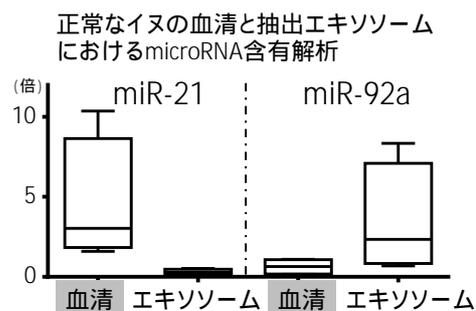
イヌの血液からエキソソームを超遠心で分離抽出した。抽出したエキソソームの表面抗原(TSG101 と CD9)の発現を確認した。

イヌエキソソームのTSG101発現解析

血漿 腹水 血漿 腹水



イヌの血液中のエキソソーム含有 microRNA の発現解析をリアルタイム PCR で行った。正常なイヌでの血清中全 microRNA とエキソソーム含有 microRNA のプロファイルが異なることからエキソソームを分離していることが確認された。



また、癌性腹水中で腫瘍関連 microRNA である microRNA-21 が増加していることを確認した。

リンパ腫の低酸素培養では、5%以下の低酸素で低酸素誘導性の遺伝子 (HIF-1 α 、VEGF など) の発現上昇とアポトーシスの抑制が観察された。この条件で低酸素誘導性の薬剤を使用することで細胞にアポトーシスを誘導すること、HIF-1 α の発現が低下することを確認した。

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 14 件)

1. Yamazaki H, Miura N, Lai YC, Takahashi M, Goto-Koshino Y, Momoi Y, Nakaichi M, Tsujimoto H, Setoguchi A, Endo Y. Effect of Toceranib Phosphate (Palladia) Monotherapy on Multidrug Resistant Lymphoma in Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. Accepted. (査読有)
2. Yamazaki H, Lai YC, Tateno M, Setoguchi A, Goto-Koshino Y, Endo Y, Nakaichi M, Tsujimoto H, Miura N. Hypoxia-activated prodrug TH-302 decreased survival rate of canine lymphoma

cells under hypoxic condition. *PLoS One*.

2017 May 10;12(5):e0177305. doi:

10.1371/journal.pone.0177305. eCollection 2017. (査読有)

3. Ong SM, Yamamoto H, Saeki K, Tanaka Y, Yoshitake R, Nishimura R, Nakagawa T. Anti-neoplastic effects of topoisomerase inhibitors in canine mammary carcinoma, melanoma, and osteosarcoma cell lines. *Jpn J Vet Res*. 65:17-28, 2017. (査読有)
4. Lai YC, Fujikawa T, Maemura T, Ando T, Kitahara G, Endo Y, Yamato O, Koiwa M, Kubota C, Miura N. Inflammation-related microRNA expression level in the bovine milk is affected by mastitis. *PLoS One*. 2017 May 17;12(5):e0177182. doi: 10.1371/journal.pone.0177182. eCollection 2017. (査読有)
5. Lai YC, Fujikawa T, Ando T, Kitahara G, Koiwa M, Kubota C, Miura N. MiR-92a as a housekeeping gene for analysis of bovine mastitis-related microRNA in milk. *J Animal Science*. In press. (査読有)
6. Yamada S, Kawaguchi H, Yamada T, Guo X, Matsuo K, Hamada T, Miura N, Tasaki T, Tanimoto A. Cholic Acid Enhances Visceral Adiposity, Atherosclerosis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Microminipigs. *J Atheroscler Thromb*. May 11. doi: 10.5551/jat.39909. 2017. (査読有)
7. 山崎 裕毅, 川畑 貴裕, 澤 真理子, 頼 昱璋, 矢吹 映, 三浦 直樹. 縦隔型 T 細胞性リンパ腫を呈した若齢犬の 1 例. *日本獣医師会雑誌* 69(6):p333-338.2016. (査読有)
8. 松永 文, 山崎裕毅, 徳永 暁, 十川 英, 瀬戸口明日香, 三浦直樹. 炎症を伴った軟部組織原発性リンパ腫の猫 2 例. *日本獣医師会雑誌* 69(12):p741-746.2016. (査

- 読有)
9. Hosokawa K, Ohnishi-Wada T, Sameshima-Kaneko H, Nagasato T, **Miura N**, Kikuchi K, Koide T, Maruyama I, Urano T. Plasminogen activator inhibitor type 1 in platelets induces thrombogenicity by increasing thrombolysis resistance under shear stress in an in-vitro flow chamber model. *Thromb Res.* 146:p69-75.2016. (査読有)
 10. Morishita S, **Kawaguchi H**, Ono T, **Miura N**, Murakoshi M, Sugiyama K, Kato H, Tanimoto A, Nishino H. Enteric lactoferrin attenuates the development of high-fat and high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Microminipigs. *Biosci Biotechnol Biochem.* 80(2):p295-303.2016. (査読有)
 11. Noguchi M, **Miura N**, Ando T, Kubota C, Hobo S, Kawaguchi H, Tanimoto A. Profiles of reproductive hormone in the microminipig during the normal estrous cycle. *In Vivo.* 2015 Jan-Feb; 29:17-22. (査読有)
 12. Otomaru K, Fujikawa T, Saito Y, Ando T, Obi T, **Miura N**, Kubota C. Diagnostic imaging of intra-abdominal cyst in heifer using the computed tomography. *Journal of Veterinary Medical Science*, Oct 1;77(9):1191-3. 2015. (査読有)
 13. Choisunirachon N, Yoshida K, Saeki K, Tanaka Y, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki N, **Nakagawa T**. Low-dose cyclophosphamide and piroxicam inhibit growth, migration, and invasion of canine oral malignant melanoma cell line. *Thai J Vet Med.* 45:381-387, 2015. (査読有)
 14. Kohyama M, Yabuki A, Kawasaki Y, **Kawaguchi H**, **Miura N**, Kitano Y,

Onitsuka T, Rahmann MM, Miyoshi N, Yamato O. GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff disease) in a mixed-breed dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 51:369-400. 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 山崎裕毅, 原口純子, 古澤 悠, 須永隆文, 十川 英, 畑井 仁, **三浦直樹**. 進行型 adenocarcinoma に対するリン酸トセラニブの臨床的有用性の検討. 平成 28 年度日本獣医がん学会、ホテルニューオータニ大阪(大阪府・大阪市)、2017.1.28-29.
2. **三浦直樹**, 頼 昱璋, 安藤貴朗, 北原豪, 小岩政照, 窪田 力. 牛乳房炎乳汁の新規バイオマーカー候補マイクロ RNA 探索、第 37 回動物臨床医学会年次大会、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)、2016.11.18-20.
3. 十川英, 須永隆文, 松尾智英, **三浦直樹**, 遠藤泰之. CT 検査が有用であった犬の肺吸虫症の 2 例、平成 28 年度日本小動物獣医学会(九州地区)、千草ホテル(福岡県・北九州市)、2016.10.16.
4. 蔵元智英, 十川英, 藤木誠, **三浦直樹**. 術中急性脳梗塞が強く疑われた犬の 1 例、平成 28 年度日本小動物獣医学会(九州地区)、千草ホテル(福岡県・北九州市)、2016.10.16.
5. 本川裕介, 乙丸孝之介, 五位塚勝利, 藤川拓郎, 斉藤靖生, 畑井仁, 安藤貴朗, **三浦直樹**, 三好宣彰, 窪田力. 黒毛和種子牛の腹部体表にみられたメラノサイトーマの一例、平成 28 年度日本産業動物獣医学会(九州地区)、千草ホテル(福岡県・北九州市)、2016.10.16.
6. 安藤貴朗, 本川裕介, 本藤川拓郎, 齋藤靖男, 乙丸孝之介, **三浦直樹**, 藤木 誠, 窪田力. 下腿骨骨折に対して髓内ピンと外固定を併用した黒毛和種子牛の一例、

- 平成28年度日本産業動物獣医学会(九州地区) 千草ホテル(福岡県・北九州市) 2016.10.16.
7. 山崎裕毅, 頼 昱璋, 立野守洋, 越野(後藤)裕子, 瀬戸口明日香, 遠藤泰之, 中市統三, 辻本 元, 三浦直樹. 犬リンパ腫における低酸素環境標的療法の開発に関する臨床的有用性の検討. 平成28年度日本獣医学会学術集会、日本大学(神奈川県・藤沢市) 2016.9.6-8.
 8. 山崎裕毅, Lai Yu-Chang, 澤真理子, 川畑貴裕, 矢吹映, 瀬戸口明日香, 三浦直樹. リン酸トラセニブとロムスチンの併用療法を試みた多剤耐性リンパ腫の犬5例. 第64回九州地区獣医師大会. メルパルク熊本(熊本県・熊本市) 2015.10.16.
 9. 山崎裕毅, Lai Yu-Chang, 瀬戸口明日香, 越野裕子, 中市統三, 辻本 元, 三浦直樹. 低酸素培養条件下の犬リンパ腫細胞における生物学的活性の解析. 第158回日本獣医学会. 北里大学獣医学部(青森県・十和田市) 2015.9.8.
 10. 山崎裕毅, 川畑貴裕, 澤真理子, Lai Yu-Chang, 矢吹映, 三浦直樹, 桃井康行. 縦隔型T細胞性リンパ腫を呈した若齢犬の1例. 第13回日本獣医がん学会. 東京コンベンションホール(東京都・中央区) 2015.7.5.
 11. 岩永朋子, 福島隆治, 永里朋香, 丸山征郎, 三浦直樹. 犬における全血血栓形成観測システム(Total Thrombus Formation System: T-TAS)を用いた血栓凝固機能検査の検討. 第11回日本獣医内科アカデミー学術大会. パシフィコ横浜(神奈川・横浜) 2015.2.20.
 12. 軸屋まお, 岩永朋子, 三浦直樹, 瀬戸口明日香, 三好宣彰, 遠藤泰之. 脳腫瘍による高ナトリウム血症を呈した猫の1例. 第11回日本獣医内科アカデミー学術大会. パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

2015.2.20.

〔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〕

ホームページ開設: <http://www.Vetmicrona.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦直樹(MIURA NAOKI)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号: 80508036

(2) 研究分担者

福島隆治(FUKUSHIMA RYUJI)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 10466922

中川貴之(NAKAGAWA TAKAYUKI)

東京大学・大学院農学生命学研究科・准教授

研究者番号: 40447363

川口博明(KAWAGUCHI HIROAKI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号: 60325777

(3) 連携研究者

なし