

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：17701  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22780283  
 研究課題名(和文)：イヌ腫瘍の新規診断マーカーmicroRNAの探索に関する研究  
 研究課題名(英文)：MicroRNA expression in the canine tumor  
 研究代表者：三浦 直樹 (MIURA NAOKI)  
 鹿児島大学・農学部・准教授  
 研究者番号：80508036

研究成果の概要(和文)：

イヌ腫瘍のmicroRNA特異的発現パターンの観察と分子マーカーとしての可能性を目的として、病理学的に確定診断されたイヌ腫瘍におけるmicroRNAの発現プロファイルを検討した。microRNAアレイ(miRCURY Array microRNA：イヌのmicroRNA配列を含む)を用いて7種類の腫瘍について発現解析を行い、今回、特に乳腺腫瘍や悪性黒色腫で特異的に変動するmicroRNAを選出した。選出されたmicroRNAについてqRT-PCRで発現変化を確認した。更に乳腺腫瘍罹患イヌの血清中でmiR-21と92aの上昇を確認した。

研究成果の概要(英文)：

A few novel microRNAs, which was up- or down- regulated in either mammary gland tumor or melanoma, were identified by the canine micro RNA microarray. The differential expression of these microRNAs was confirmed by quantitative RT-PCR. We also found that miR-21 and miR-92a had been significantly higher existing in the plasma from dog with mammary gland tumor compared to clinically healthy dog.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：獣医腫瘍学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：イヌ、microRNA、腫瘍、疾患マーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、網羅的な遺伝子発現の解析が臨床領域でも急速に広まり様々な疾患が分子病態レベルで把握されつつある。microRNAの発見は抗体が医学に応用された時のような衝撃を持って急速に基礎研究から臨床応用研究へと広がっている。microRNAはin situ且つon timeで作用し癌抑制microRNAやonco-microRNAも続々と報告され、最近マウ

スを用いた実験でmicroRNAの導入治療への可能性も示された。microRNA分子は幅広い生命現象(正常な個体発生から、生理的応答、病態の発生と転帰など)で重要な役割を果たし、(1)病態のメカニズムを遺伝子発現からタンパク質合成の調節レベルで理解できる、(2)組織病態特異性の高いmicroRNA分子が直接疾患のマーカーになる可能性がある、(3)microRNA自体が低分子であるため

治療のターゲットに成り得るという特色があり、臨床分野でも microRNA 発現や機能解析の必要性が急速に伸びている。

これまで人医領域では様々な疾患領域で病態特異的な microRNA の同定とその生理機能が報告されている。人医腫瘍領域では 2009 年に入り、腫瘍診断マーカーとしてのみではなく、予後因子、治療ターゲットとしての可能性も示唆されている。獣医領域では実験的な報告は、Boggs らが犬の正常組織と乳腺腫瘍から microRNA を同定したことを報告している 2 報のみで、詳細な研究はなされておらず、臨床応用の報告は未だない。一方、トランスレーショナルリサーチモデルとしてイヌの利用性が着目され、獣医学分野以外の腫瘍研究者からも注目されている。現在、早急な疾患特異的 microRNA の同定と臨床応用の実現化は必須の課題である。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) 犬の腫瘍 (特に乳腺腫瘍とメラノーマなど) 組織における特異的発現動態を示す microRNA をイヌ特異的 microRNA アレイで確認すること、(2) アレイの結果をこれまでのヒトの腫瘍の研究を含む様々なデータと比較解析し、腫瘍特異的変動を示すターゲットの microRNA を決定すること、(3) 選ばれたターゲットの腫瘍特異的 microRNA の腫瘍組織・血清中の発現動態を real time PCR 法にて確認することを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織サンプル採取

腫瘍組織は鹿児島大学附属動物病院で外科的に摘出、もしくはバイオプシーで採取され、病理学的に確定診断がついたものを使用した。非腫瘍サンプルは実習に供された臨床的に腫瘍が認められない犬から採取した (鹿児島大学実験動物承認番号第 A10031 号)。

### (2) 組織サンプルからの Total RNA 抽出

摘出組織は 5mm の立方体として裁断し、直ちに RNA 抽出用キット (mirVana™ miRNA Isolation Kit: Applied Biosystems) に添付された Lysis/Binding Buffer 1.5ml に混和し、氷上でホモジナイズし、12,600×g で 15 分間の遠心後、上清 300 μl を RNA 抽出まで -80°C で保存した。もしくは、採材後に直ちに RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) に混和し、4°C で約 24 時間静置した後、RNA 抽出まで -20°C で保存した。保存組織は解凍後、mirVana™ miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems) を用いて、キットに推奨されるプロトコールに従い、Total RNA を抽出し、その後解析まで -80°C で保存した。

### (3) 血清サンプル採取

血清は鹿児島大学附属動物病院で病理学

的に乳腺腫瘍と診断された 20 例の犬の乳腺腫瘍摘出前の血清、および実習に供された臨床的に腫瘍が認められない 15 例の犬の血清を使用した (鹿児島大学実験動物承認番号第 A10031 号)。静脈血 2ml を血清分離管に回収し、室温で 15 分または 4°C で数時間静置したのち、遠心し (12,600×g で 15 分間)、血清 400 μl を直ちに Total RNA 抽出に使用した。

### (4) 血清サンプルからの Total RNA 抽出

血清の RNA は mirVana™ PARIS™ Kit (Applied Biosystems) を用いて、キットに推奨されるプロトコールに従い、Total RNA を抽出し -80°C で保存した。血清サンプル中の RNA 濃度は極めて低いために、抽出サンプルの核酸濃度は測定せず、以下の反応はすべてのサンプルで統一した一定量を使用した。

### (5) 核酸濃度測定と RNA 純度・分解度の確認

RNA 抽出後、組織サンプルは、分光光度計 NanoDrop (ND-1000, Nano Drop Technologies, Wilmington, DE) または NanoPhotometer™ Pearl (IMPLEN) を用いて核酸濃度を測定した。

次に抽出 RNA はマイクロチップ型ゲル電気泳動装置 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies) を用いて、RNA の分解度と small RNA 分画の存在を評価した。

### (6) MicroRNA アレイ

microRNA アレイ解析は miRCURY™ LNA microRNA Array V 11.0 (EXIQON) を用いて、以下のサンプルの microRNA の発現解析を行った {今回のアレイには 2306 種 (イヌの microRNA として配列が確認されているものは 264 種) のプローブが設置してある}。解析は、1) 乳腺管状乳頭状癌 3 例、2) 乳腺良性混合腫 3 例、3) 悪性黒色腫 3 例、4) 扁平上皮癌、肝細胞癌、肥満細胞腫、リンパ腫、悪性末梢神経鞘腫を各 1 例、5) 正常乳腺 3 例の 17 サンプルを用いた。アレイは 2 色法で行い、各腫瘍と正常乳腺サンプルを Hy3 染色、以下に示す比較用基準サンプルを Hy5 で蛍光標識しアレイに使用した。比較用基準サンプルは乳腺管状乳頭状癌 4 サンプル、乳腺良性混合腫 4 サンプル、正常乳腺 4 サンプル、正常肝臓 3 サンプル、悪性黒色腫 3 サンプル、扁平上皮癌 1 サンプル、腺扁平上皮癌 1 サンプル、肝細胞癌 1 サンプル、肥満細胞腫 1 サンプル、リンパ腫 1 サンプル、悪性末梢神経鞘腫 1 サンプルを均等に混和したものを使用した。ハイブリダイズの手技的誤差を最小限にするため、各種 microRNA は 4 箇所異なるスポットに配置されており、各スポットで算出された発現強度の平均値をデータとして用いた。また、データのばらつきの指標として 4 箇所のスポットの発現強度の変動係数 (標準偏差/平均値×100) を算出し、変動係数が 50% 以上であった microRNA は解析から除外した。

### (7) 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

(qRT-PCR)

qRT-PCR は TaqMan microRNA を用いて、キットに推奨されるプロトコルを参考に行った。各解析 microRNA はヒトと配列が相同していることを確認の後に、ヒトの microRNA の発現解析用にデザインされた TaqMan microRNA assay kit (Applied Biosystems) を使用した。逆転写反応で生成した RT 産物は解析まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。血清も同様に逆転写反応を行ったが、PCR の鋳型となる RNA 濃度が低濃度で測定不能のため、各サンプルについてすべて同一の  $2.5\mu\text{l}$  をテンプレートとして使用した。RT 産物作成後、TaqMan<sup>®</sup> universal master mix II, no UNG、Nuclease-free water (Applied Biosystems) を用いて、リアルタイム PCR システム 7300 (Applied Biosystems) で PCR 反応を行った。PCR 反応は、 $95^{\circ}\text{C}$  で 10 分間反応させた後、 $95^{\circ}\text{C}$  15 秒、 $60^{\circ}\text{C}$  1 分間を 40 サイクルで行った。リアルタイム PCR で得られた結果は、Applied Biosystems Sequence Detection Software Version 1.4 7300stem SDS software Core Application を用いて解析した。各反応毎に増幅曲線に対して、閾値(Threshold)を設定し、サンプル個々の Ct 値を算出した。本研究では、各サンプル 2 回の Ct 値を測定し、平均を各サンプルの Ct 値とした。2 回測定した同一のサンプルの Ct 値の差が 0.5 以上あった場合は、実験手技による誤差と考え、再度 PCR 反応を実施し解析に使用した。得られた各サンプルの Ct 値から  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法を用いた相対的定量法により、サンプル間での目的遺伝子の相対発現比を比較した。内在性コントロール遺伝子として、過去の報告に従い組織では、RNU6B を、血清では miR16 を用いた。

(8) 統計解析

各アレイのシグナル強度を global Lowess 法にて補正し、各実験サンプルと比較用基準サンプルの microRNA の発現差を算出した。発現比較はスキャタープロットで視覚化し、各サンプル間での網羅的な発現パターンの類似性を樹形図による階層型クラスター解析を行った。また、1) 乳腺管状乳頭状癌、乳腺良性混合腫と正常乳腺の 3 群間、2) 悪性黒色腫と比較用基準サンプル、3) すべての腫瘍 (上述 8 種) と比較用基準サンプルについては Welch の t 検定の p-value を Benjamini and Hochberg の多重検定補正で FDR にして  $<0.05$  でフィルターをかけた解析を行なった。

qRT-PCR の各 microRNA 相対発現比の比較は、2 群間は Mann-Whitney の U 検定を、3 群間は Kruskal-Wallis 検定を行い、有意な差が認められた場合、さらにポストホックテストとして各群間は Steel-Dwass 検定により比較検討した。危険率は 5%とした。

#### 4. 研究成果

(1) すべての腫瘍と比較用基準サンプルとの microRNA 発現差のアレイ解析

両群の比較結果のスキャタープロットを図 1 に示す。両群間で Fold change が 2 倍以上であった microRNA は 4 個、統計学的に有意に変化していた microRNA は 133 個あり、fold change が 2 倍以上の 4 個の microRNA 中の 3 個は統計的にも有意な発現変動を示していた。

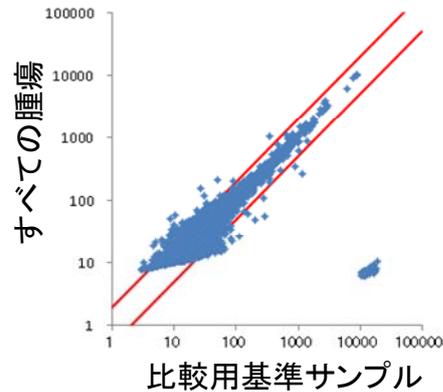


図.1 すべての腫瘍と比較用基準サンプルの発現比較

(2) 乳腺腫瘍と正常乳腺の microRNA の発現差のアレイ解析

乳腺腫瘍では乳腺管状乳頭状癌、乳腺良性混合腫と正常乳腺の 3 群間を比較した。そのスキャタープロットを図.2 に示す。

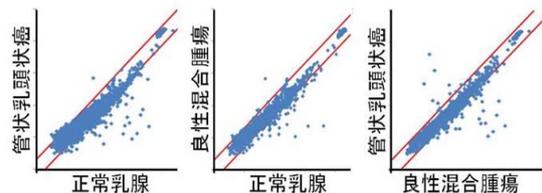


図.2 乳腺腫瘍と正常乳腺の microRNA 発現の比較

乳腺腫瘍では、悪性度に依存して microRNA の発現動態がグローバルに大きく変化した。図.2 に示すように、発現差は乳腺管状乳頭状癌と正常乳腺の間で最も大きく、乳腺管状乳頭状癌と乳腺良性混合腫の間が最も小さい。また、既に多くのヒト腫瘍で発現増加が報告されている miR-21 は両腫瘍とも増加していた。Fold change は乳腺管状乳頭状癌が乳腺良性混合腫より 2 倍以上発現上昇していた microRNA は 4 個、発現減少していたものは 7 個であり、乳腺管状乳頭状癌が正常乳腺より 2 倍以上発現上昇していた microRNA は 11 個、

発現減少していたものは1個であり、乳腺良性混合腫が正常乳腺より2倍以上発現上昇していた microRNA は8個、発現減少していたものはなかった。また、3群間の比較で統計的に有意に変化する microRNA は検出されなかった。

(3) 悪性黒色腫と比較基準用サンプルの microRNA 発現差のアレイ解析  
両群間の比較のスカッタープロットは図.3に示す。

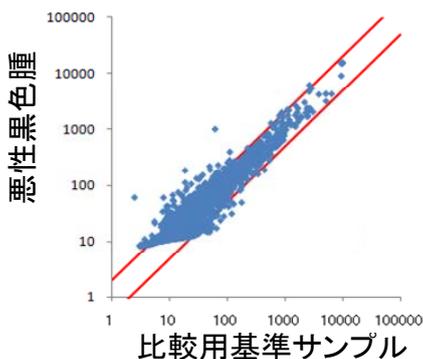


図.3 悪性黒色腫と比較用基準サンプルの発現比較

Fold change が2倍以上悪性黒色腫で増加していた microRNA は5個あり、一方、減少していた microRNA は12個あった。両サンプル間で統計学的に有意に変化していた microRNA は38個あり、fold change が2倍以上変化し、統計的にも有意であった microRNA は4個存在した。これら4個の microRNA にはこれまで、ヒトやイヌで報告されている miR-205 も含まれていた。

(4) 乳腺腫瘍組織と正常乳腺組織中の microRNA 発現差の qRT-PCR による解析  
正常乳腺6サンプルと乳腺腫瘍22サンプル(混合腫;9、管状乳頭状癌;4、複合腺腫;3、単純腺腫;2、筋上皮腫;2、複合癌と未分化癌がそれぞれ1サンプル)を用いて、ヒトやイヌの腫瘍で発現変化があるとされる miR-16, -21, -29b, -92a の発現を解析した。miR-21 と 29b は乳腺腫瘍群で有意に発現増加を示した、一方で、残りの miR-16 と 92a は有意な変化は見られなかった。さらに、アレイ解析で2倍以上乳腺腫瘍で発現が増加する microRNA から miR-146a を選択して qRT-PCR を行ったところ、やはり統計的に有意に乳腺腫瘍で発現が増加していた。

(5) 悪性黒色腫と正常口腔組織中の microRNA 発現差の qRT-PCR による解析  
悪性黒色腫と正常口腔組織のサンプル数をアレイ解析の3例から5例に増やし、qRT-PCR 解析を行った。悪性黒色腫では miR-205 や

miR-145 の著しい発現低下が見られた。最近、miR-205 はヒトメラノーマで転写因子 E2F1 を標的としメラノーマ細胞の増殖を抑制することも報告されている。同様にイヌで既に報告のある miR-145 の著しい発現低下も確認されアレイの結果の信頼性も高いと考えられた。一方で、これまでに報告のないメラノーマ特異的に発現上昇を示す microRNA も確認され、現在、細胞株での再現性の確認を行っている。

(6) 血清中の microRNA の発現変化  
本申請課題の最終的な目的はイヌの腫瘍の新規マーカーとしての microRNA の可能性を検討するものであった。今回、最も多くのサンプルが入手できた乳腺腫瘍(20例)と腫瘍の発生していないイヌ(15例)の血清で、microRNA の発現に差異があるかを qRT-PCR で検討した。その結果、miR-16 を基準として解析した結果 miR-21 と miR-92a (図.4) は乳腺腫瘍罹患イヌで有意 (Mann-Whitney 検定,  $p < 0.05$ ) に上昇していた。この結果は microRNA が血清中での腫瘍マーカーとなる可能性を示している。また、リンパ節に転移を認めた症例では転移していない症例と比較して、miR-21 が有意に上昇しており、microRNA が単に腫瘍の発生の診断マーカーとしてではなく、予後や病態の悪性度の指標マーカーとなる可能性も示された。

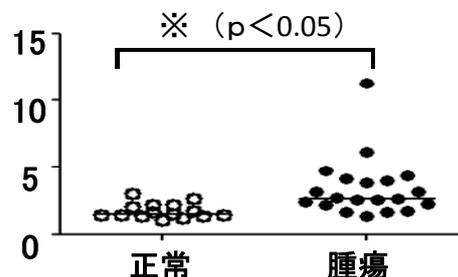


図.4 乳腺腫瘍罹患イヌと非腫瘍イヌの血清中の miR-92a の相対発現比

今後は今回のアレイの結果を解析に用いて他の腫瘍でも検討すること、乳腺腫瘍の血清 microRNA が病態マーカーとして有用であるかを再確認すること、悪性黒色腫で発現増加を示した microRNA の腫瘍特異性の検証などが必要である。

#### 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)

[学会発表] (計1件)

前村忠、三浦直樹、伊藤敏生、岩永朋子、川口博明、三好宣彰、桃井康行、犬の口腔内悪性黒色腫の発現 microRNA の網羅的解析、 JC

VIM/JSVCP 2012年次大会. 2012年2月18日.  
パシフィコ横浜 (神奈川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦直樹 (MIURA NAOKI)

鹿児島大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号 : 80508036