

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07742

研究課題名(和文) イヌ悪性メラノーマに対する化学修飾microRNA-205の治療効果

研究課題名(英文) Effects of chemically modified synthetic microRNA-205 on spontaneous canine melanoma.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、miR-205BPのイヌ自然発症悪性メラノーマに対する増殖抑制効果を検証することが目的である。最終的には局所投与9頭の組み入れを行った。局所投与の結果は9頭中4頭で完全奏効(Complete Response: CR)、1頭で部分奏効(Partial Response: PR)、1頭で安定(Stable Disease: SD)、3頭で進行(Progressive Disease: PD)であった。副作用については、投与部位、全身とも全く認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate effects of chemically modified synthetic microRNA-205 (miR-205) on spontaneous canine melanoma. A total of 9 dogs were included in this study. 4 cases obtained complete remission (CR). One case was partial response (PR), and 3 cases were stable disease (SD). 2 cases were progressive disease (PD). There were not any side effects in all cases during miR-205 treatment.

研究分野：獣医臨床腫瘍学

キーワード：microRNA melanoma dog

## 1. 研究開始当初の背景

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。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。

一方、現在新規のがん治療法は、主に分子標的治療に焦点が当てられている。中でも、siRNA や miRNA などの RNA 干渉を利用した核酸医薬は、次世代の治療薬として期待されており臨床応用に向けて盛んに研究が行われている。しかし、未だ問題は多く残されており、臨床応用の開始にはいくつかのハードルが存在する。

我々は、極めて予後不良であるイヌ口腔内悪性メラノーマにおいて、miRNA のうち miR-143, -145, -126, -200a, -203 および -205 が低発現しており、miR-145 および -205 を細胞内に導入することで、メラノーマ細胞株の増殖を抑制できることを発見した (Noguchi, Mori, et al. *J Vet Med Sci.* 2012; Noguchi, Mori, et al., *Vet Comp Oncol.* 2013)。その後、科学研究費補助金 (基盤 C) の補助を得て、miR-205 にベンゼン・ピリジン (BP) による化学修飾および Passenger 鎖の塩基配列の改変を行う (miR-205BP) ことで、RNase に対する耐性を認めた (図 1)。さらに、ヒトメラノーマ細胞株を移植したマウスに対して miR-205BP を局所投与したところ、有意に腫瘍の増殖を抑制した (図 2) (Noguchi, Mori, et al., *Mol Ther.* 2013)。

## 2. 研究の目的

本研究は、miR-205BP のイヌ自然発症悪性メラノーマに対する増殖抑制効果を検証し、microRNA (miRNA) を用いたイヌ悪性メラノーマ治療の研究基盤を確立することが目的である。

## 3. 研究の方法

自然発症イヌ悪性メラノーマに対して、

miR-205BP (図 1) を用いた臨床試験を行なう。組み入れ基準、投与量、投与方法等は、以下のとおりである。

### 組み入れ基準

標準的な治療を行なった後に再発あるいは転移を認めた症例で、飼い主に試験の同意が得られた場合とする。

### 組み入れ数

5 例から 10 例程度の試験組み入れを目標とする。

### 研究デザイン

非ランダム化、非対象試験とし、治療群のみで検討を行なう。

### エンドポイント

1 次エンドポイントは奏効率とし、投与部位の腫瘍について cRECIST v1.0 (Nguyen, et al. *Vet Comp Oncol.* 2013) の基準に従って評価を行なう。また、2 次エンドポイントを有害事象とし、VCOG-CTCAE v.1.1 (Veterinary cooperative oncology group, *Vet Comp Oncol.* 2011) の基準に従って評価を行なう。

### 投与量

miR-205BP の投与量は一回あたり 2 nmol とする。

### 投与方法

miR-205BP を Lipofectamine RNAiMAX に内包し、週一回腫瘍内に局所投与する。

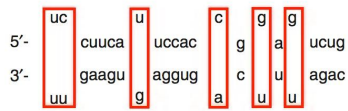
### 試験の中止

病状の進行 (PD) を認めた場合、転移にて全身状態の悪化を認めた場合、重度の有害事象を認めた場合、もしくは飼い主から中止の申し出があった場合は試験を中止する。

## 4. 研究成果

0 頭の試験組み入れを行った (表 1)。局所投与の結果 (表 2) 10 頭中 5 頭で完全奏効 (Complete Response: CR) (図 3, 4)、3 頭で安定 (Stable Disease: SD)、2 頭で進行 (Progressive Disease: PD) (図 5)であった。副作用については、投与部位、全身とも全く認めなかった。

## Wild-type miR-205



## miR-205BP

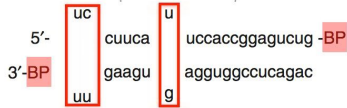


図 1. miR-205BP の構造。BP はベンゼンピリジン、囲みは Passenger 鎖のミスマッチ部を示す。

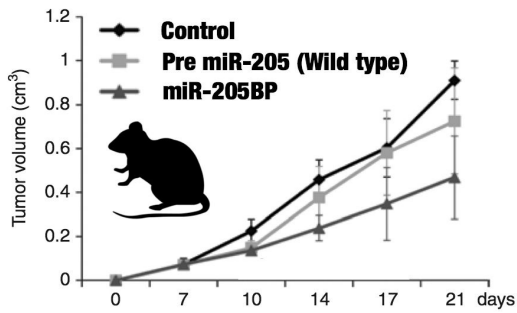


図 2. miR-205BP と wild-type とのマウス移植ヒトメラノーマ細胞株 (A2058) に対する効果比較。miR-205BP にて有意に増殖を抑制した。

Case no	Breed	Age,years	Gender	Weight,kg	Stage
Case1	Golden Retriever	12	F	32	
Case2	Mix Breed	12	SF	17	
Case3	Shetland Sheepdog	9	M	15	
Case4	Miniature Dachshund	13	CM	6	
Case5	Mix Breed	12	SF	11	
Case6	Miniature Dachshund	9	M	7	
Case7	Toy Poodle	17	F	2	
Case8	Miniature Dachshund	13	SF	5	
Case9	Miniature Dachshund	14	SF	3	
Case10	Miniature Dachshund	12	CM	3	

M,male; F,female; CM,castrated male; SF,spayed female.

表 1. 組み入れ症例一覧

Case no	Tumors location	Period for administration,days	Number of doses,times	Effect
Case1	Lym (mandibuler)	357	44	CR
Case2	Lym (ilac)	166	42	SD
Case3	Gum (mandibuler)	22	6	PD
Case4	Skin (mandibuler)	72	9	CR
Case5	Mandibuler	85	12	CR
Case6	Soft palate	435	61	CR
Case7	Hard palate	121	12	CR
Case8	Subcutaneous	13	2	PD
Case9	Maxilla	14	2	SD
Case10	Mandibuler	22	4	SD

Lym, Lymph node; CR,complete response; PR,partial response; SD,stable disease; PD,progressive disease

表 2. miR-205BP 投与効果一覧

Case No. **4**

CR

Pre

7 wks



図 3. 完全寛解となった症例 (Case 4) の投与前 (上)、と投与開始 7 週後 (下)。

Case No. **5** CR

Pre

1 wk.

6 wks.



図 4. 完全寛解となった症例 (Case 5) の投与前 (左)、と投与開始 1 週後 (中) および 6 週後 (右)。

Case No. **3** PD

Pre

3 wks.



図 5. 進行となった症例 (Case 3) の投与前 (上)、と投与開始 3 週後 (下)。

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0件)  
現在執筆中

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

酒井 洋樹 (SAKAI, Hiroki)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号： 40283288

野口 俊助 (NOGUCHI, Shunsuke)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号： 10701295