

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08107

研究課題名(和文) イヌメラノーマに対するmicroRNAを用いた個別化医療の確立

研究課題名(英文) Establishment of personalized treatment based on the expression profile of miRNAs in canine melanoma

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：しばしば放射線治療が適応される犬の口腔内メラノーマに対し、放射線治療の効果を向上させるために、放射線感受性に関わる因子の探索を行った。microRNAという微小なRNAの発現に着目し、メラノーマ培養細胞を用いて、放射線照射の前後で発現量が変化するmicroRNAを調べたところ、miR-374bの発現が放射線照射後に上昇することが分かった。miR-374bはがん抑制遺伝子のひとつであるPTENの発現を抑制することが分かり、これによりメラノーマの放射線感受性を低下させることが明らかとなった。miR-374bやPTENの発現量を調べることで、放射線治療の効果を予測できる可能性があることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬の口腔内メラノーマに対しては、しばしば放射線治療が行われるが、再発が問題となる。本研究の成果は、放射線治療の効果を向上させることにつながるものであり、放射線治療により口腔内の病変の増大を抑え、口腔内メラノーマ症例の生活の質を維持した状態で生存させることが可能となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, a factor associated with radiation sensitivity was clarified in canine oral melanoma, which is often treated with radiation therapy. This study focused on differential microRNA expressions in melanoma cells and tissues pre- and post-irradiation. As a result, the expression level of miR-374b was increased in melanoma cells after irradiation compared with them before irradiation. miR-374b targeted PTEN, a tumor-suppressor gene. Altogether, miR-374b provoked resistance to radiation in melanoma cells by suppressing the expression level of PTEN. These results indicated that miR-374b and PTEN might be promising markers predict the efficiency of radiation therapy.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：メラノーマ 放射線感受性 microRNA PTEN

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

犬口腔内メラノーマ (CoMM) はイヌの口腔内悪性腫瘍のなかで最も発生率が高く高率に転移するが、臨床ステージ あるいは では局所コントロールにより長期生存も可能である (Tuohy JL *et al.*, J Am Vet Med Assoc. 2014)。一方、臨床ステージ あるいは においても QOL の維持のためには局所コントロールが重要である。CoMM の局所コントロールにおいて、外科手術あるいは放射線治療の成功が QOL と延命効果の鍵である。それらの治療は同等の治療成績であるが (Kawabe M *et al.*, J Am Vet Med Assoc. 2015)、それぞれの治療効果を予測する分子マーカーが不明であるため、どちらの治療を選択すべきかの明確な基準はない。

### 2. 研究の目的

microRNA (miRNA) 発現解析を通じて、CoMM の症例ごとの適切な治療選択を可能にし、生存期間あるいは生活の質 (QOL) 向上を目指すことを本研究の目的とする。

CoMM の標準治療は外科手術と放射線治療あるいはそれらの併用であり、放射線感受性を規定する miRNA を明らかにし、治療法に放射線治療を選択するかどうかを症例ごとに決定することで、適切な局所コントロール法を選択できるとともに、症例の飼い主の無用な経済的負担を軽減することが可能である。

### 3. 研究の方法

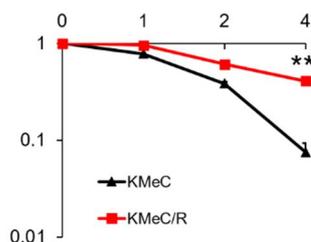
CoMM 細胞株 KMeC を用いて、放射線抵抗株を作製する。放射線照射前後で発現量が異なる miRNA を microarray を用いて探索する。放射線照射後に発現亢進する miRNA について、野生株と放射線抵抗株間および放射線照射前後で発現が変化するかを real-time PCR で検証する。

着目した miRNA の機能解析および標的遺伝子を同定する。CoMM 臨床サンプルを用いて、放射線治療前および治療後再増大時の組織において miRNA と標的遺伝子の発現の変化を real-time PCR およびウェスタンブロッティングにて検証する。

### 4. 研究成果

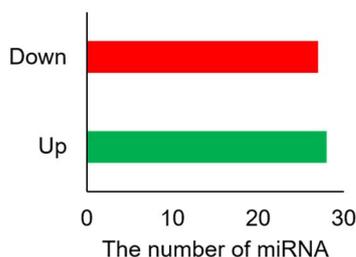
#### 放射線抵抗株の作製

KMeC 細胞株を用いて、連日放射線照射を行い、放射線抵抗株 (KMeC/R) の作製に成功した。



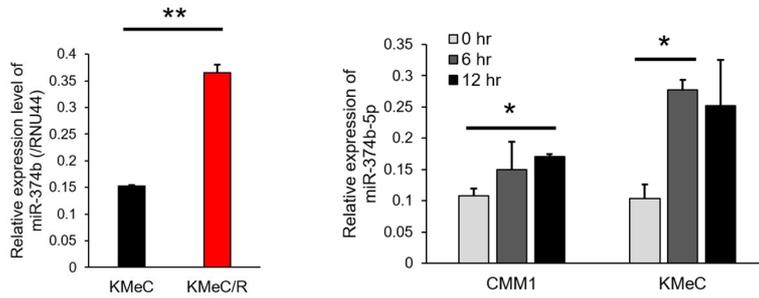
#### 放射線照射前後における microRNA microarray 解析

放射線照射後において、照射前と比較して発現低下を示す miRNA が 27 種類、発現亢進する miRNA が 28 種類認められた。



放射線抵抗性細胞株および放射線照射後に発現亢進する miRNA の real-time PCR による発現解析

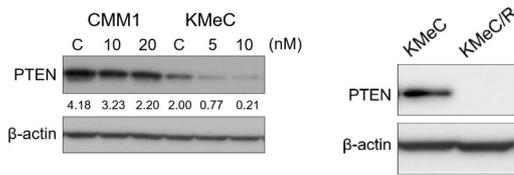
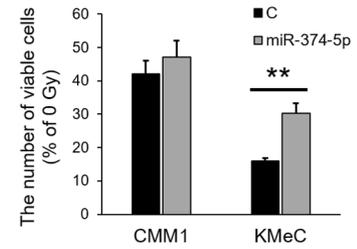
microRNA microarray において発現亢進が示唆された miRNA のうち、3 種類の miRNA に着目して real-time PCR を行ったところ、放射線抵抗性細胞株および放射線照射後の細胞において miR-374b の有意な発現亢進が認められた。



miR-374b の放射線抵抗性に対する影響

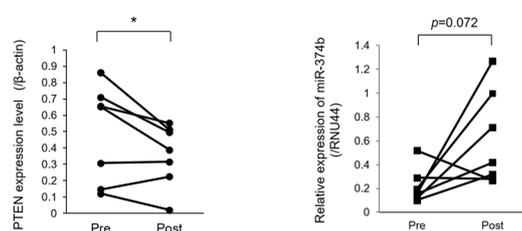
メラノーマ細胞に miR-374b をトランスフェクションにより導入すると、放射線抵抗性は有意に増強された (右図)。

また、miR-374b の導入により、がん抑制遺伝子の一種である PTEN の発現は低下し、ルシフェラーゼアッセイにより PTEN は miR-374b の標的遺伝子であることが明らかとなった。放射線抵抗性株においても、PTEN の発現低下がみられた (下図)。



CoMM 臨床サンプルにおける放射線治療前後での miR-374b および PTEN の発現

放射線照射前および放射線治療後再増大を示した時点で CoMM の組織を採取し、miR-374b 発現および PTEN のタンパク発現解析を行ったところ、PTEN においては、再増大時で有意に発現低下しており、miR-374b においては発現が上昇する傾向がみられた。



以上の結果より、CoMM において、miR-374b は PTEN の抑制を介して放射線抵抗性に関与していることが示唆された。今後は、miR-374b の発現量や PTEN の発現量と放射線治療に対する反応性 (腫瘍の縮小効果や無増悪期間) との関連を前向きに検討することにより、放射線治療前に、その効果を予測することが可能になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shunsuke Noguchi, Ryo Ogusu, Yusuke Wada, Satoshi Matsuyama, Takashi Mori	4. 巻 20
2. 論文標題 PTEN, A Target of MicroRNA-374b, Contributes to the Radiosensitivity of Canine Oral Melanoma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4631, 4631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20184631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Wada, Shunsuke Noguchi, Yuki Nishiyama, Satoshi Matsuyama, Takashi Mori, Masaya Igase, Takuya Mizuno, Shunsuke Shimamura, Terumasa Shimada	4. 巻 67
2. 論文標題 MicroRNA-205 enhances the radiosensitivity of canine oral melanoma cells by inhibiting E2F1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 151-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14943	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 和田悠佑、野口俊助、西山裕貴、松山聡、島村俊介、嶋田照雅
2. 発表標題 イヌの悪性黒色腫細胞においてmicroRNA-205は放射線感受性を増強する
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小楠 諒、野口俊助
2. 発表標題 メラノーマ細胞における放射線反応性マイクロRNA
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔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	森 崇  (Mori Takashi)  (40402218)	岐阜大学・応用生物科学部・教授    (13701)	