

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10476

研究課題名(和文) microRNA導入幹細胞による新規放射線増感法の開発

研究課題名(英文) Development of novel radiosensitizer by using mesenchymal cell-derived microRNA

研究代表者

松尾 圭朗 (Matsuo, Yoshiro)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：90749201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来間葉系幹細胞の培養確立の後、膵癌細胞株であるPanc-1細胞に対して、粒子線による照射を行った。現在実臨床で用いられている陽子線および炭素イオン線に加え、今後臨床面での実用化の期待されるヘリウムイオン線による検討も行った。コロニーフォーメーションアッセイにて、LQモデルに基づいた値、値の算出を行った。再現性の検討も行ったが再現性は良好であった。microRNAの導入に関しては、In vitroにて増感効果が見込まれた複数のmicroRNAの選定を行い、検討を行ったが、良好な導入や増感効果の評価は難しかった。トランスフェクション効率の問題を含めた諸条件にさらなる検討が必要と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでほとんど報告のないヘリウムイオン線などの複数の粒子線を用いた生存曲線を得た。今後、microRNA関連に限らず、増感剤の検討を行う際の基礎的データとして有用と考えられる。放射線増感効果の見込まれるmicroRNAを導入した幹細胞に関しては、トランスフェクション効率を含めた諸条件の検討が必要と思われた。また、照射における照射条件ごとのmicroRNAの発現変化の検討も今後の検討項目として挙げられた。

研究成果の概要(英文)：After establishing the culture methods of adipose-derived mesenchymal stem cell, Panc-1 cells were irradiated using particle beams. As particle beams, in addition to proton and carbon ion beams which currently used in clinical practice, we used also helium ion beams. In the colony formation assay, value and value were calculated based on the LQ model. The reproducibility was also examined and confirmed. Regarding the introduction of microRNA, several microRNAs were selected and examined. However, it was difficult to obtain good introduction and evaluate sensitizing effect. It was considered necessary to further study various conditions including the problem of transfection efficiency.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線増感

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、癌治療法開発の新たな潮流として、microRNA による核酸製剤の開発が盛んに行われている。microRNA はわずか 20-24 塩基程度の、タンパクをコードしない RNA で、細胞間における情報伝達および細胞内でのタンパク発現の調整に大きな役割を担っている。膵癌の放射線感受性に関わる microRNA としては miR-99b や miR-23b が発見され、これらの microRNA の腫瘍細胞への導入によって、元来放射線感受性の低い膵癌細胞に放射線感受性を付与し、照射による効果を増加させることが報告されている。従来の増感剤と比べ、microRNA の画期的な点は、標的とするタンパクをコードする mRNA に対してのみ選択的に効果を発揮するという点である。したがって、microRNA を用いた増感療法は、周囲の正常組織へ全く影響を与えることなく、膵癌細胞のみに放射線増感作用を与えることのできる、極めて高い標的性をもった治療といえる。大きな可能性を秘めた microRNA であるが、臨床応用への大きな課題として、ドラッグデリバリーの問題がある。癌細胞は周囲に繊維芽細胞や血管内皮細胞などからなる癌間質を形成しており、核酸製剤を含め、in vitro では有効な薬剤も現実には腫瘍細胞への到達が困難である。膵癌は間質成分が特に豊富な癌であり、これらの薬剤のデリバリーにはより一層の工夫が求められる。このドラッグデリバリーの問題の画期的な解決策として、われわれは間葉系幹細胞の腫瘍へのホーミング作用に着目した。間葉系幹細胞は骨髄や脂肪から採取・分離できる幹細胞で、腫瘍に集積する性質を持つことが報告されている。また、腫瘍の近傍において間葉系幹細胞は、遺伝子導入された microRNA を細胞外小胞体に内包して、腫瘍細胞へと送達・移入することも確認されている。放射線増感剤としての microRNA を間葉系幹細胞をデリバリーシステムとして用いることができれば、放射線治療やひいては近年臨床化の著しい粒子線治療において、大きなインパクトをもたらすことができると考えられた。

2. 研究の目的

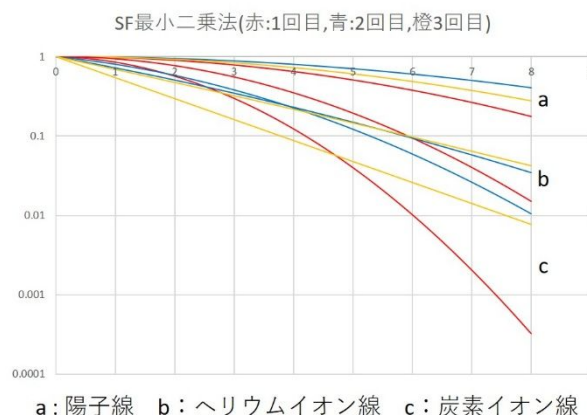
microRNA は放射線増感剤として以前より注目され、膵癌細胞株に対しても複数種類の放射線増感化を持つ microRNA が In vitro ながら報告されている。しかしながら、臨床応用にはドラッグデリバリーの問題があり、その画期的な解決策として本研究ではドラッグデリバリーに間葉系幹細胞を用いた新規放射線増感療法を提案し、その臨床応用に向けて基礎的な検討を行う。

3. 研究の方法

当研究では、間葉系幹細胞の腫瘍ホーミング作用に着目し、microRNA を遺伝子導入した幹細胞を用いた新規放射線増感療法の臨床応用に向けた基礎的な検討を行う。研究計画の進め方として、In vitro での 1. microRNA 導入幹細胞の作成、2. 膵癌細胞への microRNA デリバリーの評価、3. 膵癌細胞における放射線増感効果の確認 を行い、ひきつづき、In vivo での 1. microRNA 導入幹細胞の腫瘍ホーミング効果の確認、2. 膵癌組織への microRNA デリバリーの評価、3. 膵癌組織における放射線増感効果の確認、4. 増感機序の確認 を行う。

4. 研究成果

脂肪由来間葉系幹細胞の培養確立を行った。次いで、microRNA として、pCVM-MIR99B, pCMV-MIR101-1, pCMV-MIR144 を選別した。(いずれも Largescale で回収を行い、分光光度計を用いて濃度、純度などの確認を行っている。) 膵癌細胞株としては、Panc-1 細胞を用いた。当初は X 線による検討を予定していたが、近年の放射線治療の潮流を受けて、粒子線による検討を行った。これまで臨床実績のある陽子線、炭素イオン線治療に加え、近年実臨床応用への検討が進んでいるヘリウムイオン線についても条件を模索しながら照射実験を行った。これらの粒子線を用いて照射を行い、コロニーフォーメーションアッセイにて評価を行った。参考となる報告が極めて少なく、播種細胞数などの条件の調整に難渋したが、最終的には生存曲線を作成し、LQ モデルに基づいて、を求めた(右図)。再現性の確認も行ったが、再現性は良好であった。microRNA の導入に関しては、In vitro にて放射線増感効果が見込まれた microRNA の選定を行い (MIR99B, MIR101-1, MIR144) 検討を行ったが、良好な導入や増感効果の評価は困難であった。Transfection 効率の問題を含めた諸条件に関して、更なる検討が課題となった。ま



た、照射における照射条件ごとの microRNA 発現変化の検討も今後の課題として挙げられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	赤坂 浩亮 (Akasaka Hiroaki) (20707161)	神戸大学・医学部附属病院・特命助教 (14501)	
研究分担者	宮脇 大輔 (Miyawaki Daisuke) (30546502)	神戸大学・医学部附属病院・特命講師 (14501)	
研究分担者	犬伏 祥子(カリヤ) (Inubushi Sachiko) (60585959)	神戸大学・医学研究科・特命助教 (14501)	
研究分担者	江島 泰生 (Ejima Yasuo) (70423233)	獨協医科大学・医学部附属病院・准教授 (32203)	