

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14597

研究課題名(和文) イヌ乳腺癌の長鎖ノンコーディングRNA標的療法のためのターゲット候補RNAの探索

研究課題名(英文) Exploration of Candidate Target Long Non-Coding RNAs for Therapy of Canine Mammary Carcinoma

研究代表者

吉村 久志 (Yoshimura, Hisashi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：70645241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イヌの乳腺腫瘍における長鎖ノンコーディングRNAの発現と機能について検討した。ヒトにおいて胎生期や様々な癌で発現することの知られる長鎖ノンコーディングRNAであるH19は、イヌの乳腺癌細胞株の一部において高発現していた。siRNAを用いたH19発現のノックダウンにより、イヌ乳腺癌細胞の遊走能が低下することが、Boyden chamber assayやCell tracking assayの結果により明らかになった。また一部のイヌ乳腺癌症例の組織においても、H19の発現がみられることがrealtime RT-PCRやin situ hybridizationによって証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、医学領域ではタンパク質をコードしない1200塩基長以上のRNA、長鎖ノンコーディングRNA (long non-coding RNAs) の胎児発生や様々な疾患への関与が解明されつつあり、癌においても分子標的治療の新たなターゲットとして注目されている。獣医学領域においては、癌において長鎖ノンコーディングRNAの発現はほとんど報告されておらず、その役割などについて研究されていない。本研究では、イヌの乳腺癌において長鎖ノンコーディングRNAの一つであるH19が発現していることが初めて明らかになり、またその機能の一端も明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the expression and function of long noncoding RNAs in canine mammary tumors. H19, a long noncoding RNA known to be expressed in human embryonic stages and in various cancers, was highly expressed in some canine mammary carcinoma cell lines. The results of Boyden chamber assay and cell tracking assay revealed that knockdown of H19 expression by siRNA reduced the migratory ability of canine mammary carcinoma cells. In addition, real-time RT-PCR and in situ hybridization showed that H19 expression was also observed in some canine mammary carcinoma tissues.

研究分野：獣医病理学

キーワード：長鎖ノンコーディングRNA 乳腺腫瘍 イヌ

1. 研究開始当初の背景

近年、医学領域ではタンパク質をコードしない 200 塩基長以上の RNA、長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNAs) の胎児発生や様々な疾患への関与が解明されつつあり、癌においても分子標的治療の新たなターゲットとして注目されている。獣医学領域においては、癌において長鎖ノンコーディング RNA の発現はほとんど報告されておらず、その機能などについて研究されていない。

2. 研究の目的

イヌの乳腺癌の進行に関わる長鎖ノンコーディング RNA を同定し、核酸医薬による分子標的治療のターゲットとなり得るか、その役割や発現性について検討する。

3. 研究の方法

(1) イヌ乳腺癌細胞株における長鎖ノンコーディング RNA の発現の検討

本研究ではまずイヌ乳腺癌細胞株 6 種類 (CIPp, CTBp, CNMp, CHMp, NV-CML, NV-442L) における長鎖ノンコーディング RNA の発現レベルを、リアルタイム PCR により調べた。また癌に関連する一般的な各種遺伝子の発現レベルとの比較を行った。調べた遺伝子は、長鎖ノンコーディング RNA の H19、HOTAIR、上皮系マーカーの Ecadherin、間葉系マーカーの N-cadherin、Vimentin、S100A4、E-cadherin を直接抑制する Snail、Slug、E-cadherin を間接的に抑制する TWIST2、幹細胞マーカーの Nestin、Oct4 である。

(2) イヌ乳腺癌細胞株における長鎖ノンコーディング RNA H19 の機能の解析

上記においてイヌ乳腺癌細胞における発現が見出された長鎖ノンコーディング RNA の一つである H19 について、下記の通り *in vitro* 実験によりその機能を解析した。

H19 を高発現するイヌ乳腺癌細胞株 CIPp に、イヌの H19 長鎖ノンコーディング RNA と相補的な配列を有する small interfering RNA (siRNA) あるいはネガティブコントロールの siRNA を導入し、real-time RT-PCR により H19 発現が効果的にノックダウンされていることを確認した (図 1)。

次に、それらの細胞を用いて Boyden chamber assay を行った。すなわち、無血清培地で調整した細胞浮遊液を Boyden chamber の上層のウェルに播種し、24 時間後にウェルの底部のフィルターの開いた小孔を通して、血清添加培地が満たされた下層のウェル側に遊走した細胞数をカウントした。

さらに、同じ細胞を用いて Cell tracking assay を行った。顕微鏡撮影装置で細胞の動きを 5 分おきに 24 時間撮影し、画像解析ソフトを用いて細胞の動きを追跡し、平均の移動距離を算出した。

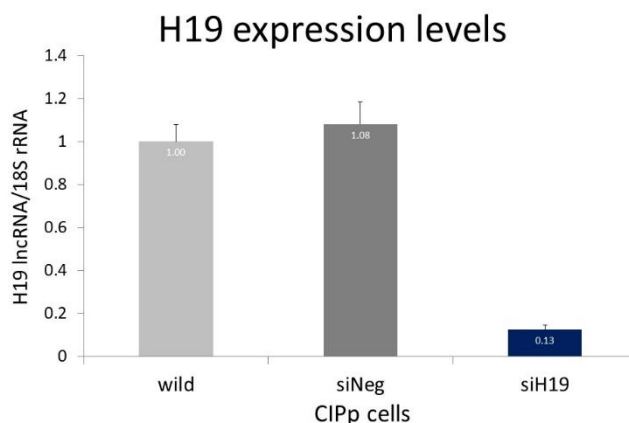


図1 イヌ乳腺癌細胞株のH19発現のノックダウン

(3) イヌの正常組織、乳腺腫瘍における長鎖ノンコーディング RNA H19 の発現の検討

上記においてイヌ乳腺癌細胞における悪性挙動への関与が示唆された長鎖ノンコーディング RNA H19 について、イヌの正常組織および乳腺腫瘍組織における発現を検討した。

病理解剖に供されたイヌの各種臓器の小片を RNA 保存液に浸漬し、凍結保存した。病理検査に供されたイヌのいくつかの乳腺腫瘍組織からも、同様に小片を凍結保存した後で、残り組織からホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を作製し、病理診断を実施した。凍結組織はビーズ式破碎装置にかけた後に、RNA 抽出を行い、cDNA を合成、リアルタイム PCR を実施した。

(4) In situ hybridization によるイヌ乳腺腫瘍組織における長鎖ノンコーディング RNA H19 の局在の検討

組織マイクロアレイ (Tissue Microarray) は数十～百を超えるパラフィン包埋組織を一枚のスライドガラスに貼り付けて免疫組織化学 (組織上で蛋白質の局在を検出する) や in situ hybridization (組織上で RNA の局在を検出する) を一度に行うことができる技術である。

本研究では 100 を超えるイヌの乳腺病理組織を 10% 緩衝ホルマリンで固定し、常法に従ってパラフィン包埋し、3～5 μ m の薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。HE 所見により、正常、過形成、良性腫瘍、悪性腫瘍、その他に分類した。その後、パラフィン包埋組織ブロックから直径数ミリのコアをくり抜き、数センチ角の寒天に並べて埋め込み、再度パラフィン包埋して組織マイクロアレイを作製した。そして組織マイクロアレイを薄切し、イヌの長鎖ノンコーディング RNA H19 を標的とした in situ hybridization に用いた。

(5) 次世代シーケンサーによるイヌ乳腺癌細胞に発現する長鎖ノンコーディング RNA の網羅的解析

イヌの高悪性度乳腺癌細胞株である CIPp と低悪性度乳腺癌細胞株である 17-442 細胞において発現する mRNA および長鎖ノンコーディング RNA について、次世代シーケンサーにより網羅的に検出したデータを解析した。CIPp は東大獣医外科学研究室でイヌの乳腺単純癌から樹立された細胞株で、細胞接着性が低く、単細胞遊走能が高い。一方で、NV-442L 細胞は当研究室においてイヌの乳腺複合癌から樹立した細胞株で、細胞接着性が高く、単細胞遊走能が非常に低い細胞株である。

4. 研究成果

(1) イヌ乳腺癌細胞株における長鎖ノンコーディング RNA の発現の検討

ヒトにおいて胎生期や様々な癌で発現することの知られる長鎖ノンコーディング RNA である H19 が、6 種類のイヌ乳腺癌細胞株のうちの CIPp で高発現していた。CIPp は上皮系マーカー E-cadherin の発現が非常にダウンレギュレートしており、代わりに間葉系マーカーの N-cadherin、Vimentin、S100A4、Snail、TWIST2、幹細胞マーカー Nestin がアップレギュレートしている細胞株である。

また癌の進展に関わる代表的な長鎖ノンコーディング RNA の 1 つである HOTAIR は、NV-CML で高発現していた。NV-CML も E-cadherin の発現がダウンレギュレートしており、N-cadherin、Vimentin、Nestin が比較的高い発現を示した。

このようにイヌの乳腺腫瘍で初めて長鎖ノンコーディング RNA の発現が確認された。特に H19 は癌の悪性度に関わる遺伝子群の発現と相関しており、癌の進展に重要な役割を果たしている可能性がある。

(2) イヌ乳腺癌細胞株における長鎖ノンコーディング RNA H19 の機能の解析

Boyden chamber assay の結果、H19 ノックダウン細胞の遊走細胞数はコントロール細胞に比べて統計学的に有意に減少した。また Cell tracking assay の結果、H19 ノックダウン細胞の移動距離はコントロール細胞に比べて統計学的に有意に短いことがわかった。このように、本研究により H19 はイヌ乳腺癌細胞の遊走能に参与している可能性があることが明らかになった。

(3) イヌの正常組織、乳腺腫瘍における長鎖ノンコーディング RNA H19 の発現の検討

リアルタイム PCR の結果として、イヌの正常組織の中では骨格筋が他に比べて著しく高い H19 の発現を示した。肝臓でも H19 が発現していた。一方で、胃粘膜、腸粘膜、膵臓、大脳組織などで H19 の発現は低値であった。イヌの乳腺腫瘍組織においては、多くの症例で H19 の発現は低値であったが、一部の症例で非常に高い H19 の発現を確認した。

(4) In situ hybridization によるイヌ乳腺腫瘍組織における長鎖ノンコーディング RNA H19 の局在の検討

作製したイヌの乳腺組織の組織マイクロアレイを用いて、イヌの長鎖ノンコーディング RNA H19 を標的とした in situ hybridization を実施したところ、少ない症例ながらも乳腺癌の癌細胞で明確な陽性像が認められた(図2)。

このようにイヌの一部の乳腺癌の癌細胞で実際に長鎖ノンコーディング RNA が発現していることが証明され、それをターゲットにした治療法を試みる価値があることが示された。

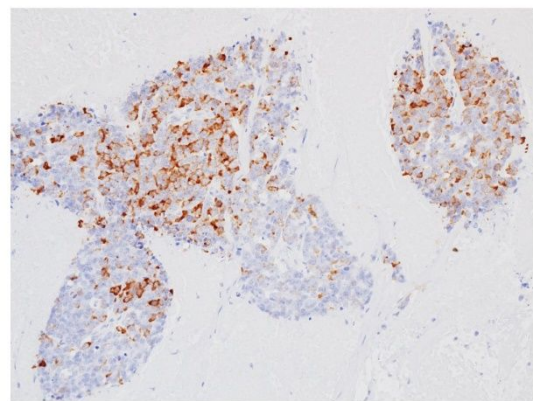


図2 イヌ乳腺癌組織におけるH19の発現

(5) 次世代シーケンサーによるイヌ乳腺癌細胞に発現する長鎖ノンコーディング RNA の網羅的解析

次世代シーケンサーによる解析の結果、mRNA では精子の形成に重要な役割を果たすことが知られる Spermatogenesis-associated protein 6 (SPATA6) 遺伝子や、細胞骨格に関連する膜結合蛋白の一つである MAGUK p55 subfamily member 2 蛋白をコードする membrane palmitoylated protein 2 (MPP2) 遺伝子が、低悪性度乳腺癌細胞株 NV-442L に比べて高悪性度乳腺癌細胞株 CIPp で高発現していることがわかった。

また2つの新規長鎖ノンコーディング RNA および2つの新規 TUCP (transcript of unknown coding potential) が、低悪性度乳腺癌細胞株 NV-442L に比べて高悪性度乳腺癌細胞株 CIPp で高発現していることがわかった。今後はこれらの RNA がイヌの乳腺癌において果たしている役割を解明することで、新たな治療標的分子の候補になるか検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Norihiko, Hirano Kazumi, Shichi Yuuki, Gomi Fujiya, Yoshimura Hisashi, Matsushita Akira, Toyoda Masashi, Ishiwata Toshiyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Gp130-Mediated STAT3 Activation Contributes to the Aggressiveness of Pancreatic Cancer through H19 Long Non-Coding RNA Expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2055 ~ 2055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14092055	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 -

1. 著者名 Yoshimura Hisashi, Moriya Maiko, Yoshida Ayaka, Yamamoto Masami, Machida Yukino, Ochiai Kazuhiko, Michishita Masaki, Nakagawa Takayuki, Matsuda Yoko, Takahashi Kimimasa, Kamiya Shinji, Ishiwata Toshiyuki	4. 巻 58
2. 論文標題 Involvement of Nestin in the Progression of Canine Mammary Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 994 ~ 1003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03009858211018656	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 -

1. 著者名 Yoshimura H, Otsuka A, Michishita M, Yamamoto M, Ashizawa M, Zushi M, Moriya M, Azakami D, Ochiai K, Matsuda Y, Ishiwata T, Kamiya S, Takahashi K.	4. 巻 56(3)
2. 論文標題 Expression and Roles of S100A4 in Anaplastic Cells of Canine Mammary Carcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 389-398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985818823772	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 -

1. 著者名 Hisashi Yoshimura, Yoko Matsuda, Masami Yamamoto, Masaki Michishita, Kimimasa Takahashi, Norihiko Sasaki, Naoshi Ishikawa, Junko Aida, Kaiyo Takubo, Tomio Arai, Toshiyuki Ishiwata.	4. 巻 98(6)
2. 論文標題 Reduced expression of the H19 long non-coding RNA inhibits pancreatic cancer metastasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 814-824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26176	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 -

1. 著者名 Norihiko Sasaki, Masashi Toyoda, Hisashi Yoshimura, Yoko Matsuda, Tomio Arai, Kaiyo Takubo, Junko Aida, Toshiyuki Ishiwata.	4. 巻 9(78)
2. 論文標題 H19 long non-coding RNA contributes to sphere formation and invasion through regulation of CD24 and integrin expression in pancreatic cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 34719-34734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26176	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐々木 紀彦, 平野 和己, 志智 優樹, 五味 不二也, 吉村 久志, 松下 晃, 板倉 陽子, 豊田 雅士, 石渡 俊行
2. 発表標題 Gp130/STAT3シグナル伝達は、長鎖ノンコーディングRNAのH19の発現を含む膵臓癌幹細胞の機能を調節する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 イヌ乳腺複合癌の腺上皮細胞由来培養細胞株の樹立とその特徴付け
2. 発表標題 松本佳奈, 渡邊由香, 岸本拓也, 吉村久志, 山本昌美
3. 学会等名 第31回日本動物看護学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村 久志, 山本 昌美, 岸本 拓也, 町田 雪乃, 道下 正貴, 落合 和彦, 中川 貴之, 松田 陽子, 高橋 公正, 石渡 俊行
2. 発表標題 犬の乳腺腫瘍におけるnest inの発現と悪性挙動への関与
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤瑠惟, 渡邊由香, 吉村久志, 山本昌美, 播谷亮, 中川貴之, 松田陽子, 石渡俊行, 神谷新司
2. 発表標題 イヌの乳腺癌細胞における長鎖non-coding RNA H19の発現
3. 学会等名 第7回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木紀彦, 豊田雅士, 吉村久志, 松田陽子, 新井富生, 坂倉陽子, 五味不二也, 相田順子, 石渡俊行
2. 発表標題 長鎖非コードRNAのH19は細胞接着を制御することでヒト膵癌細胞の転移に関わる
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村久志
2. 発表標題 第5回JCVP奨励賞受賞者講演「長鎖ノンコーディングRNA H19の膵癌における発現と役割の解明」
3. 学会等名 第6回日本獣医病理学専門家協会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------