

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580459

研究課題名(和文) イヌ口腔内悪性メラノーマに対するmicro-RNAの治療応用

研究課題名(英文) Therapeutic application of microRNA for canine oral malignant melanoma.

研究代表者

森 崇 (Mori, Takashi)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40402218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：miR-205にベンゼン・ピリジンによる化学修飾とPassenger鎖の塩基配列の改変を行い(miR-205BP)、メラノーマに対するin vitroおよびin vivoにおける抗腫瘍効果について検討した。ルシフェラーゼアッセイにてmiR-205と同様にE2F1をターゲットとした増殖抑制効果をヒトメラノーマ細胞株にて示すことを確認し、RNaseに対する耐性も認めた。また、さらに、ヒトメラノーマ細胞株移植マウスを用い、miR-205BPを腫瘍内投与したところ、抗腫瘍効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the antitumor effect in vitro and in vivo of miR-205 that was also chemically modified by benzene-pyridine and had altered passenger sequence. In in vitro experiments, transfection with the synthetic miR-205 (miR-205BP) significantly inhibited the growth of human melanoma cells. On the basis of the results of a luciferase activity assay, miR-205BP directly targeted E2F1, as did Pre-miR-205. However, miR-205BP was much more resistant to RNase than Pre-miR-205 in fetal bovine serum and to RNase in mice xenografted with human melanoma tissues. In addition, the intratumoral injection of miR-205BP exhibited a significant anti-tumor effect compared with the case of control miRNA or Pre-miR-205 in human melanoma cell-xenografted mice.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：メラノーマ マイクロRNA

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關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。

一方私達は、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.* in press; Noguchi, Mori et al., *Vet Comp Oncol.* 2013)。また、miR-143 に対してベンゼン・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ことで、その作用が増強され (Fig. 1)、かつヒト大腸癌マウス移植腫瘍に対して静脈内投与で有意な抗がん効果を認めている (Fig. 2) (Akao et al. *Cancer Gene Ther.* 2010; Noguchi, Mori et al. *Cancer Lett.* 2011)。

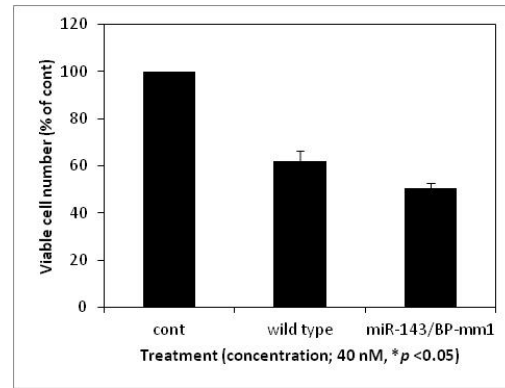


Fig. 1. 人工 miR-143 と wild-type とのヒト膀胱癌 T24 細胞の細胞増殖に対する効果比較

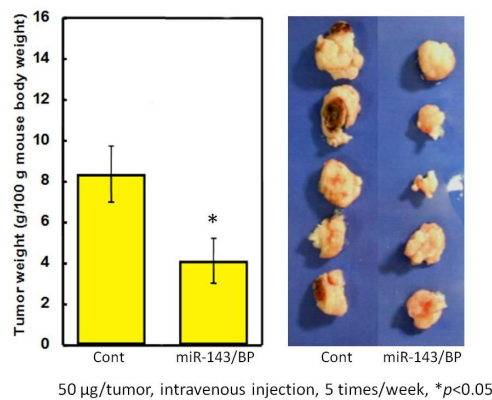


Fig. 2. ヒト大腸癌のマウス移植腫瘍に対する静脈内投与人工 miR-143 による抗がん効

2. 研究の目的

本研究計画は、私達が発見した、イヌ口腔内悪性メラノーマにおけるがん抑制 miRNA、特に *in vitro* において最も増殖抑制効果の強かった miR-205 を用いて、臨床応用へ発展するための基盤研究を行うことが目的である。

3. 研究の方法

(1) miR-205 に対し、ベンゼン・ピリジンによる化学修飾および passenger 鎖の塩基配列の改変を行い、生体に投与可能な RNase 耐性人工 miR-205 を作製し、*in vitro* での効果を検証する。

(2) ヒト悪性メラノーママウス移植株を用いて、*in vivo* における抗腫瘍効果の解析を

行う。

4. 研究成果

(1) miR-205 に対し、ベンゼン・ピリジンによる化学修飾を行った。また passenger 鎖の塩基配列の改変を行い、計8種類の化学修飾 miR-205 (miR-205BP/S1-S8) を作成した。ヒトメラノーマ細胞株を用いて、それぞれの増殖抑制作用について検討したところ、miR-205BP/S3 が最も強い増殖抑制作用を示した (Fig. 3)。

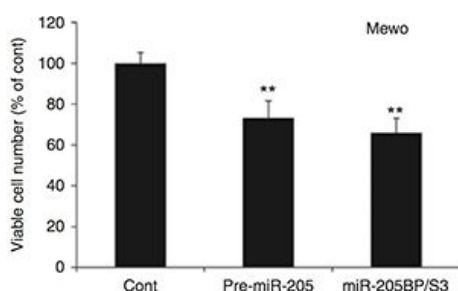


Fig. 3. 化学修飾 miR-205 のヒトメラノーマ Mewo 細胞の細胞増殖に対する効果比較

(2) miR-205BP/S3 は、ルシフェラーゼアッセイにより化学修飾をしていないPre-miR-205と同様に E2F1 をターゲットとしていることが示された。また、siRNA を用いた E2F1 のサイレンシングによって、ヒトメラノーマ細胞株の増殖抑制効果を認めた。以上から miR-205BP/S3 は、主に E2F1 を介してヒトメラノーマ細胞株の増殖抑制効果を示している可能性が示唆された。

(3) ベンゼン・ピリジンによる化学修飾は、RNase に対する安定性を向上させる。miR-205BP/S3 の RNase 耐性を調べるため、牛胎児血清に対する安定性を確認したところ、有意に miR-205BP/S3 が残存していた (Fig. 4.)。

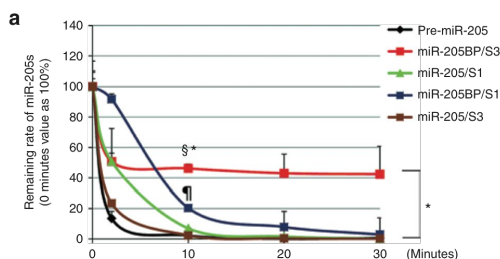


Fig. 4. 化学修飾 miR-205 のウシ胎児血清中の安定性

(4) さらに in vivo での抗腫瘍効果を調べるため、ヒトメラノーマ A2058 細胞株移植マウスを用いて試験を行った。miR-205 を腫瘍内投与したところ、miR-205BP/S3 は有意に腫瘍増殖を抑制した (Fig. 5.)。

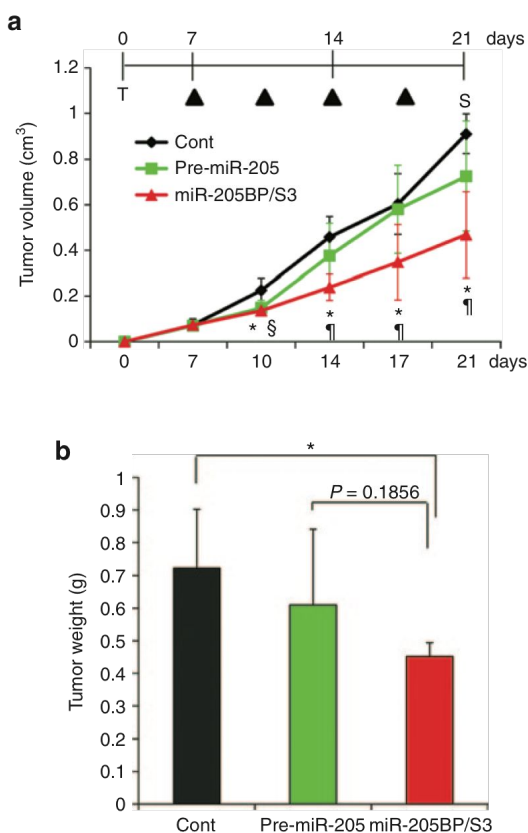


Fig. 5. 化学修飾 miR-205 のヒトメラノーマ細胞株 A2058 移植マウスに対する抗腫瘍効果。

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2件)

Noguchi, S., Kumazaki, M., Yasui, Y., Mori, T., Yamada, N., Akao, Y.: MicroRNA-203 regulates melanosome transport and tyrosinase expression in melanoma cells by targeting kinesin superfamily protein 5b, *J Invest Dermatol*, 134: 461-469, 2014, 査読有, doi: 10.1038/jid.2013.310.

Noguchi, S., Iwasaki, J., Kumazaki, M., Mori, T., Maruo, K., Sakai, H., Yamada, N., Shimada, K., Naoe, T., Kitade, Y., Akao, Y.: Chemically Modified Synthetic microRNA-205 Inhibits the Growth of Melanoma Cells In Vitro and In Vivo, *Mol Ther*, 21: 1204-1211, 2013. 査読有, doi: 10.1038/mt.2013.70.

〔学会発表〕(計2件)

森 崇, 野口俊助, 中島礼美, 北出幸夫, 赤尾幸博, 村上麻美, 丸尾幸嗣: 犬自然発生メラノーマに対する化学修飾 microRNA-205 の治療効果: 局所投与による予備的検討. 第157回日本獣医学会学術集会講演要旨集 p.480. 2014, 北海道大学 (北海道, 札幌市)

野口俊助, 森 崇, 丸尾幸嗣, 山田名美, 赤尾幸博: メラノーマに対する新規治療法としての化学修飾 microRNA-205. 第72回日本癌学会学術総会講演要旨 p.273, 2013, パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~ccc/news.html>

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・准教授

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)

山口大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 10701295

(3)連携研究者

赤尾 幸博 (Akao Yukihiro)

岐阜大学・連合創薬医薬医療情報研究科・教授

研究者番号: 00222505