

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292180

研究課題名(和文) イヌの新規腫瘍関連microRNAの同定による病態解明と臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Identification of novel canine tumor related microRNA for elucidating the pathology and clinical relevance

研究代表者

三浦 直樹 (Miura, Naoki)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：80508036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイヌの各腫瘍に特徴的な発現をするmicroRNAを確認した。肝細胞癌、乳腺腫瘍、メラノーマで次世代シーケンスによるRNA-Seq解析を行った。各腫瘍、血液、細胞株で特異的に発現するマイクロRNAをリアルタイムPCRで解析した。メラノーマではmiR-205の発現低下とmiR-383の発現上昇が見られた。肝細胞癌と培養細胞ではmiR-1とmiR-122の発現低下が確認できた。同時にmiR-1とmiR-122のターゲットのc-METとIGF1Rの発現上昇も確認した。乳腺腫瘍では悪性度に依存してmicroRNAの発現が変化した。血中miR-21はリンパ節転移と関連する可能性が認められた。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to identify the specific microRNA expression on the canine tumor. To archive this objective goal, small RNA sequence of canine hepatocellular carcinoma, mammary gland tumor, melanoma were analyzed by RNA-seq using the next-generation sequencer. In addition, selected microRNA expression were investigated by real-time PCR in both tumor tissue, blood from canine patients, and cultured cell lines. In melanoma, miR-205 was down and miR-383 was up-regulated. In hepatocellular carcinoma and its cell lines, miR-1 and miR-122 is down regulation and their target mRNA (IGF1R and c-MET) is up-regulated. In mammary gland tumor, grovel miRNA expression was changed depend on malignancy. miR-21 is also up-regulated in blood of the metastatic mammary gland tumor.

研究分野：獣医腫瘍学

キーワード：microRNA イヌ 腫瘍 次世代シーケンス 腫瘍マーカー 腫瘍治療 メラノーマ 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

国内外の状況：ヒト医療では microRNA は抗体分子が医学応用された時のような衝撃を持って急速に基礎研究から臨床応用へと広がっている。癌抑制 microRNA や癌源性 microRNA も続々と報告され、既にマウスでは microRNA の導入治療成功例も報告されるなど、microRNA は診断ツールから治療ツールへとその利用価値は高い [Bonauer A. *Science*.2009, Mendell JT. *Cell*.2009]。microRNA は 2001 年の最初の報告から、これまで 18000 以上の学術報告があるが、60% 以上は過去 2 年半に報告されている最もホットな研究分野の一つである。一方で、イヌ腫瘍における報告は Boggs らの犬の正常組織と乳腺腫瘍の microRNA の発現比較が先行し [Boggs RM. *Mamm. Genome*.2008]、Noguchi らのメラノーマ [Noguchi S. *J Vet Med Sci & Vet Comp Onc*.2011]、Uhl らのリンパ腫 [Uhl E. *Genes Chrom Cancer*.2011]、Gioia らの CLL [Gioia G. *Vet Immunol Immunopathol*.2011]、Vinall らの膀胱腫瘍 (Vinall RL. *Am J Vet Res*.2012) に関連する 6 報告のみしかない。さらにはイヌでは microRNA が血清マーカーになる報告は未だなく、臨床的に有用な microRNA の探索は非常に重要である。

これまでの研究でイヌの腫瘍においても microRNA の腫瘍特異的発現の存在は示されている。しかし、現在までイヌの microRNA 配列はヒトやマウス (哺乳類では 1300 種類程度の microRNA が存在する) に比べて 1/3 以下しか配列が確認されていない。それゆえに、アレイ上でヒトやマウスで病態との関連が報告されている microRNA と相同するイヌの microRNA の確認ができていないものもあり、全てのイヌ固有の microRNA の発現解析がカバーされていない。次世代シーケンサーでイヌの全 microRNA の配列が同定できれば、新規同定した microRNA も病態解明の新しいツールとして利用でき、さらに microRNA の

臨床応用の現実性が飛躍的に前進することは明白である。

一方、がん遺伝子 p53 は既に遺伝子導入による治療効果がヒト医療で示され、イヌでもその可能性は示唆されている [Kanaya N. *J Vet Med Sci*.2011]。ヒトの microRNA と p53 に関連する研究は多くあるが [Hermeking H. *Nat Rev Cancer*.2012]、イヌ腫瘍における microRNA と p53 に関連した報告はない。イヌでも p53 遺伝子治療は興味深いテーマであり、新規に発見した腫瘍関連 microRNA との関連性はヒト医療領域でも重要である。また、治療という観点ではリンパ腫の化学療法は最も成功している治療である。一方で薬剤耐性の問題は大きい。近年、低酸素状況と腫瘍の関連性やそれに伴う治療法の改善も勧められており、獣医領域での応用性もある。

2. 研究の目的

イヌ腫瘍 microRNA の病態解明のツールとしての確立、さらに臨床応用 (早期発見、転移の有無の確認、治療への反応性確認、治療ターゲットの探索) の達成が目的である。そのために、1) イヌの未同定 microRNA 配列の確認 (正常組織、腫瘍組織)、2) 各腫瘍 (メラノーマ、乳腺腫瘍、肝細胞癌、リンパ腫) 関連 microRNA の選出、3) 腫瘍特異的 microRNA の腫瘍細胞株での発現変化の確認、4) 犬の腫瘍の治療法の改善 (低酸素負荷と化学療法、p53 遺伝子導入) への応用を行う。

研究の究極のゴールは microRNA をイヌ腫瘍の病態解析、診断と治療のスタンダードへと確立することである。そのために各腫瘍における microRNA の特徴的な発現を観察する。さらに、リンパ腫は抗癌剤の治療が最も成功している腫瘍であると同時にヒトとイヌの双方で microRNA の解析も進んでいる。本研究ではリンパ腫の細胞株を利用して低酸素状態と化学療法治療モデルとしての可能性を検討する。

3. 研究の方法

イヌ腫瘍関連 microRNA の同定

腫瘍（肝細胞癌、乳腺腫瘍、メラノーマ）と正常組織（肝臓、乳腺、口腔内組織）からRNAを抽出する。抽出したRNAは精製度の確認を行い次世代シーケンス用のライブラリを作成する。ライブラリの精度の確認の後、次世代シーケンスによるRNA-Seq解析で20-25bpの核酸を中心に配列の決定を行う。

イヌ腫瘍関連microRNAの発現解析

病理学的に確定診断がなされた肝細胞癌、リンパ腫、メラノーマ、乳腺腫瘍からRNAを抽出する。マイクロRNAの発現はTaqMANプライマープローブを用いてリアルタイムPCRで発現解析を行う。同時に同じ症例から血液を採取して血清中と血漿中のRNAも抽出する。抽出したRNAは組織と同様にリアルタイムPCRで発現を解析する。特に有用な変化を示すmicroRNAはデジタルPCRで定量的に解析する。

イヌ腫瘍細胞株のmicroRNAの発現解析

肝細胞癌、メラノーマ、リンパ腫の細胞株の培養法は確立している。これらの細胞株で実験と同様の方法でmicroRNAの発現解析を行う。

イヌ細胞株の低酸素培養の影響を確認

リンパ腫の細胞株で、21%、10%、5%、1%と酸素濃度を変更して培養する。各条件での低酸素誘導遺伝子発現の確認を行う。さらに、各酸素濃度条件で培養した際の細胞の増殖能、アポトーシスの有無、抗癌剤への反応性を確認する。低酸素誘導性の抗癌剤を使用してその効果を検討する。

p53遺伝子導入ベクターの開発と遺伝子治療の応用性の検討

ヒトのp53遺伝子導入ウイルスベクターを作成して、それらの効率的な細胞への導入を検討する。

4. 研究成果

イヌ腫瘍の中でメラノーマ、乳腺腫瘍と肝

細胞癌とその腫瘍に対応する正常組織（肝臓、乳腺、口腔内組織）で各グループ3例の個別の個体から得られたサンプルで次世代シーケンス解析が行えた。各シーケンスにはユニークな配列が多数含まれているが現在、イヌのmicroRNAとして同定できるかゲノムシーケンスに対応させて検討している。同時に各腫瘍と正常組織で多数の特異的発現を示すmicroRNAを確認した。

乳腺腫瘍では次世代シーケンスの前にアレイ解析を行った。その結果では2倍以上の発現差が乳腺管状乳頭状癌と正常乳腺の比較で245個、乳腺良性混合腫と正常乳腺では75個と、悪性度に依存してmicroRNAの発現が大きく変化することを認めた。さらに、血中miR-21はリンパ節転移を認めた症例で上昇する傾向が認められた。

メラノーマではmiR-205の著しい発現低下とmiR-383の過剰発現が見られた。miR-383に関しては同時に比較した他の肝細胞癌、リンパ腫、乳腺腫瘍では上昇していなかった。

肝細胞癌ではヒト肝細胞癌でも報告されているmiR-1とmiR-122の発現低下を確認した。イヌ肝細胞癌細胞株でもmiR-1とmiR-122の発現低下が確認できた。同時にmiR-1とmiR-122のターゲットmRNAと考えられるc-METとIGF1Rの遺伝子発現が増加していることも確認した。

リンパ腫の低酸素培養では、5%以下の低酸素で培養すると、低酸素誘導性の遺伝子（HIF-1、VEGFなど）の発現上昇が見られた。同時に細胞の増殖が増加し、アポトーシスの抑制も観察された。さらに、抗癌剤（ドキソルビシン）の治療に対して低酸素培養では正常酸素培養に比較して耐性を持つことを確認した。この条件で低酸素誘導性の薬剤を使用することで細胞にアポトーシスを誘導すること、HIF-1の発現が低下することを確認した。

ヒトp53遺伝子導入用のウイルスベクター

の作成に成功したが、実験期間内に細胞での導入法は確立できなかった。

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 17 件)

1. Kohyama M, Yabuki A, Kawasaki Y, Kawaguchi H, Miura N, Kitano Y, Onitsuka T, Rahmann MM, Miyoshi N, Yamato O. GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff disease) in a mixed-breed dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. 51:369-400. 2015. (査読有)
2. Nakajima Y, Kanno T, Nagaya T, Kuribayashi K, Nakano T, Gotoh A, Nishizaki T. Adenosine Deaminase Inhibitor EHNA Exhibits a Potent Anticancer Effect Against Malignant Pleural Mesothelioma. *Cell Physiol Biochem*. 35:51-60. 2015. (査読有)
3. Nagaya H, Nakagawa Y, Gotoh A. Repositioned alpha-1 adrenoceptor blockers as anti-tumor drugs. *Personalized Medicine Universe*. 4:23-26. 2015. (査読有)
4. Miyata T, Yoshimatsu T, So T, Oyama T, Uramoto H, Osaki T, Nakanishi R, Tanaka F, Nagaya H, Gotoh A. Cancer stem cell markers in lung cancer. *Personalized Medicine Universe*. 4:40-45. 2015. (査読有)
5. Fujita H, Yagishita N, Aratani S, Saito-Fujita T, Morota S, Yamano Y, Hansson MJ, Inazu M, Kokuba H, Sudo K, Sato E, Kawahara KI, Nakajima F, Hasegawa D, Higuchi I, Sato T, Araya N, Usui C, Nishioka K, Nakatani Y, Maruyama I, Usui M, Hara N, Uchino H, Elmer E, Nishioka K, Nakajima T. The E3 ligase synoviolin controls body weight and mitochondrial biogenesis through negative regulation of PGC-1. *EMBO J*. e201489897. 2015. (査読有)
6. Miura N, Kucho K, Noguchi M, Miyoshi N, Uchiumi T, Kawaguchi H, Tanimoto A. Comparison of the Genomic Sequence of the Microminipig, a Novel Breed of Swine, with a Genomic Database for Conventional Pig. *In Vivo*. 28:1107-11. 2014. (査読有)
7. Murata D, Sogawa T, Tokunaga S, Iwanaga T, Kawaguchi H, Miyoshi N, Momoi Y, Fujiki M, Miura N. Ganglion cysts arising from a canine stifle joint. *J Vet Med Sci*. 76: 457-459. 2014. (査読有)
8. Kaku Y, Nagaya H, Tsuchiya A, Kanno T, Gotoh A, Tanaka A, Shimizu T, Nakao S, Tabata C, Nakano T, Nishizaki T. Newly synthesized anticancer drug HUHS1015 is effective on malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci*. 105:883-889. 2014. (査読有)
9. Mikami K, Nagaya H, Gotoh A, Kanno T, Tsuchiya A, Nakano T, Nishizaki T. Naftopidil Is Useful for the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma. *Pharmacology*. 94:163-69. 2014. (査読有)
10. Tasaki Y, Miura N, Iyori K, Nishifuji K, Endo Y, Momoi Y. Generalized Alopecia with Vasculitis-Like Changes in a Dog with Babesiosis. *J Vet Med Sci*. 75:1367-1369. 2013. (査読有)
11. Miura N, Furukawa M, Magari Y, Momoi Y. Cross-Reactivity of the Anti-Human D-Dimer Monoclonal Antibody 1C9-6F10 to Canine Fibrin Degradation Products. *J Vet Med Sci*. 75:963-966. 2013. (査読有)

12. Miura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Yamada T, Ito T, Izumi H, Shameshima H, Miyoshi N, Tanimoto A, Maruyama I. Coagulation activity and white thrombus formation in the micromini pig. *In vivo*. 27:357-361. 2013. (査読有)
13. Nagaya H, Gotoh A, Kanno T, Nishizaki T. A3 Adenosine receptor mediates apoptosis in in vitro RCC4-VHL human renal cancer cells by up-regulating AMID expression. *J Urol*. 189:321-328. 2013. (査読有)
14. Kaneko N, Gotoh A, Okamura N, Matsuo EI, Terao S, Watanabe M, Yamada Y, Hamami G, Nakamura T, Ikekita M, Okumura K, Nishimura O. Potential tumor markers of renal cell carcinoma: -Enolase for postoperative follow up, and galectin-1 and galectin-3 for primary detection. *Int J Urol*. 20:530- 535.2013. (査読有)
15. Gotoh A, Nagaya H, Kanno T, Tagawa M, Nishizaki T. Fiber-substituted conditionally replicating adenovirus Ad5F35 induces oncolysis of human bladder cancer cells in in vitro analysis. *Urology*. 81:920.e7-11.2013. (査読有)
16. Masachika E, Kanno T, Nakano T, Gotoh A, Nishizaki T. Naftopidil induces apoptosis in malignant mesothelioma cell lines independently of 1-adrenoceptor blocking. *Anticancer Res*. 33:887-942.2013. (査読有)
17. Nakahara M, Ito T, Kawahara K, Yamamoto M, Nagasato T, Shrestha B, Yamada S, Miyauchi T, Higuchi K, Takenaka T, Yasuda T, Matsunaga A, Kakihana Y, Hashiguchi T, Kanmura Y, Maruyama I. Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism. *PLoS One*.8:e75961. 2013. (査読有)
- [学会発表](計12件)
- 第13回日本獣医がん学会. 山崎裕毅、川畑貴裕、澤真理子、Lai Yu-Chang、矢吹映、三浦直樹、桃井康行. 縦隔型T細胞性リンパ腫を呈した若齢犬の1例. 東京コンベンションホール(東京都・中央区) 2015.7.5.
 - 第158回日本獣医学会. 山崎裕毅、Lai Yu-Chang、瀬戸口明日香、越野裕子、中市統三、辻本 元、三浦直樹. 低酸素培養条件下の犬リンパ腫細胞における生物学的活性の解析. 北里大学獣医学部(青森県・十和田市) 2015.9.8.
 - 第64回九州地区獣医師大会. 山崎裕毅、Lai Yu-Chang、澤真理子、川畑貴裕、矢吹映、瀬戸口明日香、三浦直樹. リン酸トラセニブとロムスチンの併用療法を試みた多剤耐性リンパ腫の犬5例. メルパルク熊本(熊本県・熊本市) 2015.10.16.
 - 第11回日本獣医内科アカデミー学術大会. 犬における全血血栓形成観測システム(Total Thrombus Formation System : T-TAS)を用いた血栓凝固機能検査の検討. 岩永朋子、福島隆治、永里朋香、丸山征郎、三浦直樹. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2015.2.20.
 - 第11回日本獣医内科アカデミー学術大会、脳腫瘍による高ナトリウム血症を呈した猫の1例. 軸屋まお、岩永朋子、三浦直樹、瀬戸口明日香、三好宣彰、遠藤泰之. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2015.2.20.
 - 第21回国際個別化医療学会学術集会. ナフトピジルの新規抗がん剤としての

- 適応拡大に関する研究. 中村安澄、長屋寿雄、中川佑介、宮田剛彰、小山倫浩、松本浩彦、**後藤章暢**. ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪府・大阪) 2015.10.17
7. 第74回日本癌学会学術総会. 肺腺癌における癌幹細胞マーカー(ALDH1)と腫瘍マーカー(CEA)の臨床的意義. 宮田剛彰、吉松 隆、宗 哲哉、小山倫浩、長屋寿雄、**後藤章暢**. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) 2015.10.8
8. 第74回日本癌学会学術総会. ドラッグリポジショニング法を用いた新規抗がん剤の開発(Development of the new anti-cancer drug using drug repositioning methods.) 長屋寿雄、中川佑介、馬淵美雪、宮田剛彰、小山倫浩、松本浩彦、**後藤章暢**. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) 2015.10.8
9. 第38回日本分子生物学会年会第88回生化学会大会合同大会. 細胞外ヒストンにおけるIL-1 放出機構の解明. 大池加恵、勝野涼太、藤本靖真、安田 哲、**丸山征郎**、**川原幸一**. 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市) 2015.12.3
10. 第157回日本獣医学会、犬の肝細胞癌特異的microRNAの発現変化解析. 片野田祐介、川口博明、岩永朋子、三好宣彰、桃井康行、**三浦直樹**. 北海道大学(北海道・札幌市) 2014.9.11.
11. 第73回日本癌学会学術総会. Evaluations of Aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1) immunoreactivity in human lung adenocarcinoma(肺腺癌におけるアルデヒド脱水素酵素1発現の意義). Oyama T, Uramoto H, Shinohara S, Nagata Y, So T, Nagaya H, **Gotoh A**, So T, Miyata T, Yoshimatsu T, Osaki T, Nakanishi R, Tanaka F. パシフィコ横浜(神奈川・横浜) 2014.9.25.
12. 第73回日本癌学会学術総会. A.Development of the newly anticancer drug for human bladder cancer(膀胱癌に対する新規抗癌剤の研究) Nakagawa Y, Nagaya H, Mabuchi M, Miyata T, Matsumoto H, Oyama T, **Gotoh A**. パシフィコ横浜(神奈川・横浜) 2014.9.25
- [図書](計0件)
[産業財産権]
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)
[その他]
ホームページ開設: <http://www.Vetmicrona.com/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
三浦直樹(MIURA NAOKI)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授
研究者番号: 80508036
- (2)研究分担者
後藤章暢(GOTOH AKINOBU)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70283885
- 丸山征郎(MARUYAMA IKUROU)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授
研究者番号: 20082282
- 川原幸一(KAWAHARA KOICHI)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号: 10381170
- 川口博明(KAWAGUCHI HIROAKI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授
研究者番号: 60325777
- H26年度まで
木之下(瀬戸口)明日香
(KINOSHITA(SETOGUCHI) ASUKA)
(元)鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授
研究者番号: 00396813
- (3)連携研究者
なし