

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850207

研究課題名(和文) イヌ炎症性乳癌に対するRNA干渉を利用した治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategies for canine inflammatory mammary carcinoma by RNA interference

研究代表者

村上 麻美 (Murakami, Mami)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：30597125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回 Fascin-1およびmicroRNA-145(miRNA-145)を用いた犬炎症性乳癌の新規治療法の研究基盤を確立する事が目的である。しかしながら、犬炎症性乳癌や犬乳癌の病理組織標本で、両腫瘍においてFascin-1発現の有無に有意差は認められなかった。そこで、現在まで犬自然発生腫瘍でのFascin-1発現の検索を開始した。その結果犬自然発生腫瘍では上皮性腫瘍での発現は乏しく悪性間葉系腫瘍での強発現が認められ(表1)、特に線維肉腫と血管肉腫で高度に発現が認められた。予後調査の結果から線維肉腫ではFascin-1発現の有無で局所再発あるいは転移に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fascin-1 plays an important role in regulating cell adhesion as well as coordinating cell motility and invasion in physiological and pathogenic condition. To develop therapeutic method in canine inflammatory carcinoma, which is very aggressive cancer and poor prognosis, Fascin-1 may be a key factor for its function. Unfortunately, paraffin-embedded specimens staining Fascin-1 protein by immunohistochemistry revealed no significant differences between canine inflammatory carcinoma and simplex carcinoma. Thus, fascin-1 immunohistochemistry was revealed that Fascin-1 expressed highly in mesenchymal tumors than that of epithelial tumors in canine spontaneous tumor. Furthermore, Fascin-1 expression may be related to the prognosis in canine fibrous tumor.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：犬 炎症性乳癌 Fascin-1

1. 研究開始当初の背景

犬の炎症性乳癌は非常に悪性度が高く、腫瘍細胞の周囲組織への浸潤、転移が高率に認められる極めて予後不良の腫瘍であり、新規治療開発が望まれている。申請者はこれまでの研究から犬の炎症性乳癌において、血管新生や悪性腫瘍の浸潤・転移に関与しているタンパク質分解酵素である Matrix Metalloproteinase (MMPs) が、高い活性をもって存在している事を発見した(未発表)。さらに、細胞接着分子の E-cadherin および β -catenin 発現の減少と発現部位の変化および N-cadherin の発現も確認しており、犬の炎症性乳癌で Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行) の関与を示唆する結果も得ている(未発表)。また、申請者は、Fascin-1 が犬の口腔内悪性メラノーマにおいて過剰発現しており、口腔内悪性メラノーマに罹患した犬の生存期間に相関している事を明らかとしている (Yamada, Murakami et al., 2011)。

現在、MMPs を阻害する新薬開発が医学領域で進められているものの、MMP 阻害薬は抗腫瘍効果のみならず、創傷治癒時における血管新生などの生理的な生体防御反応に対しても悪影響を及ぼす問題点が示唆されている。そのため、申請者は、犬の炎症性乳癌における新規治療開発にむけて MMPs を直接的な標的にするのではなく、MMPs を上流で制御する因子である Fascin-1 および microRNA-145 (miRNA-145) に着目した。

Fascin-1 はアクチン結合タンパクであり、生理的および病的な状態下で細胞運動に極めて重要な役割を果たしている。また、Fascin-1 は E-cadherin の発現減少を含む EMT に関与していることや、MMP-9 を過剰に発現および活性化させることが報告されている (Hayashi et al., 2011)。また、miRNA は細胞内に存在する 20-25 塩基ほどの小さい 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 であり、がんをはじめとした様々な疾患に関与する事が知られている。さらに miRNA のうち Fascin-1 が過剰発現している悪性腫瘍では miRNA-145 の発現が減少していることも報告されている (Sachdeva et al., 2010)。

本研究を進める上で、申請者は次のような予備的研究結果を得ている。犬の炎症性乳癌の自然発症例に対して、MMP-2、MMP-9 が高い活性を有しており、E-cadherin と β -catenin の発現の減少と発現部位の変化を確認している。申請者が樹立した犬炎症性乳癌細胞株に対して、自然発症例と同様にさらに MMP-2、MMP-9 が高い活性を有しており、これらを阻害する事で、細胞移動が抑制される事

を確認している。

2. 研究の目的

申請者は、極めて予後不良である犬の炎症性乳癌において、Matrix Metalloproteinase (MMPs) や細胞接着分子の E-cadherin および β -catenin の発現の減少と発現部位の変化がある事を明らかとした。本研究は、これらの因子の上流に存在する fascin-1 や制御因子を用いた犬の炎症性乳癌の新規治療法の研究基盤を確立する事が目的である。

3. 研究の方法

着目因子発現の有無を病理学的に解析した後、腫瘍細胞での増殖抑制や細胞移動抑制効果を示すかどうかを検証する。

その効果か MMPs や接着分子を介した機構によるものかを検証する。その後、着目因子の発現を調整する事によって、in vivo および in vitro における抗腫瘍効果を判定する。申請者は、これまでに着目した因子を用いて、犬の炎症性乳癌の増殖機構を解明し、新治療開発のための基礎的検討を行う。

(1) Fascin-1 の in vitro における効果の検証

Fascin-1 を申請者が樹立した犬炎症性乳癌細胞株で共培養することによって、細胞増殖および細胞移動の抑制効果を検証する。方法として、細胞増殖抑制能には WST-1 アッセイを、浸潤抑制能には Invasion assay を用いて評価する。また、抑制効果が認められた場合、MMPs や細胞接着因子を介したメカニズムかどうかも解析する。MMPs や細胞接着因子の遺伝子の発現には real-time RT-PCR を、タンパク質の発現には免疫組織学的手法およびウェスタンブロッティングを、MMPs タンパク質の活性には Gelatin zymography を用いて解析する。

(2) miRNA-145 の細胞内導入

miRNA を細胞内へ導入する事によって、細胞増殖および細胞移動の抑制効果を検証する。miRNA を細胞内に導入する方法としては、過去に所属講座でリポフェクション法を用いる方法が成功しているため、同様な手法を用いる。細胞増殖および細胞移動の抑制効果の解析には上記の方法と同様の手法を用いて実施する。

(3) Fascin-1 の siRNA の作製

Fascin-1 はヒトおよびマウスに対する siRNA がコマーシャルでの入手可能である。しかし、犬に対して使用不可であった

場合、ウイルスベクターを用いて siRNA を作製する。

(4) Fascin-1siRNA の細胞内導入

RNAi を細胞内に導入する方法として、過去に所属講座でリポフェクション法を用いる方法が成功しているため、同様な手法を用いる。細胞増殖および細胞移動の抑制効果の解析には上記の方法と同様の手法を用いて実施する。

(5) *in vivo* における Fascin-1 および miRNA-145 の抗腫瘍効果の検討

Fascin-1 に対する siRNA あるいは miRNA を導入していない細胞を接種したマウスで形成された腫瘍と導入した細胞を接種したマウスで腫瘍形成における効果を判定する。

4. 研究成果

Fascin-1 の病理学的検索において、臨床的に炎症性乳がんと診断された症例とリンパ管浸襲が認められる乳腺単純線癌との発現に有意差は認められなかった。そこで、現在まで犬自然発生腫瘍での Fascin-1 発現の検索を開始した。使用した腫瘍検体は計 113 検体で、Fascin-1 の免疫染色による各腫瘍での発現状況の検索を行った。更に、線維肉腫 34 検体、血管肉腫 29 検体を加えて、計 176 検体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、上皮系腫瘍 9/55 検体、間葉系腫瘍 21/37 検体、独立円形細胞腫瘍 5/21 検体で Fascin-1 の陽性を認めた。犬自然発生腫瘍では上皮性腫瘍での発現は乏しく悪性間葉系腫瘍での強発現が認められ(表 1)、特に線維肉腫と血管肉腫で高度に発現が認められた(図 1)。そこで、治療方法の乏しい線維肉腫および血管肉腫に焦点をあてて予後調査を実施したところ、線維肉腫では Fascin-1 発現の有無で局所再発あるいは転移に関与することが明らかとなり予後因子となる可能性が示唆された(図 2, 3)。一方血管肉腫では、予後が極めて短期であるため予後因子となる可能性は否定された。

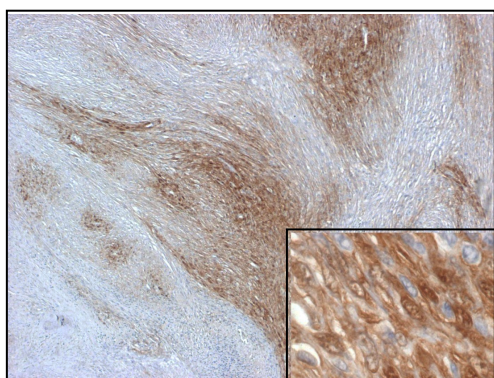


図 1 線維肉腫における Fascin-1 の発現

表 1 イヌ自然発生腫瘍における Fascin-1 の発現

腫瘍	検体数	陽性数	陰性
上皮系腫瘍			
マイボーム腺上皮腫	1	1	
移行癌	1	1	
鼻腔腺癌	1	1	
胃癌	1	1	
肛門囊アポクリン腺癌	7	1	6
皮脂腺腫	2	1	1
肺腺癌	6	2	4
乳腺癌	2	1	1
小計	21	9	12
間葉系腫瘍			
線維腫	3	1	2
線維肉腫	6	4	2
血管肉腫	4	4	
血管周皮腫	6	5	1
悪性血管周皮腫	5	2	3
平滑筋肉腫	2	1	1
GIST	2	1	1
線維組織球結節 I	1	1	
線維組織球結節 III	2	2	
小計	31	21	10
独立円形細胞腫瘍			
リンパ腫(T)	3	3	
組織球肉腫	3	2	1
小計	6	5	1
合計	58	35	23

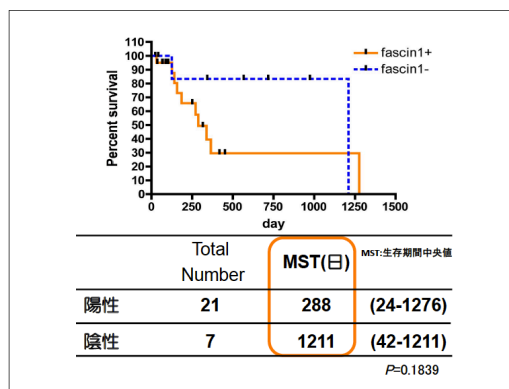


図 2 線維肉腫における Fascin-1 の発現と生存期間

【再発】			
	Total Number	再発	再発までの平均日数
陽性	21	7	145.3日
陰性	7	1	329日
P=0.6334			
【転移】			
	Total Number	転移	転移までの平均日数
陽性	21	7	113.8日
陰性	7	1	88日
P=0.6334			

図 3 線維肉腫における Fascin-1 の再発と転移

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 村上麻美, 源田隆志, 平島一輝, 伊藤
祐典, 川部美史, 酒井洋樹, 森 崇, 柳
井徳磨, 丸尾幸嗣, “犬線維肉腫におけ
る Fascin-1 の発現性と予後の検討” 第
157 回日本獣医学術集会(20140910),
北海道大学 (札幌市・北海道)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

- 取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 麻美 (MURAKAMI MAMI)
岐阜大学・応用生物科学部・助教
研究者番号 : 30597125

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :