

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07439

研究課題名(和文) 悪性中皮腫に発現するHEG1の制御に関わるマイクロRNAの探索と分子機序の解明

研究課題名(英文) HEG1-responsive microRNA-23b regulates cell proliferation in malignant mesothelioma cells

研究代表者

伊丹 弘恵 (Itami, Hiroe)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20769020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は、生存、死亡、細胞毒性シグナルが不明であるため、その分子標的については解明されていない。HEG homolog 1(HEG1)は上皮成長因子様ドメインを含む粘液様膜タンパク質で、中皮腫の細胞増殖能を維持していると言われている。本研究では悪性中皮腫細胞株を使用してHEG1とmicroRNAの機能分析を行った。MiR-23bは、悪性中皮腫細胞のアポトーシスとオートファジーによって誘発される細胞毒性を回避することにより、HEG1依存性の細胞増殖に寄与することが分かった。よってHEG1依存/媒介miR-23bシグナル伝達は、悪性中皮腫の診断・治療において有力なマーカーとなりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫におけるHEG1の位置付けを明らかにすることで病理組織診断および予後との関連性が明らかになる。また、HEG1およびmiRNAとその標的候補分子による早期診断と予後予測、さらには分子標的治療に役立つ。

研究成果の概要(英文)：The molecular target of malignant mesothelioma (MM) has not been elucidated because of unknown survival, death, and cytotoxic signals in MM. HEG homolog 1 (HEG1) is a mucin-like membrane protein that contains epidermal growth factor-like domains, and HEG1 expression supports the survival and proliferation of MM cells. In this study, functional analysis of HEG1 and microRNAs using MM cell lines was performed. MiR-23b contributes to HEG1-dependent cell proliferation through evasion of cytotoxicity induced by apoptosis and autophagy in MM cells. HEG1-dependent/mediated miR-23b signaling may therefore be a potential target for MM diagnosis and therapy.

研究分野：病理診断

キーワード：悪性中皮腫 HEG1 マイクロRNA

### 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベストに関連し発症する極めて予後不良の腫瘍であるが、早期診断が難しく、また病理学的にも診断の難しい疾患である。悪性中皮腫における分子診断や分子標的療法への応用として miRNA を含めた種々の分子が検討されてきているが、実用化されている分子は未だに存在しておらず、鍵分子となり得る遺伝子の特定と機能解析が急務である。

2017 年に悪性中皮腫の有用な免疫染色抗体として Sialylated Heart development protein with EGF like domains 1(SHEG1)が発見された。S-HEG1 は従来の中皮腫診断のための免疫染色抗体に比して特異度、感度が非常に高いものの、発現機序や機能については不明の点が多い。

Micro RNA(miRNA)は、ヌクレオチド長が 19~24 ヌクレオチドの小さな非コード RNA であり、主に 3' 非翻訳領域の相補配列に結合することにより、転写後の段階で mRNA の発現を調節する。miRNA は、翻訳抑制や転写産物の分解を引き起こすことにより、重要な細胞プロセスの調節に重要な役割を果たし発現の変化により腫瘍の進行に寄与している。

### 2. 研究の目的

(1)HEG1 の機能について細胞増殖を中心に分子レベルで解明し、悪性中皮腫における HEG1 の位置付けを明らかにすることで病理組織診断および予後との関連性を明らかにする。

(2)HEG1 の発現に関連する miRNA を探索し、miRNA とその標的候補分子の機能解析によって増殖機構を中心とした分子機能を明らかにし、HEG1 および miRNA とその標的候補分子による早期診断と予後予測、さらには分子標的治療の端緒とすることを旨とする。

### 3. 研究の方法

(1)3 つのヒト中皮腫細胞株 (211H、H226、H2052)、肺腺癌細胞株 (H1299) およびヒト中皮細胞株 Met-5A を入手し、免疫組織化学染色 (カルレチニン、D2-40、WT1、TTF-1、BAP1、MTAP) を施行した。

(2) HEG-1 に対する siRNA をトランスフェクトし、定量的 RT-PCR を使用して中皮腫細胞株と Met-5A 細胞が HEG-1mRNA を過剰発現しているかどうかを調べた。

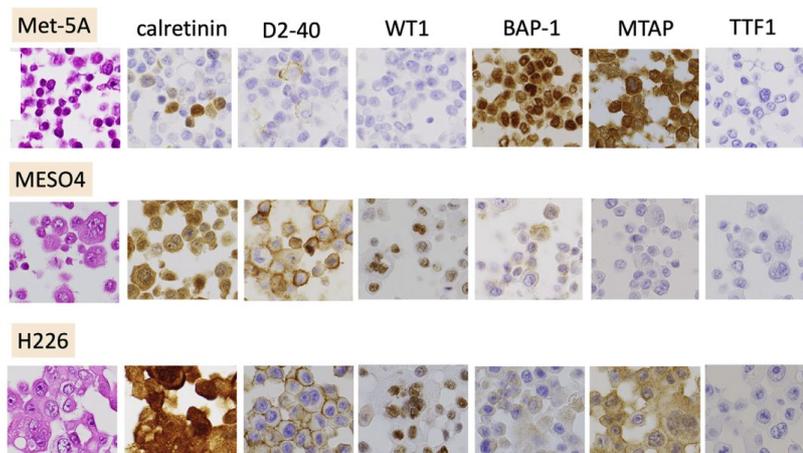
(3)中皮腫で特異的に発現する miRNA を同定するために次世代シーケンサーを使用して、肺腺癌 (H1299) および中皮腫 (MES01 および MSE04) に由来する細胞株の miRNA アレイを調べた。次に、MM 細胞における HEG-1 による miRNA 調節を調べるために、HEG-1 siRNA1 を H226 細胞株にトランスフェクトし、次世代シーケンサーを使用して miRNA アレイ解析を行った。さらに、miR-23b-3p、miR-26a-5p、および miR-138 が MM および Met-5A 細胞株で HEG-1 によって制御されていることを確認するために、3 つの HEG-1siRNA を Met-5A、H2052、H211 にトランスフェクトし、定量 RT-PCR を使用して測定した。

(4) MiR-23b-3p、miR-26a-5p、miR-138 の抑制下での細胞増殖を調べ、中皮腫および Met-5A 細胞における増殖の HEG-1 誘導性調節のモードを決定するために、オートファジーの検出のための LC3 アッセイおよびアポトーシス/細胞死のためのアネキシン V アッセイを実施した。

### 4. 研究成果

(1)免疫染色では、中皮腫細胞株は典型的な免疫細胞学的表現型を示した (図 1)。ただし、細胞株は H2052、H211、および MES01 に対して部分的に陽性であり、BAP および MTAP は部分的に消失したのみだった。いずれの中皮腫細胞も TTF-1 陰性であった。

図 1 中皮腫細胞株の免疫染色結果



(2)定量的 RT-PCR では、HEG-1 の発現の Ct 値は、全ての細胞で 15~25 であった。HEG1 mRNA およびタンパク質は MESO4 で最も高い発現を示した (図 2A、B)。HEG-1 発現の抑制は、全ての中皮腫および Met5A 細胞株で 3 つの独立した HEG-1 siRNA のトランスフェクション後 72 時間で細胞増殖を有意に減少させた (図 2C)。このことは、HEG-1 が高度に発現され、中皮腫および中皮細胞の細胞増殖を調節していることを示している。

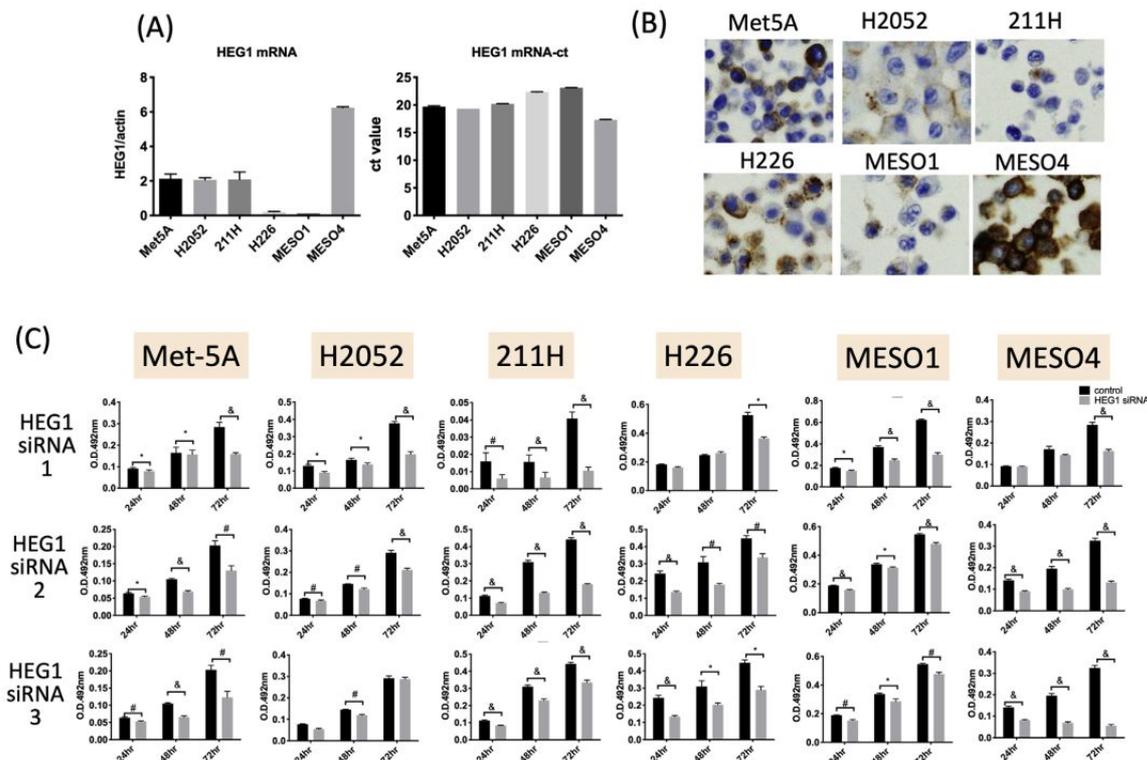


図 2 Met-5A と悪性中皮腫細胞株の HEG-1 mRNA 発現

(3)miRNA アレイを調べた結果、細胞株間でさまざまな程度の miRNA 発現を示し、MESO1 および MESO4 細胞は最高の miRNA 発現レベルを示した (図 3A)。

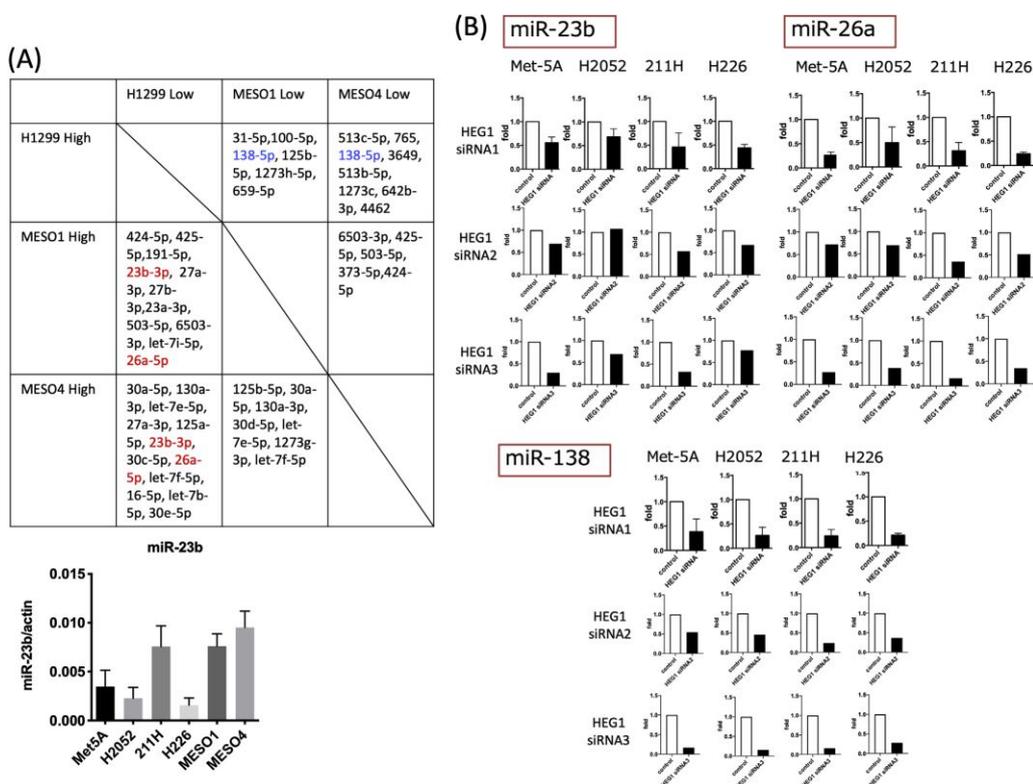


図 3 中皮腫細胞株の miRNA 発現

miRNA アレイ解析では分析対象は9945のノンコーディングRNA(miRNA、lincRNA、SnoRNA、scRNA、piRNA、tRNA)で、そのうち3390が検出され、991がmiRNAであった。miR-23b-3pとmiR-26a-5pの両方がHEG-1によって調節され、対照的にmiR-138の発現はMM細胞株では低く、次世代シーケンサー分析では検出されなかった。miR-23b-3p、miR-26a-5p、およびmiR-138がMMおよびMet-5A細胞株でHEG-1によって制御されていることを確認するために、3つのHEG-1siRNAをMet-5A、H2052、H211にトランスフェクトし、定量RT-PCRを使用して測定した。全てのMMおよびMet-5A細胞株でmiR-23b-3p、miR-26a-5p、およびmiR-138の発現レベルはHEG-1発現が抑制されると減少した(図3B)。

(4)MiR-23b-3pの抑制下で細胞増殖は有意に減少した。アネキシンVアッセイでは、オートファジー誘導率は、HEG-1またはmiR-23bの抑制下で増加した。初期アポトーシスは、HEG-1またはmiR-23bの抑制によって誘導された。これらの結果からHEG-1およびmiR-23bがオートファジーおよびアポトーシスを制御することによって細胞増殖に影響を与えることが分かった。

(5)以上の結果から、HEG1の発現抑制により、悪性中皮腫細胞株のMES04、MES01、MES04いずれにおいても細胞増殖が抑制された。悪性中皮腫細胞株ではHEG1の発現抑制によりアポトーシスならびにオートファジーいずれも誘導されたことから、HEG1は抗アポトーシスおよびオートファジー抑制により、中皮腫の細胞増殖能を維持していることが示唆された。また、miR-23bは、悪性中皮腫細胞のアポトーシスとオートファジーによって誘発される細胞毒性を回避することにより、HEG1依存性の細胞増殖に寄与することが分かった。よってHEG1依存/媒介miR-23bシグナル伝達は、悪性中皮腫の診断・治療において有力なマーカーとなりうる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroe Itami, Shigeo Hara, Kenichi Samejima, Hideo Tsushima, Katsuhiko Morimoto, Keisuke Okamoto, Takaaki Kosugi, Takahiro Kawano, Kengo Fujiki, Hiromichi Kitada, Kinta Hatakeyama, Kazuhiko Tsuruya, Chiho Ohbayashi	4. 巻 477
2. 論文標題 Complement activation is associated with crescent formation in IgA nephropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 565-572
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-020-02800-0.	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 Itami Hiroe, Nakamine Hirokazu, Takeda Maiko, Nakai Tokiko, Myojin Tomoya, Matsuoka M1, Sasaki Shoh, Uchiyama Tomoko, Morita Kohei, Fujii Tomomi, Hatakeyama Kinta, Ohbayashi Chiho.	4. 巻 27-1
2. 論文標題 Immunohistochemical Reappraisal Regarding the Frequency of Primary Salivary Gland Follicular Lymphoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Surg Pathol.	6. 最初と最後の頁 48-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1066896918784349.	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 Itami Hiroe, Fujii Tomomi, Nakai Tokiko, Takeda Maiko, Kishi Yohei, Taniguchi Fumiaki, Terada Chiyoko, Okada Fumi, Nitta Yuji, Matsuoka Minami, Sasaki Shoh, Sugimoto Sumire, Uchiyama Tomoko, Morita Kohei, Kasai Takahiko, Kawaguchi Ryuji, Ohbayashi Chiho	4. 巻 111
2. 論文標題 TRAF7 mutations and immunohistochemical study of uterine adenomatoid tumor compared with malignant mesothelioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Pathology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humpath.2021.02.007	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 Itami Hiroe, Nakamine Hirokazu, Kubo Masayuki, Ogawa Kohei, Tani Rina, Nakamura Shinji, Takeda Maiko, Nitta Yuji, Uchiyama Tomoko, Fujii Tomomi, Hatakeyama Kinta, Ohbayashi Chiho	4. 巻 61
2. 論文標題 Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) with significant intravascular invasion. Close resemblance of its clinicopathological features to intravascular large B-cell lymphoma, but not to DLBCL-not otherwise specified	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 152 ~ 161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3960/jslrt.20066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊丹弘恵
2. 発表標題 IgA腎症の病理
3. 学会等名 忍びの道病理セミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊丹 弘恵, 藤井 智美, 岡部 文美, 新田 勇治, 明神 大也, 松岡 未奈巳, 杉本 澄美玲, 森田 剛平, 畠山 金太, 大林 千穂
2. 発表標題 3cmを超えた非浸潤性肺腺癌の3例.
3. 学会等名 第109回病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井智美、伊丹弘恵、武田麻衣子、大林千穂
2. 発表標題 microRNA-23bは悪性中皮腫細胞の増殖能を制御する
3. 学会等名 第1回日本石綿・中皮腫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊丹 弘恵、藤井 智美、武田 麻衣子、寺田 智代子、大林 千穂
2. 発表標題 アデノマトイド腫瘍と悪性中皮腫のTRAF7変異と免疫組織学的検討
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	中井 登紀子 (Nakai Tokiko) (00619538)	国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員  (82606)	
研究分担者	武田 麻衣子 (Takeda Maiko) (40398441)	奈良県立医科大学・医学部・講師  (24601)	
研究分担者	藤井 智美 (Fujii Tomomi) (50623477)	奈良県立医科大学・医学部・准教授  (24601)	
研究分担者	畠山 金太 (Hatakeyama Kinta) (60325735)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長  (84404)	
研究分担者	大林 千穂 (Ohbayashi Chiho) (90223940)	奈良県立医科大学・医学部・教授  (24601)	

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
---------	---------