

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390192

研究課題名（和文）アスベスト曝露による悪性中皮腫発症の分子機構の解明とそれを標的とした予防法の開発

研究課題名（英文）Development of cancer prevention based on the molecular mechanism against malignant mesothelioma.

研究代表者

曾和 義広（SOWA YOSHIHIRO）

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70315935

研究成果の概要（和文）：悪性中皮腫においては、癌抑制性 microRNA の miR-34b/c のメチル化が生じており、DNA メチル化の解除には、DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の併用が有効なことから、悪性中皮腫細胞に併用処理を実施した。その結果、増殖抑制とアポトーシスの増加および miR-34b/c の発現増加が認められた。これらの結果は、悪性中皮腫では、メチル化の解除が治療・予防に有効な可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：In malignant mesothelioma cells, miR-34b/c, which is known as a tumor suppressive microRNA, is suppressed by DNA methylation. Since the combination treatment of DNA methyltransferase inhibitor and histone deacetylase (HDAC) inhibitor abrogated the DNA methylation, we treated malignant mesothelioma cells with the combination. As a result, the combination induced growth arrest, apoptosis and the upregulation of miR-34b/c. These results raise a possibility that the combination treatment of DNA methyltransferase inhibitor and HDAC inhibitor might be useful for the treatment and prevention against malignant mesothelioma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：悪性中皮腫、DNA メチル化、microRNA、HDAC 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

我が国を始めとする先進諸国では、アスベストの使用は既に規制されているが、悪性中皮腫の発症には曝露から約20-30年間にわたる長期の潜伏期間があるため、現在は中皮腫が急増している時期であり、そのピークは2020年以降に訪れると考えられている。

さらに悪性中皮腫に対する治療法におい

ても、根治的な治療法は存在せず、予後も不良であるため、既にアスベストに曝露し、潜伏期にある人々に対する悪性中皮腫の発症予防法を開発することは極めて急務である。

2. 研究の目的

悪性中皮腫で高頻度に認められる分子異常として、p53-RB 癌抑制経路を司る p16、

p14 の欠失が報告されていたが、それ以外にもがん抑制性に働く microRNA の miR-34b/c の発現が低下していることが報告され、その発現低下は miR-34b/c の DNA メチル化によるものであることが近年報告された (Clin Cancer Res. 2011)。

そこで、この DNA のメチル化ようなエピジェネティックな異常により発現が低下した miR-34b/c の発現を回復させることは、悪性中皮腫の治療・予防に有効ではないかと考えた。

3. 研究の方法

DNA メチル化の解除には、DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の併用が有効なことから、DNA メチル化により miR-34b/c が発現抑制されていると考えられる悪性中皮腫細胞 211H を用いて、検討を行った。

4. 研究成果

DNA メチル化阻害剤としては、5-aza-2'-deoxycytidine、HDAC 阻害剤としては、私達が以前に見出した新規 HDAC 阻害剤 YM753 (Int J Oncol. 2008) を用い、それぞれ単剤では 211H の細胞増殖を強く抑制しない濃度を設定の検討を行い、それぞれの処理濃度を、5-aza-2'-deoxycytidine は 2 μM、YM753 は 8 nM と設定した。

DNA メチル化阻害剤

5-aza-2'-deoxycytidine によるメチル化解除が起こるには時間 (数日間以上) がかかるため、併用に適した処理デザインを検討したところ、細胞播種翌日に 5-aza-2'-deoxycytidine を加え、5-aza-2'-deoxycytidine 添加 3 日後に YM753 を加え、YM753 添加の翌日に各種項目を解析することが適当であることが明らかとなった。

(したがって、5-aza-2'-deoxycytidine 処理は延べ4日間、YM753 処理は最後の1日間となる)

この条件において、211H における細胞増殖への影響を検討したところ、2 μM の 5-aza-2'-deoxycytidine 処理は単独でも 50% 程度の増殖抑制を認めたが、8 nM の YM753 処理は、ほとんど増殖に影響を与えなかった (図 1)。しかしながら、その併用は、単独よりも有意に 211H の増殖を抑制した (図 1)。

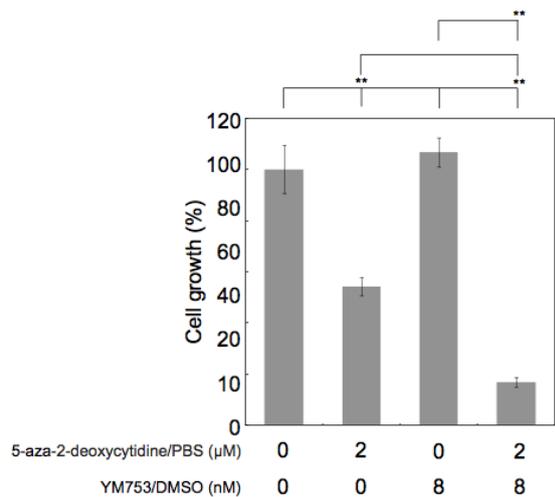


図 1: DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素の単独および併用による細胞増殖への影響

そこで、この併用時に見られる強い増殖抑制効果を解析するために細胞周期解析を実施したところ、2 μM の 5-aza-2'-deoxycytidine 処理は単独で 15% 程度のアポトーシス誘導を認めた、8 nM の YM753 処理も 10% 程度のアポトーシス誘導を認めた (図 2)。しかしながら、その併用は、単独よりも有意に強い (40% 程度) アポトーシスの誘導を生じた (図 2)

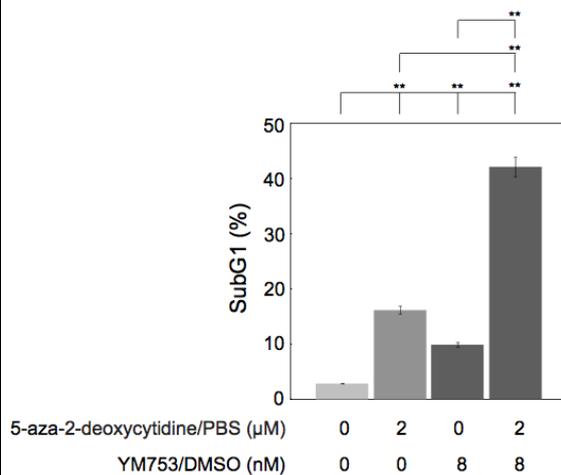


図 2: DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素の単独および併用によるアポトーシスへの影響

そこで、悪性中皮腫において DNA メチル化により発現が抑制されていることが知られている microRNA34b/c の発現への、DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素の単独および併用による影響を検討した (図 3)。

2 μ M の 5-aza-2'-deoxycytidine 処理は単独でも miR-34b および miR-34c の誘導を認めた。このことから、やはり 211H 細胞において、miR-34b および miR-34c の発現は、DNA メチル化により低下していることが推測された。しかしながら、8 nM の YM753 処理は、miR-34b および miR-34c の発現をむしろ抑制するようであった (図 3)。そして、その併用は、単独よりも miR-34b に対しては誘導を認め、miR-34c に対しても誘導する傾向が認められた (図 3)。

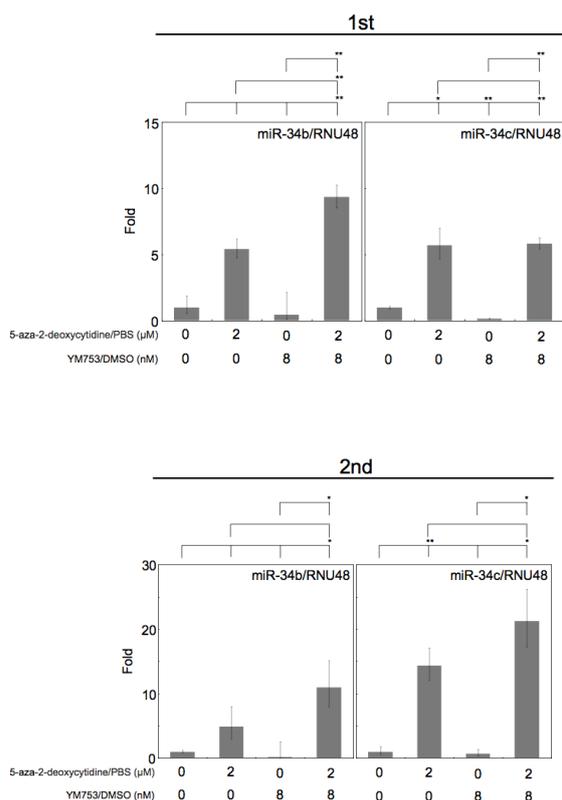


図 3 : DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素の単独および併用による miR-34b および miR-34c 発現への影響

miR-34b/c は代表的な癌抑制遺伝子であり転写因子として働く p53 の標的遺伝子の一つであり (miR-34b と miR-34c はクラスターである)、その代表的な標的は抗アポトーシス分子である Bcl-2 とされていることから、今回の結果は、DNA メチル化により発現が抑制されていた miR-34b/c が、DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素の併用により脱メチル化が生じ、その結果、まず miR-34b および miR-34c の発現が回復し、その結果、miR-34b および miR-34c の標的である Bcl-2 が低下することでアポトーシスが誘導されたのではないかと考えられる。

DNA のメチル化は、後天的に生じる代表

的なエピジェネティックな現象であることから、miR-34b/c のメチル化による発現低下が悪性中皮腫の発症に関与していることが考えられる。実際、DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素の併用により miR-34b/c とアポトーシスの誘導が認められたことは、悪性中皮腫における、メチル化の解除が治療・予防に有効な可能性を示唆する。

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 0 件)

[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 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pubmed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾和 義広 (SOWA YOSHIHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 70315935

(2) 研究分担者

友杉 真野(堀中 真野)

(TOMOSUGI MANO (HORINKA MANO))

京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：80512037