

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590435

研究課題名(和文) 中皮腫関連分子 Mesothelin の発現に関する包括的分子病理学的解析

研究課題名(英文) Comprehensive molecular and pathological analysis of Mesothelin expression

研究代表者

脇屋 緑 (Wakiya, Midori)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00220848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 円

研究成果の概要(和文)：中皮腫はアスベスト暴露が原因となって発症する予後不良の悪性腫瘍である。ERC/Mesothelin(以下ERCと略)は中皮腫の診断・予後判定に利用できる腫瘍マーカーである。我々は本研究においてERCの発現制御にmicroRNA が関与していることを示した。また中皮腫に対する新規治療法の確立を目的として、中皮腫培養細胞をマウスに免疫することにより、中皮腫細胞に対して増殖抑制効果を示すモノクローナル抗体を単離した。

研究成果の概要(英文)：Mesothelioma, caused by the exposure to asbestos, is a malignant tumor with poor prognosis. ERC/Mesothelin (ERC) is a tumor marker useful for the diagnosis of mesothelioma and the evaluation of its prognosis. In this study, we showed that the expression of ERC is regulated by microRNA. To establish the novel treatment for mesothelioma, we immunized mice with cultured cells derived from human mesothelioma cells, and isolated the monoclonal antibodies having the anti-proliferative activity for the mesothelioma cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：中皮腫 ERC/Mesothelin

1. 研究開始当初の背景

ERC/Mesothelin(以下ERCと略)分子は、正常では中皮細胞、気管支上皮、卵管上皮細胞、腫瘍では悪性中皮腫、卵巣癌、膵癌その他腫瘍に高発現している40kDaの糖蛋白質である。細胞表面上に存在しており、細胞-細胞間認識や細胞接着に関与していると推定されているが、詳細は未知である。この分子はまず70kDa前駆蛋白として合成され、その後切断され1つは細胞膜に存在するC末ERC、もう一方は31kDaのN末ERCとして血中に分泌される。免疫組織化学染色では、悪性中皮腫以外にも膵癌、卵巣癌その他各種の癌で高発現されており発がん過程に関与する重要な遺伝子である可能性がある。血清ERC値がELISAにより中皮腫、その他がん患者で高値に検出され、新しい腫瘍マーカー分子として国内外で使用されている。癌の免疫療法のtargetとしても注目されている。申請者らの講座および臨床講座でもERC peptideに対して作成した抗体によるELISA、免疫染色を開発し、順天堂大学附属病院中皮腫外来において東京土建一般労働組合と協力して研究検診を行い、症例を集積中であり、すでに無症候性の早期中皮腫症例を発見している。しかしながら、各種組織、腫瘍、細胞レベルでのERC mRNA発現パターン、isoform、蛋白質の発現、細胞内分布、processing、分泌のメカニズム、発現調節、遺伝子methylationなどのepigeneticな調整の有無など未知の部分が多い。特に、腫瘍での発現調節のメカニズムや、前癌病変から癌化に至る変化については詳細な検討がいまだに行われていない。既に申請者らはERC promotor のCpG 部位の低メチル化が悪性中皮腫の発生において重要な役割を果たしている可能性を示した(Tan K et al. Human Pathology 41: 1330-138, 2010)。悪性中皮腫を含む肺病変および正常肺組織118 症例を対象として、ERC promotor のメチル化状態とERCの発現状態を調べた結果、まずERC promotor は悪性中皮腫で特異的に低メチル化状態にあり、そのことはERC発現陽性の上皮型でも発現陰性の肉腫型でも同様に認められること、次にメチル化解析の対象とした 20ヶ所のCpG 部位のうち、中皮腫で特異的に低メチル化状態を示す4ヶ所の同定、三番目に、悪性中皮腫、肺癌、非腫瘍性病変、正常肺組織を合わせて解析すると、ERC promotor のメチル化状態とERC発現状態の間に相関があることを明らかにした。よって、ERC promotorの特定の4ヶ所のCpG部位での

低メチル化が悪性中皮腫の発生において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。また、肉腫型では特徴的な低メチル化が起こっているにもかかわらずERCの発現は見られないことから、mRNAが分解される、蛋白合成が行われない、合成後の蛋白が分解されるなどの機序が発生している可能性があり、それが上皮成分を持たないこととの関連が示唆される。現在肉腫型でのERC低発現の機序について検索中である。また申請者らは、分泌型N末ERCにin vitroで細胞死抑制能があることを報告した(Wang T et al. Int J Mol Med 26:185-91, 2010)。

2. 研究の目的

I. ERC 発現制御機構の解明

ERCのヒト正常組織、非腫瘍性の病的組織、さらに各種腫瘍病変におけるmRNA 発現パターン、isoform、alternative splicing、蛋白発現、細胞内局在、遺伝子メチル化やヒストン修飾を包括的に検討することを計画する。中皮腫(上皮型、二相性、肉腫型、線維形成の各組織型)、各種組織型の卵巣癌、子宮癌、膵癌などにおけるERC動態を詳細に検討する。正常および良性病変、前癌病変も対象とする。特に中皮腫は、組織型を問わず、特異的な4ヶ所のpromotorのCpGsiteにおいて低メチル化が起こっていることを明らかにしたので、悪性中皮腫の発生において重要な役割を果たしている可能性が示唆されるため、正常中皮との比較も含めて重点的に検討する。また、肉腫型ではERCの発現量が低いにもかかわらず起こっているため、発現量が低い原因および上皮成分を持たないこととの関連性を検索してゆく。

II. 新規の中皮腫治療法の確立

悪性中皮腫患者は、増加の一途をたどり2030年にはピークを迎えると推測されており、外科的切除と組み合わせる様々な内科的治療が施行されているがいまだ有効な治療法が確立されていない。我々は分子標的薬作出を目的として、悪性中皮腫培養細胞株の免疫により中皮腫細胞増殖抑制を示す抗体の樹立を試みる。

3. 研究の方法

I. ERC 発現制御機構の解明; miRNA の関与の解明。

a. 中皮腫組織あるいは中皮腫由来培養細胞中のmiRNA定量。

対象：上皮型中皮腫10症例、肉腫型7症例(外科手術症例)のパラフィンブロックから26-27 G 針を用いて上皮型あるいは肉腫型組織を回収しRNA抽出。またヒト中皮腫由来培養細胞 MESO-4 (上皮様)、211H (上

皮様にもなり肉腫様にもなる)、H226 (上皮様)、H2456 (肉腫様)からRNAを抽出。

方法：1. Ambion社製Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPEを用いて、miRNAを含むtotal RNA抽出。
2. Applied Biosystem社製TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kitで、ERC 3'非翻訳領域に結合配列を持つ以下の7つのmiRNAを逆転写。

(miR-608, -542-5p, -887, -6132, -1271-3p, -206, -363-5p)

3. TaqMan MicroRNA Assaysキットおよび Applied Biosystems7500リアルタイムPCRシステムを用いて、miRNAを定量。

4. 各miRNA量とERC/Mesothelin発現量および中皮腫組織亜型との関連を調べる。

b. 細胞内へ導入したmiRNAのERC発現量に対する影響。

1. 7種のmiRNAに対する mimic 配列および inhibitor 配列は、Ambion社製 mirVana miRNA Mimics and Inhibitors システムに準じてカスタム合成する。それらのオリゴを 3 nM、30 nM、100 nM の濃度でトランスフェクションに用いる。

2. 6 cm シャーレに上述 H226 細胞 $1\sim 2 \times 10^5$ 個をまき、約 50% コンフルエントになった時点で Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen)を用いてトランスフェクションを行う。

3. トランスフェクション後、24、48、72 時間後に細胞を回収し、ウェスタン法およびリアルタイム PCR 法で ERC 転写産物の量を調べる。Mimic あるいは inhibitor の導入により、ERC/Mesothelin 転写産物の量が変化しているかどうかを確認する。

c. miRNA の中皮腫培養細胞に対する影響

ERC/Mesothelin 発現状態に影響を与える miRNA に対応する mimic / inhibitor RNA オリゴを細胞に導入し、細胞の形態 [肉腫型 (紡錘形) か上皮型 (敷石形)] に与える影響を調べる。また、既報告の EMT/MET 関連 markers (N-/E-cadherin, snail-1/2, smad-2/3 等)の発現に対する影響も調べる。

II. 抗中皮腫細胞抗体を用いた新規の中

皮腫治療法の開発

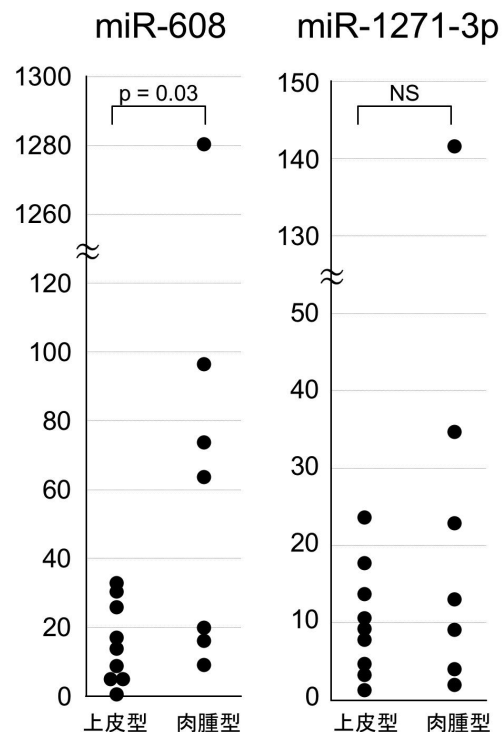
悪性中皮腫の培養細胞である 211H, MESO 4, NCL-H226 を培養し、BALB/c 8 週令マウスに交互に 3 カ月にわたり腹腔内投与した。同マウスの脾臓リンパ球を P3U1 ミエローム細胞と融合させ、モノクローナル抗体の樹立を試みた。スクリーニングは、FACS を用いて、免疫源として用いた細胞との結合性を指標とした。

4. 研究成果

1. ERC 発現制御機構の解明；miRNA の関与の解明。

ERC 遺伝子の 3'非翻訳領域(3'UTR)には 7 種の microRNA(以下 miRNA と略)の結合配列が存在する。上皮型および肉腫型中皮腫における 7 種の miRNA の発現量を real time PCR 法で定量したところ、miR-608、miR-1271-3p を含む 4 種は肉腫型で高い発現量を示し(図 1)、

図1. 上皮型および肉腫型中皮腫におけるmiRNA発現量
(内部対照RNU48に対する相対量)



ERC/Mesothelin 発現量と逆の関係であった。7 種の miRNA に対する類似配列あるいは阻害配列をヒト中皮腫由来培養細胞に導入し、ERC/Mesothelin 遺伝子発現量に与える影響を調べたところ、miR-1271-3p の類似配列が ERC/Mesothelin 遺伝子発現を抑制し、阻害配列が発現を促進する結果を得た。この結果は、同 miRNA が ERC/Mesothelin 遺伝子の発現制御に関与していることを示す。

11. 抗中皮腫細胞抗体を用いた新規の中皮腫治療法の開発

ハイブリドーマの産生抗体による悪性中皮腫細胞株の形態の変化とフローサイトメトリーを用いた抗体の結合の確認により、数種のクローンが得られた。それらの抗体のいくつかは [3H]thymidine incorporation や XTT アッセイにより悪性中皮腫細胞増殖抑制を示した。また体腔液の塗沫標本を用いて免疫染色を行ったところ、腺癌細胞には陰性を示し、中皮細胞に陽性を示した。

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3件)

Ito T, Kajino K, Abe M, et al. ERC/mesothelin is expressed in human gastric cancer tissues and cell lines. Oncol Reports 査読有 31, 2014, 27-33.

Kawamata F, Homma S, Kamachi H, Einama T, Kato Y, Tsuda M, Tanaka S, Maeda M, Kajino K, Hino O, Takahashi N, Kamiyama T, Nishihara H, Taketomi A, Todo S. C-ERC/mesothelin provokes lymphatic invasion of colorectal adenocarcinoma. J Gastroenterol 査読有 49, 2014, 81-92.

梶野一徳、樋野興夫。RNA 干渉と肝疾患の治療生体の科学。査読無 63 巻第 2 号, 2012, 129-132.

[学会発表](計7件)

譚珂、梶野一徳、脇屋緑、樋野興夫。miRNAによるERC/mesothelin転写産物の制御。第72回日本癌学会学術総会2013年10月3日。パシフィコ横浜。

水谷奈津子、松岡周二、梶野一徳、脇屋緑、樋野興夫。悪性中皮腫に対する新規標的抗体作製およびその発現の検討。第72回日本癌学会学術総会2013年10月5日。パシフィコ横浜。

水谷奈津子、松岡周二、阿部雅明、梶野一徳、脇屋緑、樋野興夫。悪性中皮腫に対する新規治療抗体の作製およびその標的分子発現の検討。第102回日本病理学会総会2013年06月7日。ロイトン札幌。

譚珂、梶野一徳、脇屋緑、樋野興夫。中皮腫における ERC/mesothelin 発現制御機構。第71回日本癌学会学術総会2012年9月19日。ロイトン札幌

脇屋緑、原田 紀宏、春日 文子、他。肺骨化症の剖検例。第100回日本病理学会総会。2011年4月28日。パシフィコ横浜。

譚 珂、梶野一徳、百瀬 修二、他。中皮腫における ERC/Mesothelin の発現制御機構の解明。第70回日本癌学会。2011年10月3日。名古屋国際会議場。

王 特格喜白音、梶野一徳、樋野興夫、他。N-ERC/Mesothelin の結合蛋白質の単離。第70回日本癌学会。2011年10月3日。名古屋国際会議場。

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇屋 緑 (WAKIYA, Midori)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：00220848

(2) 研究分担者

梶野 一徳 (KAJINO, Kazunori)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：80260066

(3) 連携研究者 ありません。