

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月26日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2011～2012  
 課題番号： 23659328  
 研究課題名（和文） MicroRNomicsを基盤とする繊維・粒子状物質の健康障害リスク評価法の構築  
 研究課題名（英文） Risk assessment of fibrous and particulate matters on the basis of microRNomics  
 研究代表者  
 平工 雄介（HIRAKU YUSUKE）  
 三重大学・大学院医学系研究科・講師  
 研究者番号： 30324510

## 研究成果の概要（和文）：

繊維・粒子状物質は呼吸器で慢性炎症を惹起して発がんや線維化などを起こすため、リスク評価法の確立が急務である。マイクロRNA(miRNA)は、種々の疾病のバイオマーカーとして期待されている。本課題では、石綿、黄砂、シリカを気管内投与したマウスの肺組織で、多くのmiRNAの発現が有意に変動することを明らかにした。以上の結果から、miRNAは繊維・粒子状物質のリスク評価指標として応用できる可能性が考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

Fibrous and particulate matters cause inflammation in respiratory systems, leading to carcinogenesis and fibrosis. It is necessary to establish the system to evaluate the risk of these matters. microRNA (miRNA) is expected as a potential biomarker for various human diseases. In this study, we found that the expression of some miRNAs was significantly changed in the lung of mice exposed to asbestos, Asian dust and silica. These results suggest that miRNA can be used as a biomarker to evaluate the risk of these matters.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：繊維・粒子状物質、マイクロRNA、石綿、シリカ、黄砂、カーボンナノチューブ、マイクロアレイ、リスク評価

## 1. 研究開始当初の背景

産業現場ではこれまで石綿（アスベスト）やシリカなどの繊維・粒子状物質が多く使用されてきたが、吸入曝露により呼吸器で慢性炎症を惹起し、発がんや線維化をもたらす。近年では、カーボンナノチューブ（CNT）や金属ナノ粒子などのナノ素材が種々の産業に使用されている。しかし、CNTは実験動物で悪性中皮腫を起こすとの報告があり、ヒトへの健康影響が強く懸念されている。黄砂に

関しては、韓国や台湾で黄砂期間中の循環器および呼吸器系疾患による死亡が増加するという報告があり、我が国でも健康影響が懸念されている。これらの物質による健康障害機構には未だ不明な点が多く、また曝露量や健康障害リスクの評価指標が確立されていないため、そのシステムの確立が急務である。

マイクロRNA(miRNA)とは、22塩基前後の非コードRNAの一種であり、ヒトでは1000種類以上が存在する。miRNAは、相補的な配列を持つメッセンジャーRNA(mRNA)

に結合あるいは分解して標的遺伝子の発現を抑制し(図)、がんなどの様々な疾患に関与すると考えられている。"MicroRNomics"とは、個体における miRNA 発現の網羅的な解析を行い、疾病のリスク評価や予防への実践応用に資する分子を探索する研究手法である。これまで化学物質の毒性評価に miRNA を応用する研究はほとんど見当たらない。

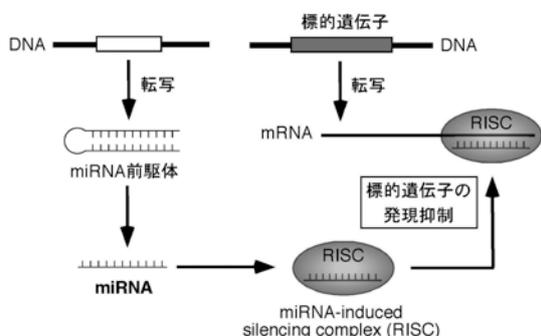


図 miRNA 発現と遺伝子発現制御の概略

## 2. 研究の目的

本課題では、繊維・粒子状物質に曝露した実験動物や培養細胞における miRNA の発現をマイクロアレイで網羅的に解析する。miRNA の発現レベルの変動を統計学的に解析し、新規バイオマーカー候補となりうる miRNA を探索して、繊維・粒子状物質のリスク評価法の確立を目指す。本課題では、以下のテーマについて研究を行った。

1) 石綿を気管内投与したマウスの肺組織における miRNA 発現を解析し、クリソタイル(白石綿)およびクロシドライト(青石綿)による発現量の変動を解析する。

2) 黄砂およびその主成分である二酸化珪素(シリカ)を気管内投与したマウスの肺組織における miRNA 発現を解析する。

3) ナノ素材の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)をヒトマクロファージ培養細胞に添加して培養し、miRNA 発現を解析する。

本研究の学術的な特色は、miRNA 発現と化学物質曝露との関連を毒性学的な観点から明らかにし、健康障害の分子機構を新たな視点から解明する点である。また、化学物質により誘導される miRNA は、曝露・リスク評価のバイオマーカーになりうるとともに、疾病の予防や治療の標的分子として臨床的に応用されること可能性が期待できる。その結果、労働者や地域住民の健康保持と疾病予防を目指す環境・産業医学分野の研究を学術的かつ実践的な面で発展させることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 繊維・粒子状物質に曝露した実験動物モデルの作成: 1) ICR 雄性マウス(6週齢)に石綿(クリソタイルあるいはクロシドライト、0.05 mg/回)を1週間ごとに4回気管内投与し、翌日肺組織を摘出して凍結保存した。2) 上記1)と同様のマウスに黄砂(中国シャバトウ砂漠から採取)あるいはその主成分である二酸化珪素(シリカ)を1週間ごとに4回(0.2 mg/回)気管内投与し、翌日肺組織を摘出して凍結保存した。

(2) 培養細胞の繊維・粒子状物質への曝露: ヒト単球系培養細胞株の THP-1 をホルボールエステル的一种である phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) で二晩処理し、マクロファージ様細胞に分化させた。ナノ素材の MWCNT を細胞培地に懸濁し、超音波ホモジナイザーで凝集体を分散して実験に用いた。分散した MWCNT を細胞に添加し、24時間反応させた後で細胞を回収した。

(3) miRNA 発現の網羅的解析: 上記の動物の肺組織および培養細胞から、mirVana<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit (Ambion 製) を用いて miRNA を含む total RNA を抽出した。RNA を蛍光色素 (Cy3) でラベルし、マイクロアレイと一晩ハイブリダイズした。専用スキャナー (Agilent Technology 製) を用いてマイクロアレイを画像として読み取り、専用ソフトウェア Feature Extraction で画像を解析して各 miRNA の発現量のデータを得た。さらにデータ解析ソフトウェア GeneSpring を用いて、繊維・粒子状物質により統計学的に有意に発現レベルが変動する miRNA を同定した。

## 4. 研究成果

(1) 石綿曝露マウスの肺組織における miRNA 発現: 石綿(クリソタイルあるいはクロシドライト)をマウスに気管内投与して肺組織における miRNA 発現をマイクロアレイで網羅的に解析した。対照群、クリソタイル曝露群およびクロシドライト曝露群の3群間の miRNA の発現量の差を一元配置分散分析 (ANOVA) により統計学的に解析した。その結果、対照群に比して統計学的有意差を有し、かつ2倍以上発現量が変動する miRNA が、クリソタイル曝露群では24種類認められたが、クロシドライト曝露群では5種類のみであった。クリソタイルとクロシドライトの両者で有意に増加した miRNA は3種類、両者で減少したのは1種類であった。また、クリソタイルのみ有意に増加した miRNA は1種類、減少したのは19種類存在した。クロシドライトのみで増加したのは1種類であった。またクリソタイルとクロシドライトの両群

間で発現量の有意差を認めた miRNA は 17 種類認められた。したがって、miRNA の発現パターンは、石綿の種類によって異なる可能性が示唆された。

(2) 黄砂およびシリカ曝露マウスの肺組織における miRNA 発現：黄砂あるいはその主成分であるシリカを気管内投与してマウスの肺組織の miRNA 発現を上記(1)と同様の方法で解析した。その結果、対照群に比して統計学的有意差を有し、かつ 2 倍以上発現量が増加する miRNA が、黄砂曝露群では 19 種類、シリカ曝露群では 21 種類認められた。両者で有意に増加した miRNA が 10 種類、黄砂あるいはシリカの一方のみで有意に増加した miRNA が、それぞれ 9 種類および 11 種類認められた。上記(1)のクリソタイルおよびクロシドライトの両者で発現量が有意に増加した 3 種類の miRNA については、黄砂やシリカでも増加していた。しかし、その他の miRNA については、石綿と異なる発現パターンを示す傾向があった。

今後は、上記の(1)および(2)で同定した miRNA の標的遺伝子を国際的なデータベースで探索するとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析、およびリアルタイム PCR やウェスタンブロッティングによる遺伝子発現解析を行う予定である。その結果をもとに、バイオマーカーとして有用な miRNA を同定し、その医学・生物学的意義を明らかにしていく。

(3) MWCNT で処理した培養細胞における miRNA 発現：PMA でヒトマクロファージ様細胞に分化させた THP-1 細胞に MWCNT を添加して培養し、miRNA の発現を解析した。マイクロアレイ解析では 7 種類の miRNA の発現量の有意な変動が見られた。そのうちのひとつである miR-27a の標的遺伝子を、国際的データベースの miRBase, TargetScan および PicTar で探索した。これらの全てに共通して収載されている標的遺伝子は 65 個あり、そのうち特にチオレドキシニン 2 (TXN2) に注目した。TXN2 はミトコンドリアを酸化ストレスから保護し、細胞死の一種であるアポトーシスに関わるシトクロム c のミトコンドリアから細胞質への放出を抑制している。リアルタイム PCR で miR-27a および TXN2 の発現を解析した結果、MWCNT により、有意ではないがそれぞれの発現量が増加および減少した。したがって、miR-27a による TXN2 の発現抑制が、MWCNT による細胞傷害に部分的に寄与する可能性が考えられる。

また、繊維・粒子状物質による DNA 損傷に関しても研究を行っており、その成果を以

下に紹介する。

(4) ヒト肺における石綿繊維量と DNA 損傷との関連：ヒト肺組織の剖検あるいは手術標本を得て、透過型分析電顕法により、乾燥組織重量あたりの石綿 [クリソタイルおよび角閃石系石綿 (クロシドライト、アモサイトなど)] の繊維数を計測した。また、DNA 損傷塩基の生成については、炎症条件下で生成される 8-ニトログアニンに対する抗体を独自に作成して免疫組織染色を行った。その染色強度を画像解析ソフトで定量化し、石綿繊維数との相関を統計学的に解析した。非常に興味深いことに、8-ニトログアニンの染色強度は角閃石系石綿の量と有意に相関したが、クリソタイルの量とは相関を認めなかった。以上の結果から、8-ニトログアニンは石綿の曝露評価および発がんリスク評価の指標として応用できる可能性が期待される。この成果は 2011 年日本産業衛生学会優秀演題に選出された (論文作成中)。また本研究は、三重大学医学部倫理審査委員会の承認のもとで行った。

(5) MWCNT で処理した培養細胞における DNA 損傷：ヒト肺胞上皮由来の A549 細胞を MWCNT で処理し、8-ニトログアニン生成について蛍光免疫染色法で解析した。8-ニトログアニンの染色強度は MWCNT の濃度に依存して増加し、類似の先行研究より低濃度かつ短時間で有意に DNA 損傷が起こることを明らかにした。また、8-ニトログアニンの生成はエンドサイトーシス阻害剤により抑制されたことから、細胞内に取り込まれた MWCNT の粒子が、炎症反応の惹起および DNA 損傷に重要な役割を果たすと考えられる (*Toxicol Appl Pharmacol* 2012)。さらに、繊維長の長い MWCNT は短いものより強い細胞毒性および 8-ニトログアニン生成能を有することを明らかにしている (論文作成中)。

以上の結果から、miRNA およびニトロ化 DNA 損傷塩基が繊維・粒子状物質の曝露あるいはリスク評価指標となりうる可能性が示唆された。

#### 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 14 件)

1. Guo F, Ma N, Horibe Y, Kawanishi S, Murata M, Hiraku Y. Nitrate DNA damage induced by multi-walled carbon nanotube via endocytosis in human lung epithelial cells, *Toxicol. Appl.*

- Pharmacol.* 査読有, **260**: 183-192 (2012), doi: 10.1016/j.taap.2012.02.010.
- Prakobwong S, Charoensuk L, Hiraku Y, Pinlaor P, Pairojkul C, Mairiang E, Sithithaworn P, Yongvanit P, Khuntikeo N, Pinlaor S. Plasma hydroxyproline, MMP-7 and collagen I as novel predictive risk markers of hepatobiliary disease-associated cholangiocarcinoma. *Int. J. Cancer* 査読有, **131**: E416-424 (2012), doi: 10.1002/ijc.26443
  - Thanan R, Oikawa S, Yongvanit P, Hiraku Y, Ma N, Pinlaor S, Pairojkul C, Wongkham C, Sripa B, Khuntikeo N, Kawanishi S, Murata M. Inflammation-induced protein carbonylation contributes to poor prognosis for cholangiocarcinoma. *Free. Radic. Biol. Med.* 査読有, **52**: 1465-1472 (2012), doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.018.
  - Mo Y, Midorikawa K, Zhang Z, Zhou X, Ma N, Huang G, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. Promoter hypermethylation of Ras-related GTPase gene RRAD inactivates a tumor suppressor function in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 査読有, **323**: 147-154 (2012), doi: 10.1016/j.canlet.2012.03.042
  - Prakobwong S, Khoontawad J, Yongvanit P, Pairojkul C, Hiraku Y, Sithithaworn P, Pinlaor P, Aggarwal BB, Pinlaor S. Curcumin decreases cholangiocarcinogenesis in hamsters by suppressing inflammation-mediated molecular events related to multistep carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 査読有, **129**: 88-100 (2011), doi: 10.1002/ijc.25656.
  - Prakobwong S, Gupta SC, Kim JH, Sung B, Pinlaor P, Hiraku Y, Wongkham S, Sripa B, Pinlaor S, Aggarwal BB. Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways. *Carcinogenesis* 査読有, **32**: 1372-1380 (2011), doi: 10.1093/carcin/bgr032
  - Ma N, Thanan R, Kobayashi H, Hammam O, Wishahi M, Leithy TE, Hiraku Y, Amro el K, Oikawa S, Ohnishi S, Murata M, Kawanishi S. Nitrate DNA damage and Oct3/4 expression in urinary bladder cancer with *Schistosoma haematobium* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, **414**: 344-349 (2011), doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.073.
  - Ohnishi S, Saito H, Suzuki N, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage caused by K-ras mutation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, **413**: 236-240 (2011), doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.076.
  - Feiye Guo, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, 平工雄介, 多層カーボンナノチューブによる細胞内ニトロ化 DNA 損傷: 酸化 DNA 損傷との比較, 第 83 回日本衛生学会総会, 金沢市, 2013 年 3 月 24~26 日
  - 平工雄介, Feiye Guo, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, 多層カーボンナノチューブによる DNA 損傷: 肺上皮細胞における 8-ニトログアニン生成, 第 12 回分子予防環境医学研究会, つくば市, 2013 年 2 月 1~2 日
  - 平工雄介, Feiye Guo, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, カーボンナノチューブによる細胞内ニトロ化 DNA 損傷, フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 名古屋市, 2012 年 10 月 25~26 日
  - 平工雄介, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, ヒト肺における石綿繊維量と酸化・ニトロ化 DNA 損傷との関連, 第 71 回日本癌学会総会, 札幌市, 2012 年 9 月 19~21 日
  - Yusuke Hiraku, Kiyoshi Sakai, Eiji Shibata, Michihiro Kamijima, Naomi Hisanaga, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Nitrate DNA damage in human lung tissues in association with asbestos exposure, The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Edinburgh, UK, 2012 年 7 月 22~26 日
  - Feiye Guo, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Yusuke Hiraku, Nitrate DNA damage in human lung epithelial cells treated with multi-walled carbon nanotube, The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Edinburgh, UK, 2012 年 7 月 22~26 日
  - 平工雄介, Feiye Guo, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, 多層カーボンナノチューブによる細胞内 8-ニトログアニン生成, 第 12 回日本 NO 学会学術集会, 神戸市, 2012 年 6 月 29~30 日
  - 平工雄介, 酒井潔, 柴田英治, 上島通浩, 久永直見, 村田真理子, ヒト肺組織における石綿繊維量と酸化・ニトロ化 DNA 損傷および DNA 修復酵素発現との関連, 第 85 回日本産業衛生学会, 名古屋市, 2012 年 5 月 30 日~6 月 2 日
  - 平工雄介, 酒井潔, 柴田英治, 上島通浩, 久永直見, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, ヒト肺組織における石綿繊維量と DNA 損傷との関連, 第 82 回日本衛生学会総会, 京都市, 2012 年 3 月 24~26 日
  - 平工雄介, 感染・炎症関連発がんにおける酸化・ニトロ化 DNA 損傷: その役割と意義, 日本薬学会東海支部特別講演会(招待講演), 名古屋市, 2012 年 1 月 24 日

[学会発表] (計 32 件)

11. Feiye Guo, 馬寧、川西正祐、村田真理子、平工雄介、多層カーボンナノチューブで処理したヒト肺上皮細胞におけるニトロ化 DNA 損傷、第 70 回日本癌学会総会、名古屋市、2011 年 10 月 3～5 日
12. 平工雄介、酒井潔、柴田英治、上島通浩、久永直見、村田真理子、ヒト肺組織における酸化・ニトロ化 DNA 損傷と石綿曝露との関連、第 84 回日本産業衛生学会(優秀演題)、東京、2011 年 5 月 18～20 日
13. 平工雄介、西川嘉広、馬寧、川西正祐、村田真理子、ヒト肺上皮細胞におけるカーボンブラックナノ粒子によるニトロ化 DNA 損傷、第 11 回日本 NO 学会学術集会、町田市、2011 年 5 月 13～14 日

[図書] (計 2 件)

1. Hiraku Y. Role of chronic inflammation and resulting DNA damage in cervical carcinogenesis induced by human papillomavirus, In: *Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research aspects,*

- Broeck DV (ed.), InTech, pp. 359-382 (2012)
2. Ma N, Murata M, Ohnishi S, Thanan R, Hiraku Y, Kawanishi S. 8-Nitroguanine: A potential biomarker to evaluate the risk of inflammation-related carcinogenesis, In *Biomarker*, Kahn TK (Ed.), InTech, pp. 201-224 (2012)

[その他]

ホームページ: 三重大学大学院医学系研究科環境分子医学分野

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/eiseigaku/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平工 雄介 (HIRAKU YUSUKE)

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 30324510