

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24年4月10日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2011

課題番号：23890118

研究課題名（和文） microRNA-34b/c の発現抑制による悪性中皮腫細胞モデルの作成

研究課題名（英文） Establishment a model of human malignant mesothelial cells by down-regulation of microRNA-34

研究代表者

上野 剛 (UENO TSUYOSHI)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：80509456

研究成果の概要（和文）：

マイクロ RNA (miRNA) は複数の蛋白発現を抑制し、癌化に関与している。悪性中皮腫では miRNA-34 (miR-34) の発現が低下しており、発癌と関連性があること判明した。本研究は、正常中皮細胞において、miR-34 の発現を強制的に抑制することで、中皮腫細胞モデルを作成し、機序を解明することを目的とした。正常中皮細胞株の miR-34 の発現を低下させると、細胞増殖能は、約 2 倍に増加し、癌の転移に関係する遊走能、浸潤能は、約 1.5 倍の増加を認めた。また、癌関連蛋白である、MET、bcl-2 の蛋白の発現の増加を認めた。正常中皮細胞において、miR-34 の発現の低下は、早期の発癌現象の一因であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Malignant mesothelioma (MM) is an aggressive tumor with a dismal prognosis. We previously reported that microRNA-34 (miR-34) are methylated and down-regulated in MM and may play an important role in the carcinogenesis of MM. In this study, we down-regulated miR-34 in human mesothelial cells to investigate the cellular effect of miR-34 knockdown. miR-34 inhibitor transfection significantly increased cell proliferation. The invasive ability also increased in the miR-34 inhibitor transfectants. the up-regulation of c-Met, phospho-c-Met, and bcl-2 proteins were shown. In conclusion, the down-regulation of miR-34 induced an oncogenic phenotype in non-malignant mesothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：悪性胸膜中皮腫

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：microRNA、microRNA-34、中皮腫、正常中皮

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は non-coding RNA の 1 つであり RNA 干渉能を有する。ヒトでは messenger RNA (mRNA) に作用し、mRNA から

蛋白質への翻訳を抑制する。通常、1つの miRNA は複数の蛋白質の翻訳を制御しているため、結果的に多くの機能に関わっている。また、腫瘍抑制性の miRNA が標的とする分子は多くの場合、腫瘍原性に働く分子であり、

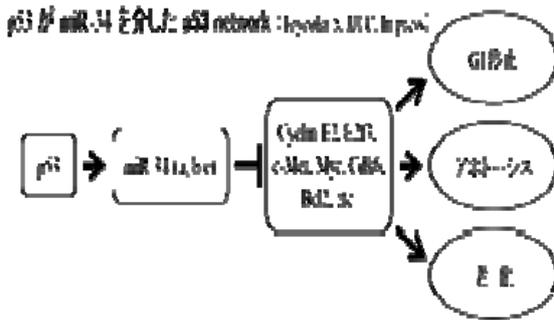
ひとつの miRNA が多くの癌化機構を支配することが予想される。

miRNA-34 family (miR-34s) は miR-34a, b/c からなっており、アポトーシス、細胞周期、不死化などの多くの機能に関わっている。特に、miR-34s は p53 が転写因子であり miR-34s の発現異常はゲノムの安定化を含めた p53 network の機能不全を惹起する。

我々の検討で、中皮腫では特に miR-34b/c の発現が低下していることが判明し、miR-34b/c が中皮腫の癌化に重要な miRNA であることが示唆された。

これまでに申請者は、miR-34b/c の高頻度のメチル化による発現低下を悪性中皮腫細胞株 [100% (6 細胞株を検索)]、腫瘍検体 [85.1% (47 検体を検索)] に認め、さらに、miR-34b/c を腫瘍細胞に導入すると、著明な細胞増殖能、遊走・浸潤能の低下が起こることを発見した (Kubo F, Ueno T. et al. Clin Can Res. 2011)。

以上より、miR-34b/c の発現低下は中皮腫の発生機構に関与していることが示唆された。



研究の目的

中皮腫は予後の不良な悪性腫瘍であり、現在の社会事情も踏まえ、新しい治療法、予防法を速やかに開発すべき疾患である。このためには腫瘍モデルの確立が大変有用であるが、現在まで、ヒト中皮腫の分子異常に着目し、樹立した中皮腫細胞モデルの報告はない。

miR-34s のノックダウンは、癌抑制遺伝子である p53 の機能不全につながるため、結果的にゲノムの不安定化をきたし、細胞分裂を伴う細胞継代中に多段階的に癌化に向かう可能性がある*。

(* p53 と結合し p53 の機能を阻害する simian virus 40 を正常中皮細胞に感染させ継代を重ねた結果、段階的な中皮細胞の形態の変化、テロメラーゼ活性の上昇、腫瘍抑制遺伝子の発現低下等が示された。)

本研究は miR-34s に注目し、正常中皮細胞における miR-34s の発現を強制的に抑制することで、中皮腫の細胞モデルを作成することを目的とした。

2. 研究の方法

正常中皮細胞株に miR-34s のアンチセンスオリゴ (miR-34s inhibitor) を導入し、対象群には control オリゴを一過性に導入した。蛋白質の発現、細胞増殖能、遊走・浸潤能の変化を検討した。

<正常中皮細胞>

細胞株：LP-9

検体：正常胸水より採取した中皮細胞を初代培養した 3 細胞株 (HPMC)

*当初、使用予定であった Met5A は、他の正常中皮細胞株と比較すると、導入前より増殖能が強く、今回の検討から除外した。

<方法>

蛋白発現：Western blotting 法

細胞増殖能：MTS assay 法、

Colony formation assay 法

遊走・浸潤能：Boyden chamber assay 法

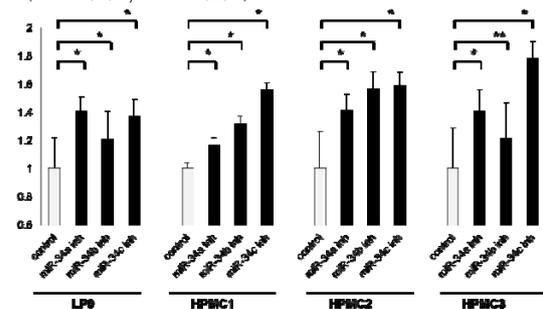
アンチセンス導入による効果を検討したのち、正常中皮細胞にアンチセンス発現プラスミドベクターを導入し、stable clone を樹立、同様に蛋白発現、増殖能等を検討する。また、stable clone の継代を続け、細胞形態、contact inhibition の消失、足場非依存性の増殖能を検討し、腫瘍形質獲得を確認する。腫瘍形質獲得までの stable clone 中の蛋白発現・修飾等を検討し、中皮細胞の癌化の過程における分子腫瘍学的特徴を解析する。

3. 研究成果

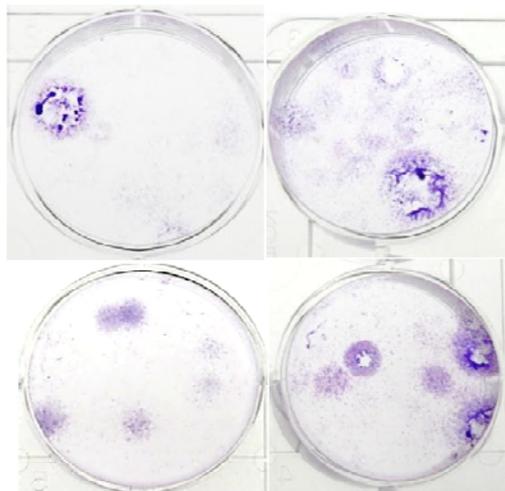
miR-34s inhibitor の導入により、miR-34a, miR-34b, miR-34c の発現は 70-80%抑制されていることを確認した。

増殖能は、miR-34s inhibitor 導入群 (miR-34s 群) は、control オリゴ導入群 (対象群) と比較し、MTS assay で、1.2-1.6 倍の増殖能の増加を認めた。

(* P < 0.01, ** P = 0.01)

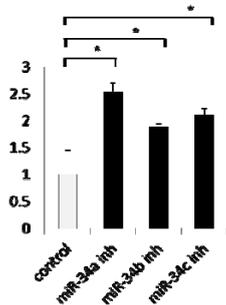


Colony formation assay では、2-2.5 倍の増殖能を認めた。(LP-9)



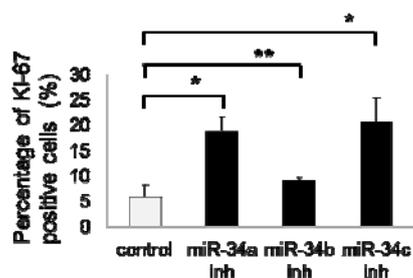
control	miR-34a inh
miR-34b inh	miR-34c inh

(* $P < 0.01$)



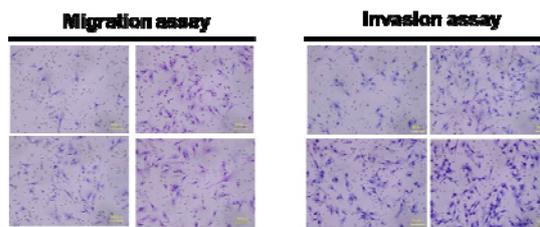
また、細胞の増殖能の反映する Ki-67 の免疫染色では、miR-34s 群 (miR-34a 群と miR-34c 群) で 4 倍の増殖を認めた。(LP-9)

(* $P < 0.01$, ** $P = 0.09$)



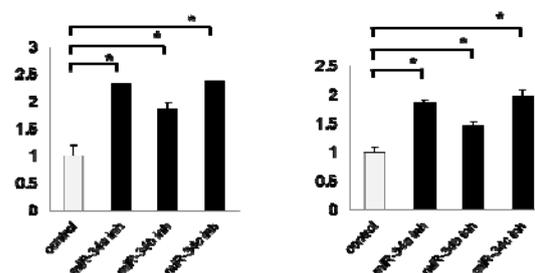
遊走能、浸潤能は、LP-9 では、miR-34s 群

と共に 1.5-2 倍の促進を認めた。

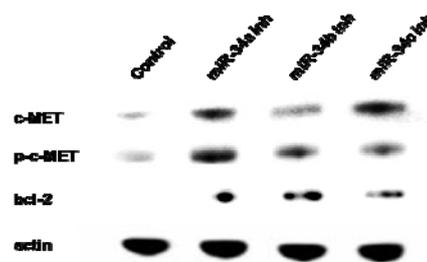


control	miR-34a inh
miR-34b inh	miR-34c inh

(* $P < 0.01$)



蛋白の発現の変化は、miR-34s 群で、癌細胞の増殖や転移に関与するとされる MET の発現の増加やリン酸化の亢進を認め、抗アポトーシスタンパクである bcl-2 の増加を認めた。



今回の検討で解明したことは、正常中皮細胞において、miR-34s の発現の低下は、早期の発癌現象の一因であることがわかった。

正常中皮細胞にアンチセンス発現プラスミドベクターを導入し、細胞株の樹立を試みたが、腫瘍形成までは至らず、樹立はできなかった。

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)

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 発表者：田中則光
発表表題：Down-regulation of microRNA34
induces cell proliferation and invasion
of human mesothelial cells
学会名：AACR Annual Meeting 2012
発表年月日：2012 年 4 月 1 日
場所：シカゴ（アメリカ）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 剛 (UENO TSUYOSHI)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：80509456

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者