様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ５ 月 １９ 日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：２５８６０２９２

研究課題名（和文）発がん動物モデルを用いた悪性中皮腫におけるTwist-1の機能解析

研究課題名（英文）Functional analyses of Twist-1 in malignant mesothelioma using animal carcinogensis model.

研究代表者
岡崎　泰昌（OKAZAKI, YASUMASA）

名古屋大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：３０４０３４８９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究助成により、カーボンナノチューブ(CNT)誘発腹膜中皮腫においても肉腫型にTwist-1 が発現することを明らかにした。アスベスト誘発、CNT誘発腹膜中皮腫におけるTwist-1の発現はラットの生存日数に有意な影響を与えなかったが、Twist-1/MDM2, Ki67 の発現が相関する傾向が見られ、Twist-1 は生体内でも中皮腫細胞を増殖する作用が有ることが示唆された。Twist-1 の発現を誘導し得ると文献報告されている転写因子の発現を検討したところ、CNT誘発中皮腫において、Twist-1とHIF1alpha の発現に相関が見られた。

研究成果の概要（英文）：With the aid of this grant, Twist-1 is also detected in carbon nanotubes (CNT)-induced SM. The expression of Twist-1 was not significantly affected the life span in asbestos and CNT-induced rat MM. The expression of MDM2, which is induced by Twist-1 and works to degradate p53, and Ki67, which is a marker for cellular proliferation, were associated with Twist-1 expression. These results suggest that Twist-1 has potent proliferative effect on MM in vivo. The examination for the expression of transcriptional factors, which are reported to be a candidate for the induction of Twist-1, disclosed the relation between Twist-1 and HIF1alpha expression in CNT-induced rat MM.

研究分野：実験病理学

キーワード：中皮腫　Twist-1　鉄　酸化ストレス

１．研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、アスベスト吸入と疫学的に相関があり、進行した状態で発見されることが多い予後不良な疾患である。本邦ではアスベストの使用は原則禁止されたが、本邦での中皮腫発症のピークは 2025-2030 年頃が推測され、今後も患者数の増加が危惧されている。商業的に利用されて来たアスベスト線維は 3 種類に大別され、クロシドライト [Na2(Fe3+)2(Fe2+)3Si8O22(OH)2]、アモサイト[(Fe,Mg)7Si8O22(OH)2]、クリソタイル [Mg6Si4O10(OH)8]である。疫学的な発がん性は、クロシドライト：アモサイト：クリソタイルで 500:100:1 と、鉄が豊富なアスベスト線維は発がん性が高いことが報告されている。アスベスト線維から発がんに至る原因として、(1)鉄を介した酸化ストレス、(2)染色体不分離、(3)発がん分子の吸着、(4)慢性炎症が複合的に作用すると考えられている。報告者の所属する研究室では、独自の研究モデルである鉄化合物によるラット腹膜中皮腫を作成した。ヒト中皮腫は組織学的に肉腫型と上皮型に大別され、肉腫型中皮腫は進行が急速で予後不良因子であり、組織型が生物学的特性に影響する。報告者は、鉄化合物により誘発した中皮腫から microRNA(miR) を抽出してマイクロアレイ解析を行った。肉腫型中皮腫(2 例)、上皮型中皮腫(4 例)、非腫瘍性中皮(2 例)を用い、肉腫型中皮腫に特徴的な miR-199/214 を同定した。miR-199/214 の転写因子として報告されている (Lee YB, et al; Nucleic Acids Res, 37(1):123-128, 2009)、Twist-1 の高発現を肉腫型中皮腫に認めた。Twist-1 は E-Cadherin の発現抑制を介して上皮間葉転換を促進し、上皮性腫瘍の予後不良因子となることが報告されて来た (Ansieau S, et al; Oncogene, 29(22): 3173-3184, 2010)。中皮腫は肺がんなどの典型的な上皮性腫瘍と比較して、上皮型中皮腫であっても E-Cadherin の発現は低く、E-Cadherin の発現抑制以外の生物学的作用が存在することが考えられる。そのため、Twist-1 の発現とラットの生存日数に与える影響についても検討を行った。ヒト中皮腫は *p53* の遺伝子変異が少なく、最も高頻度に見られる遺伝子変異は、*CDKN2A/2B(p15/16)* 領域のホモ欠失である。そのため、p53 を不活化する分子機構は中皮腫の発症に重要であることが考えられる。Twist-1 は p53 を不活化する分子である MDM2 を誘導することが報告されており、MDM2 の免疫染色と Twist-1 発現との相関関係の解析も施行した。また、鉄化合物誘発中皮腫では鉄を介した酸化ストレスが中皮腫の発症に重要な役割を果たしていることが考えられるため、酸化ストレスと関連するシグナル伝達機構の解析を行った。

２．研究の目的

(1)　中皮腫における Twist-1 の役割

(2)　Twist-1 活性化機序の検索

(3)　鉄化合物中皮腫におけるシグナル伝達経路の探索

３．研究の方法

(1)アスベスト誘発(Asbestos)、カーボンナノチューブ誘発(CNT)、腹膜中皮腫を用いた免疫染色を行った。アスベスト誘発中皮腫は代表的なパラフィンブロックから作成した標本を用い、閾値を設定して高発現もしくは低発現と判定した。CNT 誘発腹膜中皮腫は、Tissue MicroArray (TMA) を作成し、陽性か陰性で判定した。また、標的分子の発現が生存日数に与える影響を検討した。

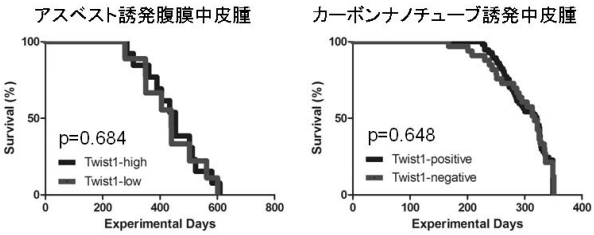
(2)Twist-1 の発現を誘導する転写因子と報告されている分子(NFκB, PPARδ, HIF1α)の発現と Twist-1 発現の相関関係を免疫染色で検討した。

(3)鉄化合物誘発腹膜中皮腫の凍結保存組織を用い、western blot によりシグナル伝達機構の解析を行った。

４．研究成果

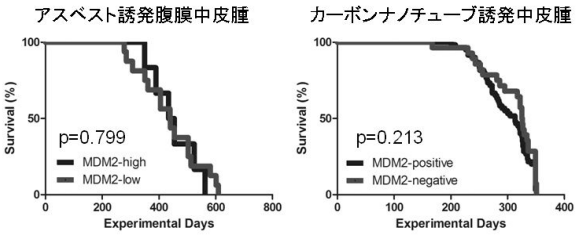
(1)-①. Twist-1 免疫染色

Asbestos, CNT 誘発腹膜中皮腫では、二相型と肉腫型中皮腫に集団を形成する胞巣性陽性像を認めた。乳頭状に増生する明瞭な上皮型中皮腫細胞には陽性細胞は認めなかった。Twist-1 の発現は生存率に有意な影響は認めなかった。



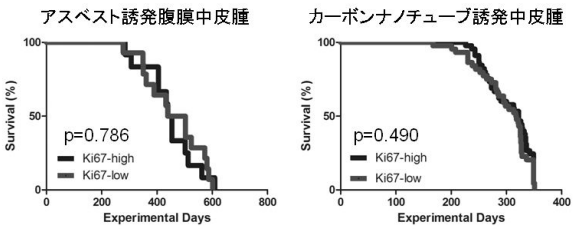
(1)-②. MDM2 (Murine Double Minute 2) 免疫染色

MDM2 免疫染色でも、集団を形成する胞巣性陽性像が見られ、Twist-1 陽性部位と一致している部位を多く認めた。MDM2 の発現は生存率に有意な影響を認めなかった。



(1)-③. Ki67 免疫染色

Ki67 は細胞の増殖マーカーであり、増殖能を評価する免疫染色である。中皮腫細胞の labeling index は 20 % 以上であった。Ki67



陽性細胞の偏りはあるものの、明瞭な集団性胞巣は見られなかった。Ki67 の高発現は生存率に有意な影響は認めなかった。

(1)-④.Twist-1 の発現と MDM2, Ki67 の発現の相関関係

Twist-1 と MDM2 の発現

アスベスト誘発腹膜中皮腫では Fisher's exact test では有意差は見られず相関傾向に留まっていたが、CNT 誘発中皮腫では発現に有意な相関が見られた。

アスベスト誘発腹膜中皮腫

		MDM2	
		high	low
Twist1	high	7	9
	low	1	9

Fisher's exact test; p=0.0989

カーボンナノチューブ誘発中皮腫

		MDM2	
		Positive	Negative
Twist1	Positive	46	11
	Negative	14	18

Fisher's exact test; p<0.001

Twist-1 と Ki67 の発現

アスベスト誘発腹膜中皮腫では Fisher's exact test では有意差は見られず相関傾向に留まっていたが、CNT 誘発中皮腫では発現に有意な相関が見られた。

アスベスト誘発腹膜中皮腫

		Ki67	
		High	Low
Twist1	Positive	10	6
	Negative	2	8

Fisher's exact test; p=0.0511

カーボンナノチューブ誘発中皮腫

		Ki67	
		High;50≥	Low
Twist1	Positive	34	23
	Negative	11	21

Fisher's exact test; p=0.028

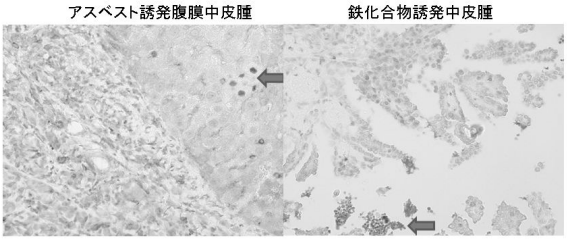
Twist-1 は MDM2, Ki67 の高発現と相関し、細胞増殖を促進すると考えられるが、生存日数を短縮する作用は明らかではなく、限定的な効果に留まると考えた。

(2). Twist-1 を転写する転写因子の検討

Twist-1 の発現を誘導する転写因子として報告されている、NFκB (Nulcear Factor kappa B), PPARδ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor delta), HIF1α (Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha) の免疫染色を行い、解析を行った。

NFκB 免疫染色

アスベスト誘発腹膜中皮腫　　鉄化合物誘発中皮腫

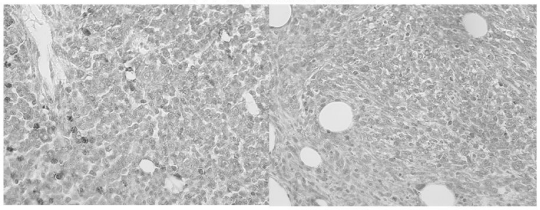


アスベスト誘発中皮腫では、一部の肝細胞に NFκB の核内移行像が見られたが(矢印)、中皮腫細胞に核内陽性像は見られなかった。鉄化合物誘発中皮腫では、NFκB の核内陽性像は好中球やリンパ球に見られたが(矢印)、中皮腫細胞に核内陽性像は見られなかった。そのため、NFκB の活性化を介したシグナル伝達経路はラット中皮腫モデルでは主要な経路ではないことが考えられる。しかし、アスベストの中皮細胞傷害機構において、(1)鉄を介した酸化ストレス、(4)慢性炎症は発がんに至る重要な病態であることが考えられており、NFκB シグナル伝達経路の活性化を抑制する抗酸化物質は発がんの化学予防に有望で、検証する価値がある方針と考える。

アスベスト誘発中皮腫を用いた免疫染色で、PPARδ の核内陽性像を認めたが、Twist-1 の発現との相関は認めなかった。

PPARδ 免疫染色

アスベスト誘発腹膜中皮腫



アスベスト誘発腹膜中皮腫

		PPARdelta	
		high	low
Twist1	high	9	7
	low	6	4

Fisher's exact test; p=1.0000

HIF1α の免疫染色を行い、Twist-1 の発現との相関解析では、アスベスト誘発中皮腫では相関関係が見られなかったが、CNT 誘発中皮腫では有意な相関関係が見られた。

アスベスト誘発腹膜中皮腫

		HIF1α	
		high	low
Twist1	high	7	9
	low	6	4

Fisher's exact test; p=0.6882

カーボンナノチューブ誘発中皮腫

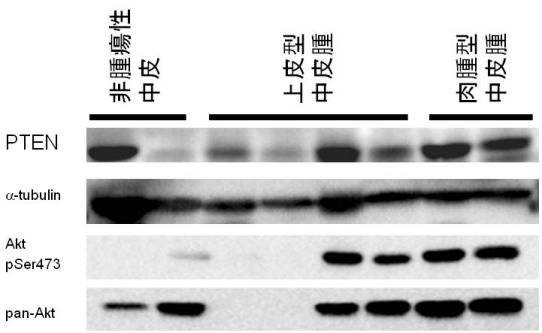
		HIF1α	
		Positive	Negative
Twist1	Positive	40	17
	Negative	12	20

Fisher's exact test; p=0.0036

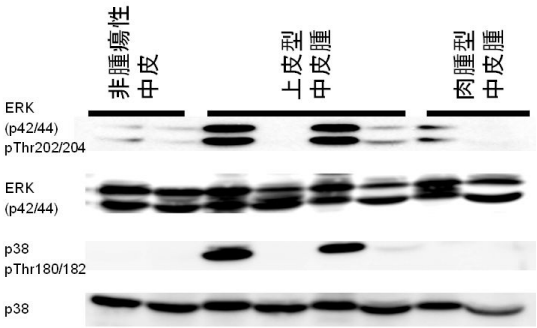
そのため、CNT 誘発中皮腫では HIF1α/Twist-1/MDM2 のシグナル伝達経路の活性化が中皮腫の発症や進展に重要な役割を果たしている可能性が考えられ、HIF1α の活性化の抑制は CNT 誘発中皮腫の発症や進展の予防に重要である可能性が考えられる。しかし、CNT 中皮腫検体を用いた NFκB や PPARδ の免疫染色は為されていないため、これらの Twist-1 の上流の転写因子についても Twist-1 の発現との相関の追加検討を行い、重要なシグナル伝達経路の同定が効果の高い予防方針の策定に必要と考える。

(3). シグナル伝達機構の解析

Akt シグナル伝達経路は中皮腫の生存シグナル伝達経路として重要であることが報告され、miR-214 の発現は PTEN の発現抑制を介して Akt シグナル伝達経路を活性化することが報告された。そのため、PTEN, Akt シグナル伝達経路の検討を western blot で行った。しかし、miR-214 の発現による PTEN 蛋白の発現抑制は見られず、Akt は上皮型、肉腫型の両方で活性化されてリン酸化蛋白になっており、組織型による有意な変化は認めなかった。



酸化ストレスがシグナル伝達に関与する p38, p42/44 ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) シグナル伝達経路についても検討を行った。上皮型、肉腫型といった組織型により明確に分かれるシグナル伝達経路は見られなかったが、上皮型では p38, ERK といった酸化ストレスに関連するシグナル伝達経路が活性化され易い傾向が見られた。



また、miR-199/214 を不死化中皮細胞(MeT5A)に導入した実験では、細胞内に還元型グルタチオン量の増加が見られ、Twist-1/miR-199/214 経路の活性化は酸化ストレス耐性を誘導し、p38, p42/44ERK の活性化を抑制する可能性も考えられる。

以上のように、本科学研究費助成事業を通じ、動物モデルを中心とする腹膜中皮腫における Twist-1 の機能解析を進めることが出来た。今回までの研究成果を踏まえ、さらに中皮腫の分子機構の解析が必要であると考えられた。

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　6　件）

(1) Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Uchida K, Kikkawa F, Hori M, Toyokuni S. Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules. **J Clin Biochem Nutr**. 55(3):207-215, 2014. 査読有

(2) Aierken D, Okazaki Y, Chew SH, Sakai A, Wang Y, Nagai H, Misawa N, Kohyama N, Toyokuni S. Rat model demonstrates a high risk of tremolite but a low risk of anthophyllite for mesothelial carcinogenesis. **Nagoya J Med Sci**. 76(1-2):149-160, 2014. 査読有

(3) Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Takeda K, Nakamura K, Utsumi F, Kajiyama H, Kano H, Okazaki Y, Toyokuni S, Maruyama S, Kikkawa F, Hori M. Plasma Medical Science for Cancer Therapy: Toward Cancer Therapy Using Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma. **IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE.** 42(12):3760-3764, 2014. 査読有

(4) Chew SH, Okazaki Y, Nagai H, Misawa N, Akatsuka S, Yamashita K, Jiang L, Yamashita Y, Noguchi M, Hosoda K, Sekido Y, Takahashi T, Toyokuni S. Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. **Carcinogenesis.** 35(1):164-172, 2014. 査読有

(5) Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Yasui H, Toyokuni S. Deferasirox induces mesenchymal-epithelial transition in crocidolite-induced mesothelial carcinogenesis in rats. **Cancer Prev Res (Phila).** 6(11): 1222-1230, 2013. 査読有

(6) Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Miyata Y, Shinohara H, Toyokuni S. Intraperitoneal administration of tangled multiwalled carbon nanotubes of 15 nm in diameter does not induce mesothelial carcinogenesis in rats. **Pathol Int.** 63(9):457-462, 2013. 査読有

〔学会発表〕（計　11　件）

-2014 年度-

(1) Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Uchida K, Kikkawa F, Hori M, Toyokuni S. NON-EQUILIBRIUM ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA (NEAPP) GENERATES OXIDATIVE INJURY. IWPCT-2 (International Workshop on Plasma for Cancer Treatment-2)
(名古屋大学：愛知県名古屋市、3/16, 17)

(2) Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Uchida K, Kikkawa F, Hori M, Toyokuni S. Non-equilibrium atmospheric pressure plasma (NEAPP) generates oxidative injury. 第 73 回日本癌学会学術総会
(パシフィコ横浜：神奈川県横浜市、9/25-27)

(3) 岡崎泰昌、王越、田中宏昌、水野正明、中村香江、梶山広明、加納浩之、内田浩二、吉川史隆、堀勝、豊國伸哉。 非平衡大気圧プラズマは酸化ストレスを生じる。 第 38 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
（仙台国際センター：宮城県仙台市、9/6, 7）

(4) 岡崎泰昌、王越、田中宏昌、水野正明、中村香江、梶山広明、加納浩之、内田浩二、吉川史隆、堀勝、豊國伸哉。 非平衡大気圧プラズマは酸化ストレスを生じる。 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会
（同志社大学今出川キャンパス：京都府京都市、9/4, 5）

(5) 岡崎泰昌、王越、田中宏昌、水野正明、中村香江、梶山広明、加納浩之、内田浩二、吉川史隆、堀勝、豊國伸哉。 非平衡大気圧プラズマは酸化ストレスを生じる。 第 11 回病理学会カンファレンス
(六甲山ホテル：兵庫県神戸市、8/1, 2)

(6) Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M, Toyokuni S. Non-equilibrium atmospheric pressure plasma (NEAPP) generates oxidative injury. ICPM-5 (International Conference on Plasma Medicine 5)
(奈良県新公会堂：奈良県奈良市、5/18-23)
-2013 年度-
(7) Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M, Toyokuni S. Non-equilibrium atmospheric pressure plasma (NEAPP) generates oxidative injury. SFRRI 2014 (Society for Free Radical Research International 2014)
(京都国際会館：京都府京都市、3/23-26)
(8) Okazaki Y, Nagai H, Funahashi S, Chew SH, Yeh M, Yeh KY, Glass J, Toyokuni S. DAP (DMT1 ASSOCIATED PROTEIN) REGULATES CELL PROLIFERATION THROUGH THE REGULATION OF DMT1 (IRE). 6 th Biennial meeting of Society for Free Radical Research-Asia
(台北、台湾、10/16-19) **Informa Healthcare Prestigious Poster Award 受賞**
(9) 岡崎泰昌、永井裕崇、周珊瑚、蒋麗、舟橋諭美、辻村亨、豊國伸哉。 CD146, IMP3 の過剰発現はアスベスト誘発ラット悪性腹膜中皮腫の生存期間を短縮する。 第 37 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
(JA 共済ビル：東京都 23 区内、9/7, 8)
(10) 岡崎泰昌、永井裕崇、周珊瑚、蒋麗、舟橋諭美、辻村亨、豊國伸哉。 CD146, IMP3 の過剰発現はアスベスト誘発ラット悪性腹膜中皮腫の生存期間を短縮する。 第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会
(ウインク愛知：愛知県名古屋市、6/13, 14)
(11) 岡崎泰昌。 実験病理学分野における若手研究者のアメリカ留学の一例 第102回日本病理学会総会
(ロイトン札幌：北海道札幌市、6/6-8) **オープンフォーラム「若手病理医たちよ、いざ海外へ！ー留学へのいざない」**の演者

〔図書〕(計 3 件)
(1)**改訂第二版 酸化ストレスの医学**
監修：吉川敏一、編集：内藤裕二、豊國伸哉
総ページ数：444
題目：Section 10 鉄代謝と酸化ストレス (p83-90)
岡崎泰昌、豊國伸哉
診断と治療社、2014
(2)**ロビンス 基礎病理学 原書 9 版**
監訳：豊國伸哉、高橋雅英 総ページ数：1087
題目：第 16 章 膵臓 (p765-776)
岡崎泰昌
丸善出版、エルゼビア・ジャパン、2014
(3)**活性酸素の本当の姿**
編集：鈴木敬一郎 総ページ数：176
題目：第 7 章 活性酸素とがん 発がんと鉄を介した酸化ストレス (p113-134)
岡崎泰昌、豊國伸哉
ナップ、2013

6．研究組織
(1)研究代表者
岡崎 泰昌（OKAZAKI, Yasumasa）
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30403489
(2)研究分担者
研究分担者 なし