

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19423

研究課題名(和文)アスベスト関連疾患の早期診断・指標の開発：エクソソーム内包microRNAの解析

研究課題名(英文)Development of early diagnosis and indicators of asbestos-related diseases:
analysis of microRNAs in exosomes

研究代表者

友永 泰介 (Tomonaga, Taisuke)

産業医科大学・産業生態科学研究所・助教

研究者番号：20721707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アスベストばく露特異的な指標を探索するため、アスベストと結晶質シリカを用いた培養細胞実験と気管内注入試験を行い、エクソソーム内包マイクロRNA(Exo-miRNA)の網羅的遺伝子解析、リアルタイムPCR解析を実施した。選定されたラット気管支肺胞洗浄液中Exo-miRNAは、ばく露急性期でアスベスト用量依存性に発現が有意に低下し、肺炎症の指標とも相関が認められた。ラット血清中Exo-miRNAも急性期で、肺内のアスベスト本数や肺炎症の指標と相関を認めた。これらのExo-miRNAは、アスベストばく露の有無を評価・予測するExo-miRNAとして、特に急性期での評価に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスベスト関連疾患の早期発見・診断指標の開発は、初発症状に乏しく進行して症状が発現することの多い悪性胸膜中皮腫の発症予防にとって重要である。本試験では、ラットを用いたエクソソームに内包されたマイクロRNA(Exo-miRNA)の解析で選定されたExo-miRNAは、アスベストばく露の有無を評価・予測するとして、アスベストばく露の急性期での評価に有用性が示唆された。将来的にExo-miRNAによるアスベストばく露の予測指標の開発の一助となる可能性があり、悪性胸膜中皮腫発症のリスクを低下させることに貢献することが予測される。

研究成果の概要(英文)：To search for asbestos exposure-specific indicators, cell culture experiments and intratracheal instillation using asbestos and crystalline silica were conducted, and comprehensive genetic and real-time PCR analyses of microRNAs in exosomes (Exo-miRNA) were performed. The expression of Exo-miRNA in rat bronchoalveolar lavage fluid was significantly decreased in a dose-dependent manner in the acute phase of asbestos exposure and was also correlated with indicators of lung inflammation. Exo-miRNAs in rat serum also correlated with the number of asbestos in the lungs and indicators of lung inflammation during the acute phase of exposure. These Exo-miRNAs were suggested to be useful as Exo-miRNAs to evaluate and predict the presence of asbestos exposure, especially in the acute phase.

研究分野：呼吸病態学

キーワード：アスベスト エクソソーム マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベストばく露が発生の原因と考えられている。悪性胸膜中皮腫は極めて悪性度が高いにもかかわらず初発症状に乏しいことが多く、進行して症状が発現することが多い。外科的治療は容易ではなく、たとえ切除ができて術後の QOL が低下することや再発率が必ずしも低くはないことが問題となっている。このため、できるだけ早期にアスベストばく露による生体変化を検出できることが望ましい。またアスベストによる影響は、悪性胸膜中皮腫以外にもアスベスト肺や両性石綿胸水などのアスベスト関連疾患が起こることが知られており、アスベスト関連疾患の早期発見・診断指標の開発は悪性胸膜中皮腫発症予防にとっても重要であると考えられる。

2. 研究の目的

アスベストばく露特異的な指標を探索するため、気管内注入試験 (in vivo 実験) と培養細胞実験 (in vitro 実験) を実施し、アスベストばく露量と分泌されたエクソソームに内包されたマイクロ RNA (Exo-miRNA) の解析の結果から、量反応関係がみられる、アスベスト特異的 Exo-miRNA を探索した。

3. 研究の方法

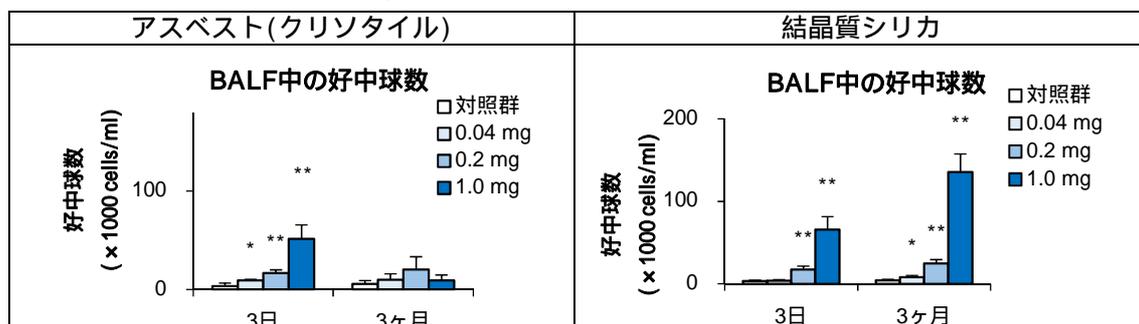
アスベスト(クリソタイル)と非アスベストとして結晶質シリカを用いて、ラットの気管内注入試験と培養細胞実験 (in vitro 実験) を実施した。気管内注入試験 (in vivo 実験) は、クリソタイルと結晶質シリカをそれぞれお 3 用量 (0.04、0.2、1.0 mg/rat) と溶媒の蒸留水をラットの気管内に注入し、3 日、3 ヶ月後に解剖と採血を実施した (1 群 5 匹)。気管支肺泡洗浄液 (BALF) および血清中から精密濾過法でエクソソームを単離し、Exo-miRNA の網羅的な発現解析を実施した。培養細胞実験では、ヒト不死化正常中皮細胞とマウス不死化正常肺胞上皮細胞にそれぞれクリソタイルと結晶質シリカを各 2 用量投与した (5.8、58 μ g/ml)。投与後 72 時間の培養上清を回収し、精密濾過法でエクソソームを単離し、Exo-miRNA の網羅的な発現解析を実施した。

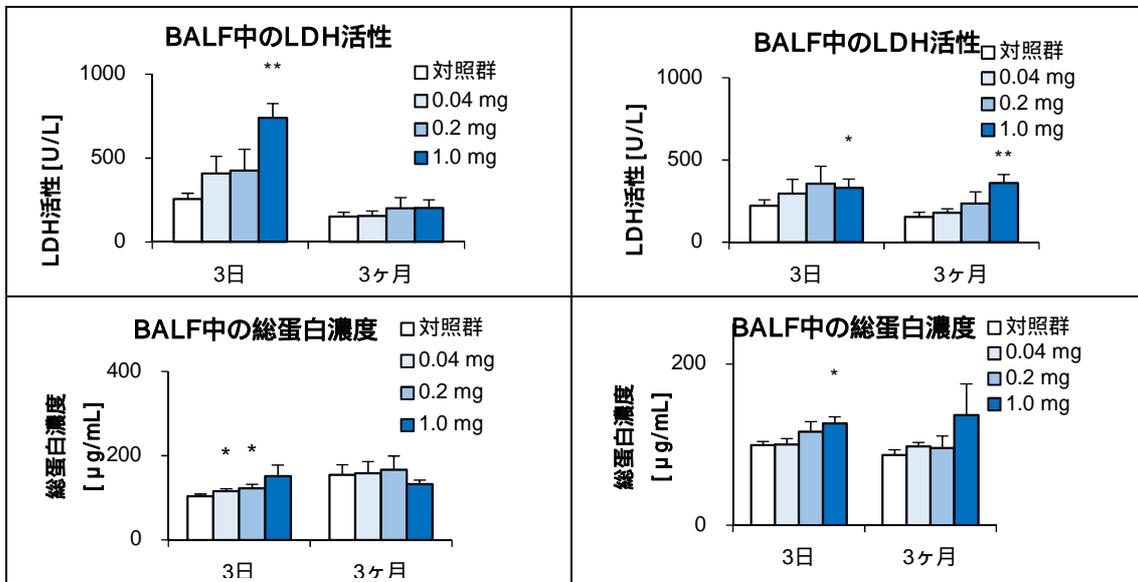
次にアスベストと結晶質シリカの in vivo 解析と in vitro 解析から見出しされた Exo-miRNA について、アスベストで増減する Exo-miRNA の発現レベルを RT-PCR を用いて解析し、肺組織中のアスベスト本数や肺障害指標との相関解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 気管内注入試験結果

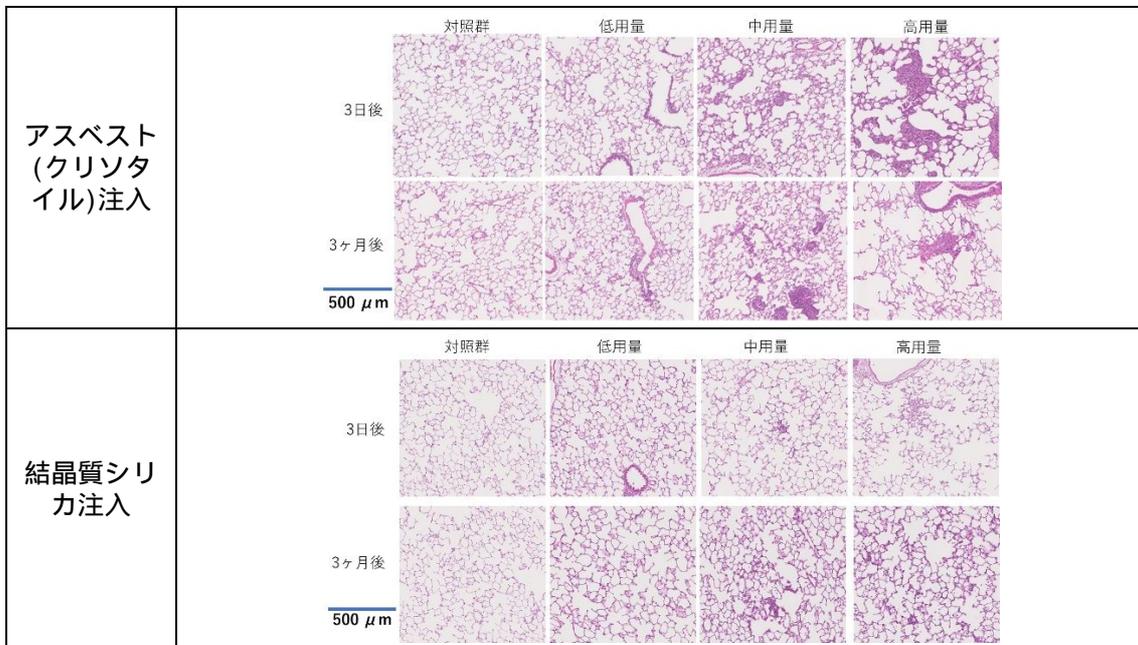
クリソタイル気管内注入では、注入 3 日後では用量依存性の BALF 中の好中球数 LDH 活性、総蛋白濃度の上昇を認めしたが、3 ヶ月後では、有意な上昇を認めなかった。一方で、結晶質シリカ気管内注入では、注入 3 日後、3 ヶ月後と用量依存性の BALF 中の好中球数の上昇、LDH 活性、総蛋白濃度の上昇を認めた。





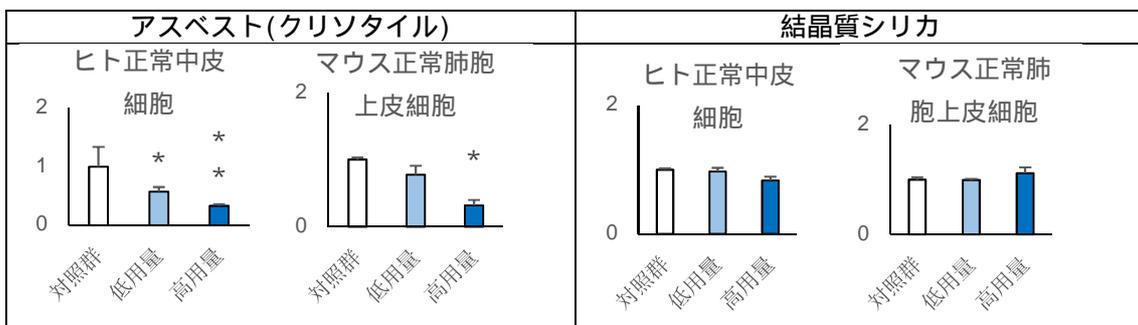
vs control; * : p<0.05, ** : p<0.01

肺病理組織標本の観察では、クリソタイル気管内注入では、注入3日後では用量依存性のBALF炎症細胞浸潤を認め、3ヶ月後では、用量依存性に線維化を認めた。一方で、結晶質シリカ気管内注入では、注入3日後、3ヶ月後と用量依存性の炎症細胞浸潤を認めた。



(2)培養細胞試験結果

ヒト不死化正常中皮細胞とマウス不死化正常肺胞上皮細胞にそれぞれクリソタイルと結晶質シリカを各2用量投与した(5.8、58 μg/ml)。投与後72時間後の細胞生存率の評価を行った。クリソタイルばく露では、ばく露群で対照群と比較し有意な細胞数の減少が認められたが、シリカについては、有意な減少は認められなかった。



vs control; * : p<0.05, ** : p<0.01

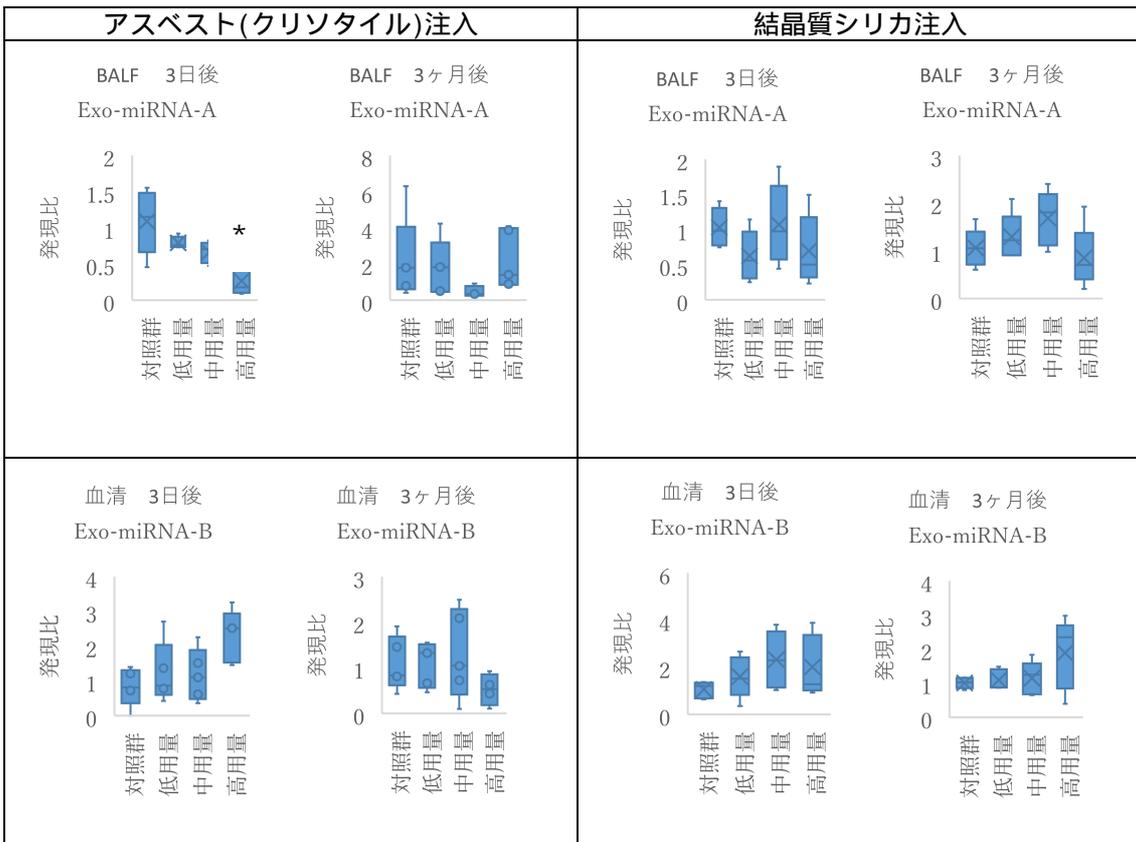
(3) Exo-miRNA 網羅的解析結果

ラットの BALF、血清、培養細胞の培養液上清から回収したエクソソーム内包マイクロ RNA の網羅的解析を実施し、それぞれのコントロール群より、グローバルノーマライゼーション値(Raw data から back ground を引いた値の中央値が 25 になるように補正した値)が 1.5 倍以上(Up)または 0.66 倍以下(Down)する遺伝子は以下通り、選定された。

	アスベスト		シリカ	
	Up	Down	Up	Down
BALF (3 日後)	39	45	60	50
血清 (3 日後)	0	12	3	10
BALF (3 ヶ月後)	28	4	16	3
血清 (3 ヶ月後)	2	42	30	0
マウス正常肺胞上皮細胞	84	109	5	14
ヒト正常中皮細胞	104	39	65	20

(4) Exo-miRNA のリアルタイム PCR 解析結果

Exo-miRNA 網羅的解析結果から、気管内注入試験 3 ヶ月後の BALF と血清において、アスベストのみで変化のみられる遺伝子かつ、培養細胞でもアスベストばく露で変化の認められる遺伝子のうち、ヒトの遺伝子とシーケンスが一致するものを選定し、BALF では 7 種、血清では 1 種選定され、このうち、Exo-miRNA-A と Exo-miRNA-B について、リアルタイム PCR 解析をおこなった。BALF 中の Exo-miRNA-A は、3 日後の急性期において、アスベストばく露の用量依存性に発現が低下していた一方で、ばく露後 3 ヶ月においては、アスベストばく露用量依存性の発現の変化は観察されなかった。同様に血清中の Exo-miRNA-B についてもリアルタイム PCR 解析をおこなったが、アスベストばく露用量依存性の有意な発現の変化は観察されなかった。



vs control; * : p<0.05, ** : p<0.01

(5)肺障害性指標との相関解析

気管支肺胞洗浄液中の Exo-miRNA-A は、3 日後の急性期において、肺組織中のアスベスト本数、BALF 量中の好中球数、LDH 活性、総蛋白濃度とも相関が認められた。一方で、ばく露後 3 ヶ月においては、アスベスト本数とは有意な相関が認められなかったものの、BALF 中の好中球数、総蛋白濃度との炎症関連指標との相関を認めたことから、肺炎症と関連し、急性期においては肺炎症に関連するアスベスト特異的な指標であることが考えられた。

				肺組織中の アスベスト本数	BALF 中 好中球	BALF 中 LDH 活性	BALF 中 総蛋白濃度
アスベ スト 注入	3 日後	BALF	相関係数	-0.730**	-0.627**	-0.594**	-0.507*
			有意確率	0.000	0.003	0.006	0.027
	3 ヶ月後	BALF	相関係数	-0.217	-0.558*	0.098	-0.647**
			有意確率	0.359	0.011	0.682	0.003
シリカ 注入	3 日後	BALF	相関係数	-	-0.090	-0.271	-0.089
			有意確率	-	0.705	0.248	0.710
	3 ヶ月後	BALF	相関係数	-	-0.135	-0.456*	-0.630**
			有意確率	-	0.569	0.050	0.004

* : p<0.05, ** : p<0.01

血清中の Exo-miRNA-B は、アスベストばく露用量依存性の発現の変化は観察されなかったが、急性期においては、肺組織中のアスベスト本数や肺炎症関連指標と相関を認めた。ただし、慢性期においては、シリカばく露においても、細胞傷害指標(総蛋白濃度)との相関が認められた。

				肺組織中の アスベスト本数	BALF 中 好中球	BALF 中 LDH 活性	BALF 中 総蛋白濃度
アスベ スト 注入	3 日後	血清	相関係数	0.476*	0.426	0.412	0.529*
			有意確率	0.039	0.069	0.079	0.024
	3 ヶ月後	血清	相関係数	-0.370	-0.154	-0.426	-0.416
			有意確率	0.119	0.528	0.069	0.086
シリカ 注入	3 日後	血清	相関係数	-	0.220	0.331	0.262
			有意確率	-	0.352	0.154	0.265
	3 ヶ月後	血清	相関係数	-	0.391	0.398	0.465*
			有意確率	-	0.088	0.091	0.045

* : p<0.05, ** : p<0.01

(5)まとめ

以上より、アスベストばく露の有無を評価・予測する Exo-miRNA として、気管支肺胞洗浄液中の Exo-miRNA-A や血清中の Exo-miRNA-B は特に急性期での評価に有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 友永泰介, 西田千夏, 和泉弘人, 森本泰夫	4. 巻 43(2),
2. 論文標題 吸入性化学物質の有害性評価指標についての最近の知見～ナノ材料を中心に～	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 産業医学ジャーナル	6. 最初と最後の頁 129-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 友永泰介
2. 発表標題 アスベストばく露によるエクソソーム内包マイクロRNAの発現解析
3. 学会等名 2121年度日本産業衛生学会九州地方会学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 友永泰介、和泉 弘人、西田 千夏、東 泰幸、森本 泰夫
2. 発表標題 不死化肺胞上皮細胞を用いたナノ粒子の肺有害性評価指標の検討
3. 学会等名 第39回産業医科大学学会 第47回産業医学推進研究会九州地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 友永泰介、和泉弘人、丸居誉、西田千夏、東泰幸、矢寺和博、森本泰夫
2. 発表標題 アスベストとシリカの気管内注入試験によるエクソソーム内包マイクロRNAの比較解析
3. 学会等名 第95回日本産業衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taisuke Tomonaga, Hiroto Izumi, Naoki Kawai, Chinatsu Nishida, Yasuyuki Higashi, Toshiki Morimoto, Kazuhiro Yatera, Yasuo Morimoto
2. 発表標題 Analysis of MicroRNAs in Exosomes Following Intratracheal Instillation of Asbestos in Rats
3. 学会等名 第 30 回日中韓産業保健学術会議 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田 あゆ美, 工藤 大河, 上前 晃平, 木下 智貴, 友永 泰介, 和泉 弘人, 森本 泰夫
2. 発表標題 エクソソームの動態観察
3. 学会等名 第38回産業医科大学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山城 和也, 深川 悠太, 森元 伸哉, 友永 泰介, 和泉 弘人, 森本 泰夫
2. 発表標題 エクソソーム内包マイクロRNAの精製と比較解析
3. 学会等名 第37回産業医科大学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和泉 弘人, 友永 泰介, 丸居 誉, 吉浦 由貴子, 森本 泰夫
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫細胞由来のエクソーム内包マイクロRNA解析
3. 学会等名 第92回日本産業衛生学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------