

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25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591566

研究課題名（和文） マイクロRNA異常の解明による悪性中皮腫に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文） Development of the new therapeutic approach for malignant pleural mesothelioma by the elucidation of aberrant microRNA expression

研究代表者

豊岡 伸一 (TOYOOKA SHINICHI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：30397880

研究成果の概要（和文）：約85%の悪性中皮腫で、miR-34b/cというマイクロRNAがメチル化により発現が抑制されていた。miR-34b/cを悪性中皮腫細胞株に導入すると、細胞株の悪性度が低下し細胞死が誘導されることを確認した。悪性中皮腫細胞株のヌードマウス皮下腫瘍モデルに対し、miR-34b/cが著しい抗腫瘍効果を示すことを認めた。また、miR-34b/cが悪性中皮腫細胞株における放射線感受性を増強すること、miR-34b/cを抑制すると正常中皮細胞の細胞増殖が亢進することも確認した。

研究成果の概要（英文）：We detected that miR-34b/c was repressed by methylation in about 85% of malignant mesothelioma. Induction of miR-34b/c into the mesothelioma cell line resulted in the inhibition of the invasiveness and the induction of apoptosis. The in vivo analysis revealed that miR-34b/c had strong antitumor effect. Besides, miR-34b/c enhanced radiosensitivity of the mesothelioma cell line and the repression miR-34b/c caused the increased cell proliferation in human mesothelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：外科学

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：胸部悪性腫瘍、分子腫瘍学、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍においてマイクロRNA（以下、miRNA）の異常が注目されている。miRNAはRNA干渉により複数のタンパク質の発現を抑制する。種々の癌腫でその異常が報告されて

いるが、悪性中皮腫におけるmiRNA異常についての報告は少ない。

(2) アスベスト曝露が原因と考えられる悪性中皮腫は、2005年以来、本邦で重大な社会問題となっている。手術・化学療法・放射線

療法を組み合わせた治療が行われているが、治療成績は不良であり、病態の解明・新しい治療法の確立が急がれる。

2. 研究の目的

- (1) 悪性中皮腫における miRNA 異常を解析し、悪性中皮腫の病態の解明を目指す。
- (2) *in vitro*, *in vivo* の実験を通して、miRNA 異常に着目した新しい治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 種々の悪性腫瘍でその発現異常が報告されている miRNA について、悪性胸膜中皮腫細胞株および臨床検体でその発現状態を解析する。発現低下が認められる miRNA があれば、発現低下の原因としてメチル化を認めるか解析し、メチル化が認められた場合は、脱メチル化処理により、その miRNA の発現が回復するか検討する。
- (2) 高頻度に発現低下が認められる miRNA が明らかになった場合は、その miRNA の発現ベクターを作成して悪性中皮腫細胞株に導入し、細胞周期・アポトーシス・浸潤能を中心に、flow cytometry 法・invasion アッセイを用いて検討する。
- (3) miRNA 発現ベクターを導入することにより、悪性中皮腫細胞株が放射線に対する感受性を獲得するか検討する。また、正常中皮細胞において、その miRNA の発現を抑制することで細胞増殖能などに変化が及ぶかどうか検討する。
- (4) 悪性中皮腫細胞株 NCI-H290 のヌードマウス皮下腫瘍モデルに対して、miRNA のアデノウイルスベクターを作成して、scramble control と腫瘍増殖率の比較を行い、治療に応用が可能か検討する。

4. 研究成果

- (1) これまで検討した miRNA 群の中で、miR-34b/c は約 85% の悪性中皮腫でメチル化により発現抑制されており、脱メチル化処理によってその発現は回復した。
- (2) miR-34b/c の発現ベクター (pSilencer 4.1-CMV neo Plasmid Vector) を作成して、悪性中皮腫細胞株に導入し、細胞周期・アポトーシス・浸潤能を中心に、flow cytometry 法・invasion アッセイを用いて検討した。miR-34b/c 導入により悪性中皮腫細胞株の浸潤能が低下すること、アポトーシスが誘導されることを確認し、miR-34b/c が悪性中皮腫において重要な役割を果たしていることを論文報告した。
- (3) 悪性中皮腫細胞株における miR-34b/c の放射線感受性増強効果を認めた。また、正常中皮細胞に miR-34b/c を導入したところ、増殖能が亢進した。これらの結果についてそれぞれ論文報告した。
- (4) 悪性中皮腫細胞株 NCI-H290 のヌードマウス皮下腫瘍モデルに対して、miR-34b/c アデノウイルスベクター (TM adeno 1.0-CMV system) を作成して、scramble control と腫瘍増殖率の比較を行い、miR-34b/c アデノウイルスベクターの著しい抗腫瘍効果を見出し、論文投稿中である。
- (5) miR-34 に関しては、米国企業の Mirna Therapeutics が開発した MRX34 (miR-34 mimic) という薬剤の臨床試験が、原発性肝癌を対象とした Phase I study として 2013 年 4 月に始まった (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01829971>)。今後、悪性中皮腫を含む他臓器の悪性腫瘍においても臨床試験に進行することが期待される。

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4件)

- ① Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Shien K, Furukawa M, Muraoka T, Maki Y, Ueno T, Yamamoto H, Asano H, Otsuki T, Miyoshi S. Downregulation of microRNA-34 induces cell proliferation and invasion of human mesothelial cells. *Oncol Rep.* 2013 Jun;29(6):2169-74. 査読有
doi: 10.3892/or.2013.2351.
- ② Maki Y, Asano H, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Katsui K, Ueno T, Shien K, Muraoka T, Tanaka N, Yamamoto H, Tsukuda K, Kishimoto T, Kanazawa S, Miyoshi S. MicroRNA miR-34b/c enhances cellular radiosensitivity of malignant pleural mesothelioma cells. *Anticancer Res.* 2012 Nov;32(11):4871-5. 査読有
<http://ar.iijournals.org/content/32/11/4871.long>
- ③ 久保孝文、豊岡伸一、三好新一郎、悪性胸膜中皮腫の新しい分子生物学的異常と治療応用の可能性、岡山医学会雑誌 Vol. 124 (2012) No. 3 p. 203-206 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/joma/124/3/124_203/_article/-char/ja/
- ④ Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, Asano H, Ueno T, Muraoka T, Yamamoto H, Nasu

Y, Kishimoto T, Pass HI, Matsui H, Huh NH, Miyoshi S. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2011 Aug 1;17(15):4965-74. 査読有
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3040.

[学会発表] (計7件)

- ① 田中則光、豊岡伸一、宗 淳一、牧 佑歩、村岡孝幸、上野剛、浅野博昭、佃和憲、三好新一郎 正常中皮細胞におけるmicroRNA34の抑制効果 Tiny RNA drives mesothelial cell mad、日本癌治療学会総会、2012年10月25日～2012年10月27日、横浜
- ② Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Shien K, Furukawa M, Muraoka T, Maki Y, Ueno T, Asano H, Otsuki T, Miyoshi S. Down-regulation of microRNA34 induces cell proliferation and invasion of human mesothelial cells. AACR Annual Meeting 2012. 2012年04月01日～2012年04月04日 Chicago, USA
- ③ Soh J, Toyooka S, Kubo T, Fukazawa T, Sakaguchi M, Ueno T, Tsukuda K, Asano H, Yamamoto H, Huh, N, Miyoshi S. The impact of adenoviral gene transfer of microRNA-34b/c on malignant pleural mesotheliomas. AACR Annual Meeting 2011. 2011年4月5日 Orlando, USA
- ④ Maki Y, Toyooka S, Asano H, Soh J, Tsukuda K, Muraoka T, Aokage K, Tanaka N, Ueno T, Yamane M, Oto T, Miyoshi S. MicroRNA-34b/c is significantly

down-regulated by aberrant promoter methylation and forced expression of miR-34b/c enhances the radiosensitivity in malignant pleural mesothelioma cells. AACR Annual Meeting 2011. 2011年4月5日 Orlando, USA

⑤ Toyooka S, Kubo T, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, Asano H, Nasu Y, Kishimoto T, Pass H, Matsui H, Huh NH, Miyoshi S. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays a pivotal role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. The 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group. 2010年9月1日 京都

⑥ 久保孝文、豊岡伸一、佃 和憲、阪口政清、深澤拓也、宗 淳一、浅野博昭、上野剛、那須康友、松井秀樹、許南浩、三好 新一郎 Epigenetic silencing of micro-RNA-34b/c plays a pivotal role in pathogenesis of malignant mesothelioma. 第69回日本肺癌学会総会 2010年9月22-24日 大阪

⑦ Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Asano H, Sakaguchi M, Soh J, Ueno T, Yamamoto H, Yamane M, Oto T, Nasu Y, Matsui H, Huh NH, Miyoshi S. Frequent silencing of tumor suppressive miR-34b/c by aberrant methylation in malignant pleural mesothelioma. AACR Annual Meeting 2010. 2010年4月19日 Washington, DC, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.nigeka-okayama-u.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊岡 伸一 (TOYOOKA SHINICHI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：30397880

(2) 研究分担者

三好 新一郎 (MIYOSHI SHINICHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00190827

佃 和憲 (TSUKUDA KAZUNORI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：20346430

浅野 博昭 (ASANO HIROAKI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：70534775

宗 淳一 (SOH JUNICHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：90559890

(3) 連携研究者

該当無し