

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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23790440

研究課題名（和文）

動物モデルを用いた腹膜悪性中皮腫におけるmicroRNAの役割

研究課題名（英文） An investigation into functional roles of microRNA in the animal model of malignant peritoneal mesothelioma.

研究代表者

岡崎 泰昌（OKAZAKI YASUMASA）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30403489

研究成果の概要（和文）：

予備実験のマイクロアレイから、鉄化合物誘発ラット肉腫型腹膜悪性中皮腫に特徴的なmicroRNA(miRNA)としてmiRNA-199/214を同定し、本研究助成によりmiRNA-199/214の上昇をreal-time PCR, ISHで明らかにした。miRNA-199/214の転写因子であるTwist-1の発現を肉腫型に認め、アスベスト誘発ラット腹膜中皮腫と培養細胞株でも肉腫型にTwist-1の発現を認めた。不死化中皮細胞へのmiRNA-199/214遺伝子導入は細胞増殖の促進を認め、miRNA-199/214は機能性分子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Preliminary experiment of microRNA (miRNA) microarray disclosed miRNA-199/214 as a hallmark of iron saccharate-induced sarcomatoid malignant mesothelioma. With the aid of this grant, elevation of miRNA-199/214 was confirmed by real-time PCR and ISH. Twist-1, which transcribes miRNA-199/214, was detected in sarcomatoid mesothelioma and asbestos-induced malignant peritoneal mesothelioma and cultured cell lines. Transfection of miR-199/214 into immortalized mesothelial cell line increased cell growth, providing evidence of a functional role of miRNA-199/214.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：分科：基礎医学、細目：実験病理学

キーワード：microRNA, 動物モデル、悪性中皮腫、鉄化合物、アスベスト、Twist-1

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商業利用は原則禁止されたものの、アスベスト曝露から中皮腫を発症するまでには、約30-40年の時間がかかるため、本邦での中皮腫発症のピークは、2025-2030年頃が推測されており、今後も患者が増加することが危惧されている疾患である。そのため、腫瘍の発生機構の解明や治療法の開発が望まれている。商業的に利用されてきたアスベスト繊維は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・500;100;1)と報告されており、鉄含有量が高いアスベスト繊維ほど、発がん性が高いことが知られている。またアスベスト繊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発がん分子吸着、④慢性炎症などが考えられている。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誘発腹膜中皮腫を用い、中皮腫を誘発した。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、予後が悪いことが知られている。鉄化合物により誘発した腹膜中皮腫は、肉腫型中皮腫は上腹部に腫瘤を形成し、上皮型中皮腫は精巣周囲に腫瘤を形成していた。microRNA (miRNA) という、20 塩基前後の小さな RNA が mRNA の分解や翻訳阻害などを介してさまざまな遺伝子発現を調節する分子が存在することが報告された。この分子は悪性腫瘍の発生や成長に重要な役割を果たすことが報告されているが、鉄化合物誘発腹膜悪性中皮腫において、検討は行われていない。また、報告者の所属する研究室では、同一ラットから得られた中皮腫検体を用い、ゲノム、mRNA のマイクロアレイ解析が行われている。そのため、miRNA マイクロアレイ解析を行うことにより、ゲノム、mRNA、miRNA の網羅的解析を統合的に組み合わせる解析を行うことが期待できる。miRNA を介した発現調節機構を網羅的に解析するため、miRNA マイクロアレイを施行した。肉腫型中皮腫 (2 例)、上皮型中皮腫 (4 例)、非腫瘍性中皮 (2 例) を用いたマイクロアレイで、組織型別に層別化することが可能であり、組織型と相関がある miRNA が存在することが考えられた。

2. 研究の目的

中皮腫の発症と発生と進展に重要な miRNA の同定と機能解析を行い、中皮腫の病態の一端を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

miRNA マイクロアレイで、肉腫型に特徴的な miRNA として、miRNA-199/214 を同定した。

(1) 中皮腫組織を用い、miRNA 発現確認と定量を行い、ISH (in situ hybridization) で、miRNA を産生している細胞を可視化した。

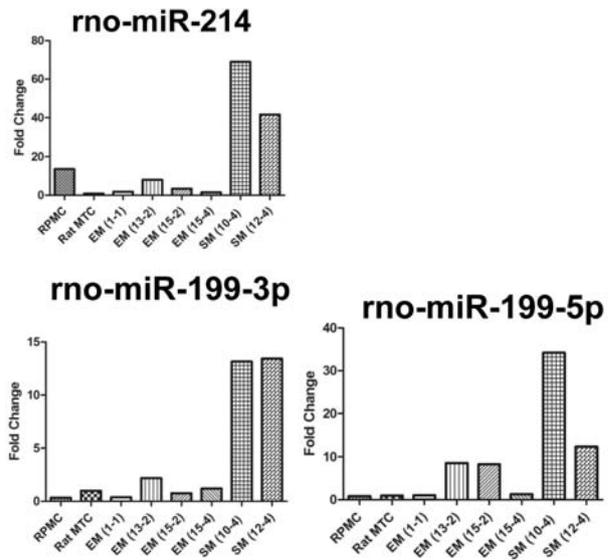
(2) 中皮腫組織を用い、Twist-1 の発現を、免疫染色と western blot で評価した。

(3) アスベスト誘発中皮腫組織と中皮腫培養細胞株などを用い、Twist-1 と miR-199, 214 の発現を検討した。

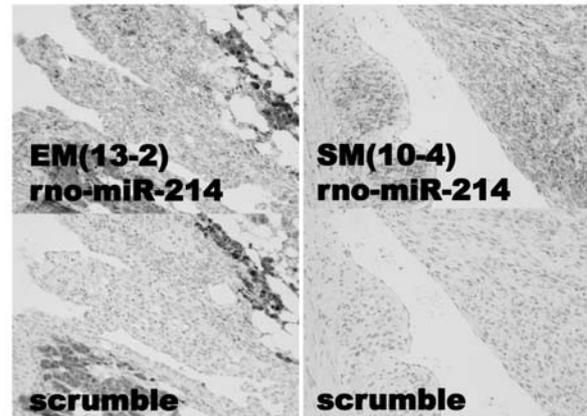
(4) 不死化中皮細胞 (MeT5A) に miRNA-199/214 を導入し、薬剤で選択後 miRNA-199/214 過剰発現株を作成し、形態の変化、細胞増殖への影響を検討した。

4. 研究成果

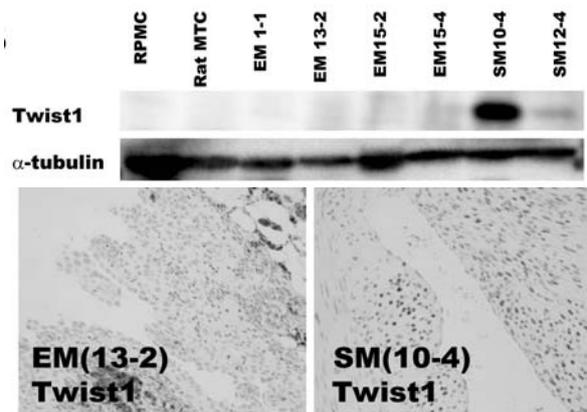
(1) 中皮腫組織での miRNA マイクロアレイを施行した腫瘍組織から抽出した RNA を用い、real-time PCR を TaqMan プローブを用いて行った。マイクロアレイ結果と同様に、肉腫型に高発現を認めた。グラフの検体名として、非腫瘍性中皮細胞 (RPMC, rat peritoneal mesothelial cell, RatMTC, rat mesothelial tissue collection)、上皮型 (EM, epithelioid mesothelioma: 1-1, 13-2, 15-2, 15-4)、肉腫型 (SM, sarcomatoid mesothelioma: 10-4, 12-4) の 2 症例



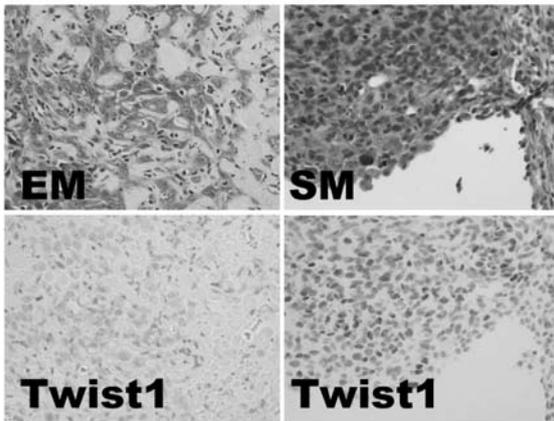
miR-214 に対するプローブを用いた ISH で、肉腫型中皮腫に強い陽性像を認めた。(陽性像は茶色で可視化されており、本報告書では黒色に見える。scrumble は、標的を持たない非特異的配列プローブであり、ネガティブコントロール)



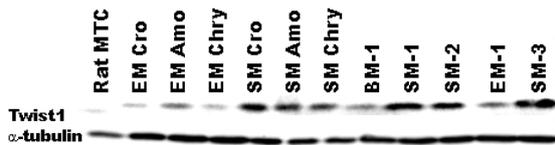
(2) 中皮腫組織を用い、Twist-1 の発現を、免疫染色とウエスタンブロットで、肉腫型に高発現を認めた。(ウエスタンブロットでは、レーンごとに出現する黒色のバンドが、抗体と反応した特異的な蛋白)



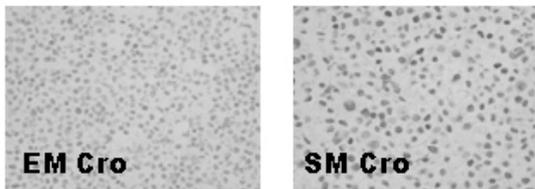
(3) アスベスト誘発中皮腫組織と中皮腫培養細胞株などを用い、Twist-1 と miRNA-199/214 の高発現を肉腫型に認めた。
アスベスト誘発中皮腫の免疫染色



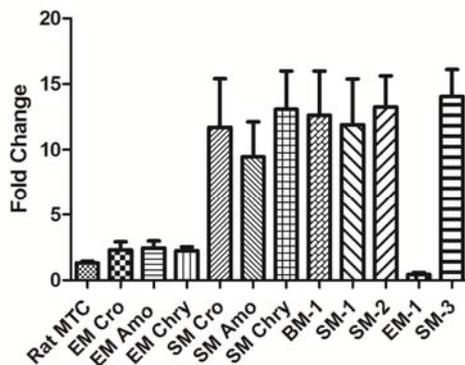
アスベスト誘発中皮腫から樹立した細胞株のウェスタンブロット (Cro;クロシドライト、Amo;アモサイト、Chry ;クリソタイル線維からラットに誘発した腹膜中皮腫から樹立した中皮腫細胞株を用いた)



アスベスト誘発中皮腫から樹立した細胞株のセルブロックを用いた免疫染色

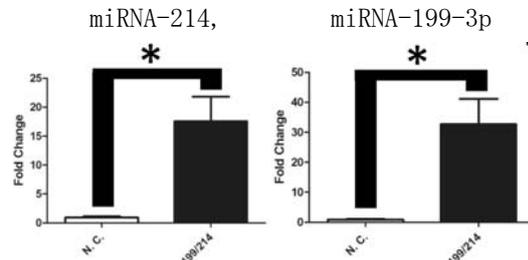


アスベスト誘発中皮腫から樹立した細胞株の miRNA-214 real-time PCR では、肉腫型に miRNA-214 の高発現を認めた。

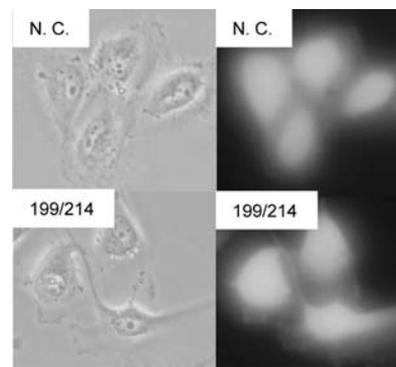


(4) 不死化中皮細胞 (MeT5A) に miRNA-199/214 を導入し、薬剤で選択後 miRNA-199/214 過剰

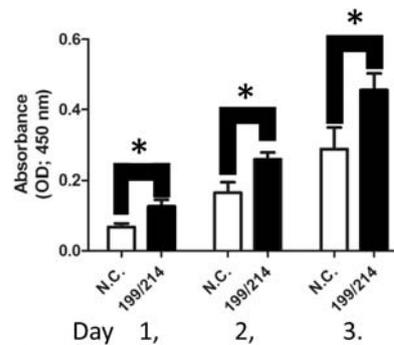
発現株を作成した。形態の変化は見られなかったが、細胞増殖の増加を認めた。
薬剤耐性株作成後の、miRNA-199/214 発現の real-time PCR による解析結果(*は、 $p < 0.05$ 再現性があり、統計的に有意差があることを意味している)



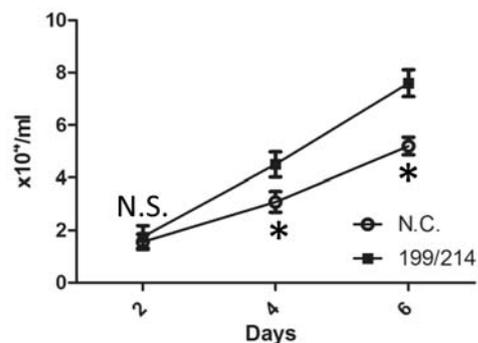
薬剤耐性株作成後の蛍光顕微鏡による細胞形態 (形態変化は、はっきりしない)



薬剤耐性株作成後の WST-8 assay の結果有意に WST-8 assay 値の上昇が見られる。



薬剤耐性株作成後の細胞数計測の結果有意に細胞数の増加が見られる。



以上のように、科学研究費助成事業を通じ、動物モデルを用いた腹膜中皮腫におけるmicroRNAの網羅的解析～機能解析まで進めることが出来た。培養細胞を用いて、細胞増殖を促進する機能性分子であることを明らかにすることができたが、miRNAを介した標的分子の同定、mRNAマイクロアレイ結果を併せたデータ掘り下げ研究はできていない。平成25年度からも若手研究(B)25860292の助成をして頂き、研究を継続していく財政的な裏付けができたため、中皮腫研究を継続していく。

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 5 件)

(1) Okazaki Y, Nagai H, Chew SH, Jiang L, Funahashi S, Tsujimura T, *Toyokuni S. CD146 and IMP3 predict prognosis of asbestos-induced rat mesothelioma. **Cancer Sci.** in press, 査読有

(2) Okazaki Y, Kono I, Kuriki T, Funahashi S, Fushimi S, Iqbal M, Okada S, *Toyokuni S. Bovine lactoferrin ameliorates ferric nitrilotriacetate-induced renal oxidative damage in rats. **J Clin Biochem Nutr.** ;51(2), 84-90, 2012. 査読有

(3) Nagai H, Chew SH, Okazaki Y, Funahashi S, Namba T, Kato T, Enomoto A, Jiang L, Akatsuka S, *Toyokuni S. Metamorphosis of mesothelial cells with active horizontal motility in tissue culture. **Sci Rep.** ;3, 1144, 2013. 査読有

(4) Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, Misawa N, Yamashita Y, Akatsuka S, Ishihara T, Yamashita K, Yoshikawa Y, Yasui H, Jiang L, Ohara H, Takahashi T, Ichihara G, Kostarelos K, Miyata Y, Shinohara H, *Toyokuni S. Diameter and rigidity of multi-walled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**;108(49), E1330-1338, 2011. 査読有

(5) Nagai H, Ishihara T, Lee WH, Ohara H, Okazaki Y, Okawa K, *Toyokuni S. Asbestos surface provides a niche for oxidative modification. **Cancer Sci**;102(12), 2118-2125, 2011. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

-2012 年度-

(1) 第 3 回 JMIG (Japan Mesothelioma Interest Group) 研究会 岡崎泰昌 (京都、11/17)

(2) 第 71 回日本癌学会学術総会 岡崎泰昌 (札幌、9/19-21)

(3) 第 36 回鉄バイオサイエンス学会 岡崎泰昌 (札幌、9/1, 2)

(4) 第 65 回酸化ストレス学会学術集会

岡崎泰昌 (徳島、6/7, 8)

(5) 第 101 回日本病理学会総会 岡崎泰昌 (東京、4/26-28)

-2011 年度-

(6) 第 2 回 JMIG 研究会 岡崎泰昌 (大阪、1/28)

(7) 第 70 回日本癌学会学術総会 岡崎泰昌 (名古屋、10/3-5)

(8) 第 35 回鉄バイオサイエンス学会 岡崎泰昌 (東京、9/10, 11)

(9) 5th Biennial Meeting of SFRR (Society for Free Radical Research) Asia, OKAZAKI YASUMASA (Kagoshima, 8/31-9/4), **SFRR Japan Young Investigator Award 受賞**

(10) 第 64 回酸化ストレス学会学術集会 岡崎泰昌 (留寿都、7/2, 3) **学術奨励賞受賞**

(11) 第 11 回 AOB (AntiOxidant Biofactor) 研究会 岡崎泰昌 (留寿都、7/1) **学術奨励賞受賞**

(12) 第 100 回日本病理学会総会 岡崎泰昌 (東京、4/28-30)

[図書] (計 3 件)

(1) **モデル動物利用マニュアル series 疾患モデルの作成と利用 がん**

中村卓郎 編

題目：第 4 章呼吸器系第 1 節誘発モデル第 2 項 中皮腫 (p383-392)

題目：第 6 章泌尿生殖系第 1 節腎臓第 2 項誘発モデル (p549-559)

岡崎泰昌、豊國伸哉

株式会社 エル・アイ・シー, 2012

(2) **慢性肝疾患における鉄毒性と除鉄治療～C型慢性肝炎を中心に～**

日本鉄バイオサイエンス学会 編

題目：鉄の発癌に及ぼす役割 (p70-89)

岡崎泰昌、豊國伸哉

医薬ジャーナル社, 2012

(3) **ロビンス 基礎病理学 原書 8 版**

豊國伸哉 高橋雅英 監訳

題目：第 17 章 脾臓 (p779-790)

岡崎泰昌

丸善出版, 2011

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・助教

研究者番号：30403489

(2) 研究分担者

研究分担者なし

(3) 連携研究者

連携研究者なし