

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10662

研究課題名(和文)肝細胞癌の脈管浸潤における長鎖ノンコーディングRNAの機能的役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of functional role of long non-coding RNA in the invasion of hepatocellular carcinoma cells

研究代表者

唐子 堯(唐偉)(Karako (Tang), Takashi (Wei))

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：00313213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝細胞癌(HCC)細胞の増殖や浸潤における長鎖ノンコーディングRNAの役割の解明を目的とした。過去の研究でHCC患者の予後の悪化に関連すると示唆された長鎖ノンコーディングRNAに着目し、siRNAによる一過性の発現低下を誘導させた細胞を作製し、細胞の増殖や浸潤への効果を*in vitro*で評価した。その結果、いずれのsiRNA処理細胞においても細胞の増殖は変化しなかったが、PRC1-AS1あるいはLINC00665に対するsiRNAを処理したHCC細胞の浸潤能が低下した。HCCにおけるPRC1-AS1及びLINC00665の発現上昇は、癌の病態の悪化に関与すると示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肝細胞癌(HCC)細胞におけるPRC1-AS1及びLINC00665の発現上昇が癌細胞の浸潤に関与することを示唆した。この成果は、高頻度な再発が問題となっているHCCの病態悪化における長鎖ノンコーディングRNAの役割の解明に貢献するものと考えられる。また、長鎖ノンコーディングRNAが関与する新しいメカニズムの提示が、開発が立ち遅れているHCCに対する治療法の新規標的の探索に有効であると期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to elucidate the role of long-non-coding RNA in the proliferation and the invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. We focused the long non-coding RNAs that was suggested to have the relation to the worse prognosis of HCC patients. We transfer the siRNA to HCC cells to reduce the expression of the focused long-non-coding RNA and evaluate the proliferation and the invasion of those HCC cells *in vitro*. As results, the number of invasive cells was decreased in the PRC1-AS1 knockdown or the LINC00665 knockdown cells compared with the control cells. The proliferation of those cells was not altered. The overexpression of PRC1-AS1 and/or LINC00665 is suggested to have the relation to the HCC prognosis.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 長鎖ノンコーディングRNA 脈管浸潤 治療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌による死亡率が上昇し続けている現在の日本において、肝胆膵領域の臓器における癌の患者、なかでも肝細胞癌(HCC)患者の増加が深刻化している。近年の外科的切除術の進歩によって、切除適応の HCC 症例の予後は肝胆膵外科領域における他の癌疾患と比較して良好となったが、切除適応外となった症例に関しては依然として予後が悪いのが現状である。切除適応外の症例に対する治療や術後の補助療法として化学療法が有効となるが、DNA 合成阻害剤のような一般的な抗癌剤は副作用が問題となっているほか、それが軽減される分子標的治療薬は HCC 治療においては開発が遅れている。肝癌診療ガイドラインによると、HCC 患者の術後の経過を左右する予後因子として腫瘍数と共に、脈管浸潤や肝機能が挙げられている。従って、癌の化学療法では、腫瘍の増殖を抑制するほか、脈管浸潤やそれに伴う肝内転移の抑制、さらに背景肝の機能回復を視野に入れた治療法の実現が、癌の克服に対して非常に重要といえる。

ゲノム上から転写される RNA には、機能性のタンパク質をコードするものの他にタンパク質をコードしないノンコーディング RNA がある。なかでも、200 塩基以上のものは長鎖ノンコーディング RNA に分類され、これまでに数多くの RNA が同定された。これらの長鎖ノンコーディング RNA の中には、癌細胞の増殖や浸潤、転移に関与すると報告されているものがあり、癌患者の予後の悪化に重要な役割をもつと示唆されている。過去の研究では、長鎖ノンコーディング RNA の一種である metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT-1) は、CTHRC1、CCT4、HMMR、ROD1 といった肺癌細胞の移動に関与する遺伝子群の発現を制御する機能を有することが明らかにされた(1)。我々の最近の研究では、Cancer Genome Atlas による HCC 症例の遺伝子発現検査を実施し、癌組織において著しく高発現している長鎖ノンコーディング RNA を 5 種類 (PRC1-AS1、CRNDE、RP11-334E6.12、LINC00665、AC092171.4) を同定した。これらの長鎖ノンコーディング RNA の発現上昇は複数種の HCC 培養細胞株においても証明されたことから、細胞の癌化に重要な役割を果たしていることが示唆された(2)。しかし、これらの長鎖ノンコーディング RNA の発現上昇が、HCC の病態の悪化に寄与するメカニズムは不明である。

以上の背景に基づき、申請者らは、HCC において発現上昇がみとめられた長鎖ノンコーディング RNA の HCC の病態悪化への関与、特に HCC 患者の予後を著しく悪化させる脈管浸潤や肝内転移への関与を明らかにすることが、これらの長鎖ノンコーディング RNA を HCC の診断や治療の標的として応用する臨床的意義につながるという着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、先行研究で癌細胞での発現上昇が示された長鎖ノンコーディング RNA が、無限増殖及び浸潤といった癌の特性に関与する分子メカニズムの解明を図る。予備的研究により、Cancer Genome Atlas を用いた探索の結果として HCC 症例において高発現する 5 種類の長鎖ノンコーディング RNA を同定し、各種 HCC 培養細胞においても当該 RNA が発現上昇していることを立証した。これらの長鎖ノンコーディング RNA の発現変動が HCC 細胞の特性に及ぼす効果を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. 細胞培養

肝癌細胞株 HuH-7、HepG2 は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ改変培地 (DMEM) を用いて 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養した。ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) は、非働化 FBS や複数の成長因子を含む EGM-2 培地を用いて 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養した。細胞の剥離は、0.25%トリプシン-EDTA を用いて行った。

#### 3.2. siRNA の導入による長鎖ノンコーディング RNA の発現低下の誘導

継代培養した肝癌細胞を回収し、6 ウェルプレートに 5x10<sup>5</sup> 個/mL の密度で細胞を播種した。24 時間培養して細胞を接着させた後、siRNA を含む培地に変換して、37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 48 時間培養した。細胞を回収し、カラムを用いた RNA 抽出により組織中の全 RNA を抽出した。逆転写反応により cDNA 化した後、siRNA の標的とした配列の発現をリアルタイム PCR 法により解析し

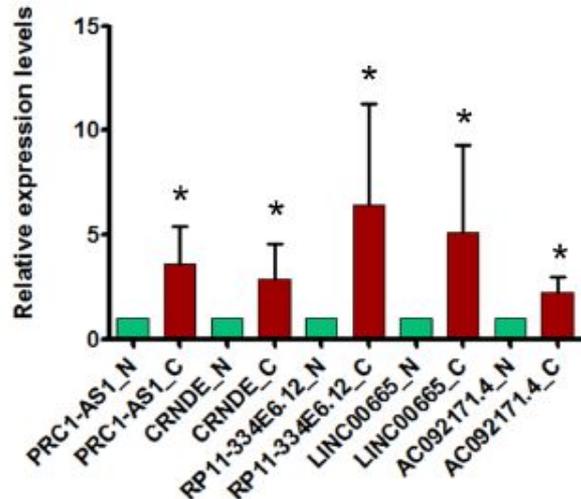


図1. 各種長鎖ノンコーディング RNA の発現上昇 (赤: 癌細胞、緑: 正常肝細胞)

た。

### 3.3 . MTT アッセイによる *in vitro*での細胞増殖解析

継代培養した肝癌細胞を回収し、96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  個/100 $\mu$ L の密度で細胞を播種した。24 時間培養して細胞を接着させた後、siRNA を含む培地に変換して、37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 48 時間培養した。3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を添加し、37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 4 時間培養した。培養液を吸引除去し、2-プロパノール・ドデシル硫酸ナトリウム混合液を添加して、細胞を溶解して細胞内の色素を漏出させた。常温にて約 6 時間静置した後、波長 550 nm における吸光度を測定した。

### 3.4 . マトリゲルチャンバーを用いた *in vitro* 浸潤解析

継代培養した肝癌細胞を回収し、無血清培地に再び懸濁して 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。細胞を再び回収し、 $1 \times 10^5$  個/500 $\mu$ L の密度でマトリゲルをコートさせたチャンバーに播種した。24 - 48 時間培養した後、マトリゲルを浸潤した細胞を固定・染色した。マトリゲルを浸潤した細胞を顕微鏡下で観察し、siRNA 処理の有無による変化を評価した。

### 3.5 . ヒト HCC 細胞を用いた肝転移モデルマウスの作製

継代培養した肝癌細胞を回収し、無血清 DMEM 培地で複数回洗浄した後、無血清培地に  $1 \times 10^6$  個/100 $\mu$ L の密度で懸濁した。6 週齢・雄の BALB/c ノードマウスに麻酔をかけ、側腹部を切開して脾臓を露出させた。細胞懸濁液 100 $\mu$ L を 30G の針を付けたシリンジで吸引し、マウスの脾臓に注入した。針を抜去後、止血処理を十分に実施し、閉腹した。3 週間後、肝臓を肉眼にて観察し、転移巣の数を評価した。また、この 3 週間後の観察の際には、24 時間前にインドシアニン グリーン (ICG) を静注して、腫瘍組織が特異的に蛍光発光するかを評価した。

## 4 . 研究成果

### 4.1 . HCC 細胞の増殖における siRNA 処理の効果

Cancer Genome Atlas での解析において HCC における発現上昇が示唆された長鎖ノンコーディング RNA の発現が癌細胞の浸潤に及ぼす影響を明らかにするために、siRNA を用いた一過性の発現低下を誘導させ、*in vitro*における増殖への効果を解析した。その結果、いずれの siRNA 処理細胞においても細胞の増殖への有意な効果はみとめられなかった。

### 4.2 . HCC 細胞の浸潤能における siRNA 処理の効果

Cancer Genome Atlas での解析において HCC における発現上昇が示唆された長鎖ノンコーディング RNA の発現が癌細胞の浸潤に及ぼす影響を明らかにするために、siRNA を用いた一過性の発現低下を誘導させ、*in vitro*における浸潤への効果を解析した。その結果、PRC1-AS1 あるいは LINC00665 の発現低下を誘導させた条件の浸潤細胞数は、対照となる siRNA を作用させた条件と比較して減少した(図 2、図 3)。以上の結果から、PRC1-AS1 及び LINC00665 の発現変動は癌細胞の浸潤に影響を及ぼすことが示唆された。今後の研究では、マトリクスメタロプロテイナーゼ (MMPs) などのような癌細胞の浸潤に関連する酵素群の発現と PRC1-AS1 及び LINC00665 との分子生物学的関連性を検討する必要がある。

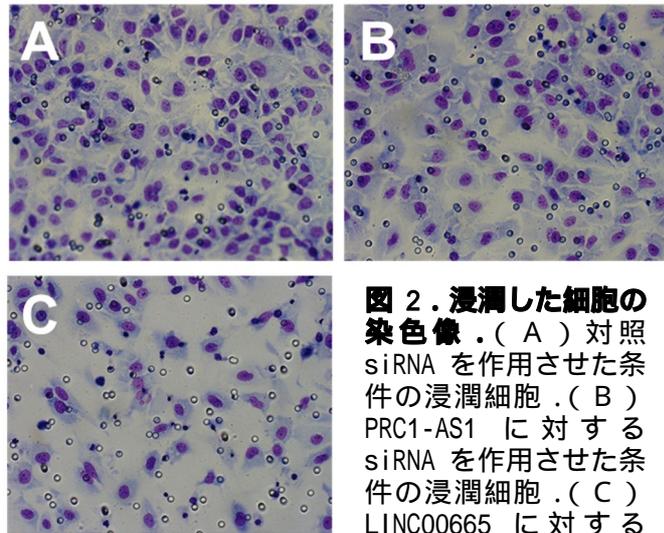


図 2 . 浸潤した細胞の染色像。(A) 対照 siRNA を作用させた条件の浸潤細胞。(B) PRC1-AS1 に対する siRNA を作用させた条件の浸潤細胞。(C) LINC00665 に対する siRNA を作用させた条件の浸潤細胞。画像は、顕微鏡観察下 200 倍のもの。

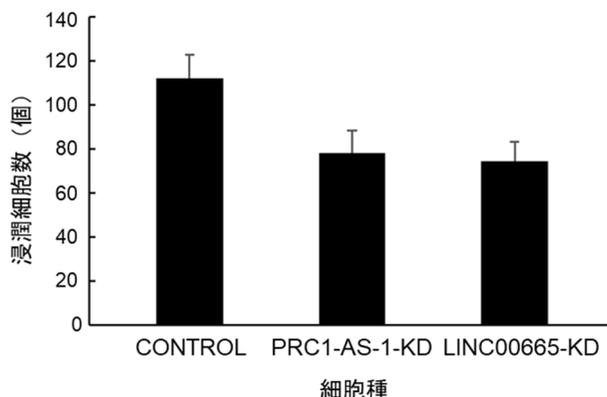
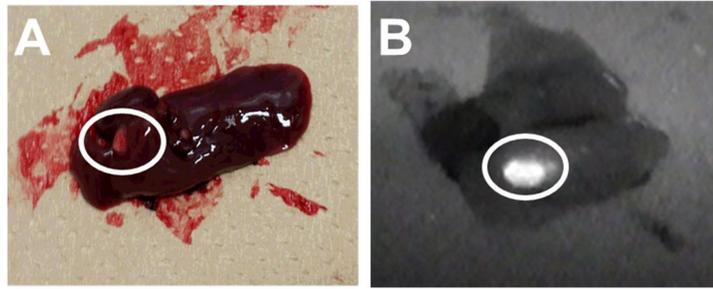


図 3 . PRC1-AS1 及び LINC00665 に対する siRNA を作用させた条件での浸潤細胞数の変化。それぞれ施行回数 3 回の平均値を示す。

#### 4.3 . 肝転移モデルマウスの構築

上述の通り、長鎖ノンコーディング RNA の発現変動が肝癌細胞の浸潤に影響を及ぼすことが *in vitro* での解析により明らかとなった。しかし、この解析法では生体内のような様々な因子が存在する環境を正確に再現できていない。そこで、この浸潤への効果を *in vivo* で検証するために、肝癌細胞の浸潤及び転移を解析する *in vivo* 評価系の構築を試みた。大腸癌細胞を脾臓に移植すると肝臓に移動して転移巣を形成するモデルを応用

して、細胞種を肝癌細胞としてモデルが確立できるか検討した。その結果、脾臓に HuH-7 細胞を移植して 3 週間後の肝臓に腫瘍が形成された。肝癌特異的に蓄積する性質を有する ICG を静注したところ腫瘍組織のみが蛍光発光した (図 4)。以上の結果から、肝癌細胞を脾臓移植する肝転移モデルマウスを構築できたと考えられる。今後、上記の研究で発現変動が浸潤能に影響する長鎖ノンコーディング RNA の恒常的発現変動を誘導させた細胞を構築して、*in vivo* での転移巣形成への効果を検討する。



**図 4 . 肝癌細胞を経脾臓移植したマウスの移植 3 週間後の肝臓 . ( A ) 明視野像 . 白丸内に腫瘍組織が存在 . ( B ) ICG 蛍光像 . 肝癌組織における特異的発光を検出 .**

#### < 引用文献 >

1. Tano K, Mizuno R, Okada T, et al. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Lett.* 2010;584(22):4575-4580. doi:10.1016/j.febslet.2010.10.008
2. Xia J, Inagaki Y, Sawakami T, et al. Preliminary investigation of five novel long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biosci Trends.* 2016;10(4):315-319. doi:10.5582/bst.2016.01140

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Karako Kenji, Chen Yu, Tang Wei	4. 巻 12
2. 論文標題 On medical application of neural networks trained with various types of data	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioScience Trends	6. 最初と最後の頁 553 ~ 559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/bst.2018.01264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tang Wei	4. 巻 7
2. 論文標題 Modeling the rare diseases process in dish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intractable & Rare Diseases Research	6. 最初と最後の頁 72 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/irdr.2018.01048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Qi Fanghua, Wang Jinjing, Zhao Lin, Cai Pingping, Tang Wei, Wang Zhixue	4. 巻 12
2. 論文標題 Cinobufacini inhibits epithelial-mesenchymal transition of human hepatocellular carcinoma cells through c-Met/ERK signaling pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioScience Trends	6. 最初と最後の頁 291 ~ 297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/bst.2018.01082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhang Jia-Li, Qiu Xue-Min, Zhang Na, Tang Wei, Guber Hans-Jurgen, Li Da-Jin, Wang Ling	4. 巻 42
2. 論文標題 Bu-Shen-Ning-Xin decoction suppresses osteoclastogenesis by modulating RANKL/OPG imbalance in the CD4+ T lymphocytes of ovariectomized mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 299-308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijmm.2018.3645	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Xia Jufeng, Inagaki Yoshinori, Gao Jianjun, Qi Fanghua, Song Peipei, Han Guohua, Sawakami Tatsuo, Gao Bo, Luo Chuan, Kokudo Norihiro, Hasegawa Kiyoshi, Sakamoto Yoshihiro, Tang Wei	4. 巻 45
2. 論文標題 Combination of Cinobufacini and Doxorubicin Increases Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells through the Fas- and Mitochondria-Mediated Pathways	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Chin Med.	6. 最初と最後の頁 1537 ~ 1556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1142/S0192415X17500835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Tang W.
2. 発表標題 Clinical research and significance of DCP in patients with HCC.
3. 学会等名 The Annual Meeting of the Chinese Medical Association of biliary surgery and Chinese Committee of Biliary Surgeons.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tang W.
2. 発表標題 Preoperative Predictors of Tumor Recurrence.
3. 学会等名 The First Northeast Asia International Hepatobiliary and Pancreatic Surgery Forum. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tang W.
2. 発表標題 Biomarkers -- evaluation of clinical utility in surveillance and early diagnosis for HCC.
3. 学会等名 2018 International Hepatobiliary Surgery Forum & The 1th Chinese Transplantation Conference. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tang W
2. 発表標題 Biomarkers: screening and early diagnosis for hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 National Congress of the diagnosis and treatment of biliary tract tumor 2017. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tang W
2. 発表標題 Biomarkers: Evaluation of early diagnosis and prognosis for patients with HCC.
3. 学会等名 2017 Xinhua International Surgical Forum. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tang W
2. 発表標題 DCP expression and the prognosis for Chinese patients with HCC.
3. 学会等名 Jiangsu International Liver Meeting 2017. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究 分担 者	秋光 信佳  (Akimitsu Nobuyoshi)  (40294962)	東京大学・アイソトープ総合センター・教授   (12601)	