

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15799

研究課題名(和文)肝細胞癌の微小環境におけるnon-coding RNA HOTAIRの役割

研究課題名(英文)Role of non-coding RNA in hepatocellular carcinoma

研究代表者

涌井 祐太(Wakui, Yuta)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・特任研究員

研究者番号：50756939

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)：HOTAIRはnon-coding RNAに分類されるもののひとつであり、複数の癌種において悪性度との相関が報告されている。しかし、その機序については不明な点が多い。申請者は、癌細胞周囲の微小環境に着目し、HOTAIR高発現癌細胞はCCL2を分泌することで、TAMやMDSCの誘導を引き起こしていることを明らかにした。また、その他の肝細胞癌悪性度を亢進させる分子をスクリーニングした結果、BEX2が高発現すると悪性度を亢進させることをみつけた。

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の悪性度を規定する分子を同定した。新しい肝細胞癌治療開発における基礎データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：HOX transcript antisense intergenic RNA (HOTAIR) belongs to non-coding RNA. It is reported that HOTAIR is involved in the malignancy of several types of cancer. However, little is known about how HOTAIR regulated tumor malignancy. In this study, we focused on tumor microenvironment. We elucidated that overexpression of HOTAIR cancer cells secrete CCL2, which induces tumor-associated macrophage and myeloid-derived suppressor cells. Additionally, we screened the molecules that increased the hepatocellular carcinoma (HCC) malignancy. We determined that there is positive correlation between the BEX2 expression and HCC malignancy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肝細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

Hox Transcript Antisense Intergenic RNA (HOTAIR) は 2158 塩基からなる lncRNA である。この RNA は HoxC 遺伝子座 (12q13.13) から転写され、離れたターゲット遺伝子群を制御することが知られている。近年、私たちのグループ (PLoS One, 2013; BBRC, 2013, Scientific Reports, 2017) を含め、この HOTAIR は癌における予後不良因子としての報告が相次いでいる。肝臓癌を含むほとんどの癌種において、HOTAIR の発現上昇と予後不良は有意な相関をもつが、なぜ HOTAIR が癌の悪性度を高めるのか、その分子機構はよくわかっていない。これまでに、細胞株を用いた実験によって、polycomb タンパク下流シグナルから EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) の機序を介して浸潤能を上昇させるとの報告が散見されている。しかし、細胞株および癌種の違いによって、この下流シグナル群の中には正反対の動きをする報告も多い。

最近、癌組織周囲の免疫系が、癌の進展に大きな影響を与えることが注目されている。TAM (tumor associated macrophage) や MDSC (myeloid derived suppressor cells) といった細胞集団が、癌周囲の免疫反応を抑制したり、転移浸潤を補助することによって、癌の悪性度を高めることが知られている。TAM は、主に M2 マクロファージで構成されており、IL-4 や IL-13 によって誘導されることが知られている。

TAM は、CCL2 によって肝臓癌周囲に誘導され、CCL2 とそのレセプターである CCR2 との結合を阻害すると腫瘍増殖が抑えられる。MDSC も CCL2 の他に、GM-CSF, TGF- $\beta$ , IFN  $\gamma$  といったものによって活性化を受けるとされる。しかし、これらのサイトカインがどのような発現制御を受けているかは、多くの点が不明である。

## 2. 研究の目的

申請者は、HOTAIR によって腫瘍微小環境の免疫細胞、特に TAM/MDSC が誘導されることによって、肝臓癌の増殖進展を促進するという仮説を立て、これを検証する。さらに、肝臓癌の悪性度を規定する因子を造腫瘍能の観点からスクリーニングする。

## 3. 研究の方法

研究倫理：本課題はヘルシンキ宣言に則り、宮城県立がんセンター倫理委員会の承認を得て行った。

細胞株：肝臓癌細胞株としては Li-7, Hep3B, Huh7, HepG2 細胞を使用した。

共培養試験：0.4  $\mu$ m の trans-well を用い、上方にヒト末梢血単核球、下方に肝臓癌細胞株を播種し、72 時間共培養した後に flow cytometry を行った。

## 4. 研究成果

はじめに、肝臓癌細胞株の HOTAIR の発現量を real-time PCR で定量した。その結果、Li7 細胞は Huh7 と比べて HOTAIR が低発現であった。そこで、Li7 細胞に HOTAIR を安定過剰発現させた細胞株を作成した。作成した細胞株は、増殖能・浸潤能・造腫瘍能いずれも大きな変化はなかった。

そこで、HOTAIR 過剰発現株の網羅的遺伝子発現解析を行った。HOTAIR 増大に伴って CCL2 遺伝子が高発現していることがわかった。ELISA を行ったところ、HOTAIR 安定過剰発現株から放出される CCL2 量はコントロールと比べて有意に高かった。

次に、HOTAIR 過剰発現株とヒト末梢血単核球の共培養を行った。その結果、HOTAIR 安定過剰発現株と共培養したリンパ球は、CD14+HLA-DR<sup>high</sup>CD68<sup>+</sup>であるマクロファージおよび CD14+HLA-DR<sup>low</sup>CD33+CD11b<sup>+</sup>である MDSC 分画が増加していた。このことから、肝臓癌細胞株において、HOTAIR は癌細胞そのものの悪性度には寄与しないが、液性因子 CCL2 を介して周囲微小環境の免疫細胞に作用する可能性が示唆された。

また、HOTAIR 以外の肝臓癌の悪性度に関わる遺伝子スクリーニングも行った。造腫瘍能を指標に複数の遺伝子をノックダウンして検討した結果、BEX2 遺伝子をノックダウンすると肝臓癌細胞株の造腫瘍能が低下することが明らかになった。肝臓癌症例を解析した結果、BEX2 高発現症例は有意に予後が悪かった。検討の結果、BEX2 は肝臓癌細胞株を静止期に誘導する遺伝子であることが判明した。肝臓癌手術検体においても、BEX2 と増殖マーカーである Ki67 は排他的な局在を取ることが分かった。また、BEX2 発現によって肝臓癌細胞株は静止期に誘導さ

れ、BEX2 ノックダウンによってスフェア形成能が低下した。以上のことから、BEX2 は静止期癌幹細胞を維持する分子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Hatsuzawa Yuuri, Yamaguchi Kazunori, Takanashi Tomoka, Sato Ikuro, Tamai Keiichi, Mochizuki Mai, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Yamamoto Kuniharu, Yasuda Jun, Mizuma Masamichi, Unno Michiaki, Sugamura Kazuo	4. 巻 20
2. 論文標題 CD109 promotes the tumorigenic ability and metastatic motility of pancreatic ductal adenocarcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 493 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2020.01.013	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Tamai Keiichi, Nakamura-Shima Mao, Shibuya-Takahashi Rie, Kanno Shin-Ichiro, Yasui Akira, Mochizuki Mai, Iwai Wataru, Wakui Yuta, Abue Makoto, Yamamoto Kuniharu, Miura Koh, Mizuma Masamichi, Unno Michiaki, Kawamura Sadafumi, Sato Ikuro, Yasuda Jun, Yamaguchi Kazunori, Sugamura Kazuo, Satoh Kennichi	4. 巻 10
2. 論文標題 BEX2 suppresses mitochondrial activity and is required for dormant cancer stem cell maintenance in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78539-0	査読の有無 有
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0件

〔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
---------	---------