

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591602

研究課題名（和文） 胆道系悪性腫瘍に特異的なマイクロ RNA の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of microRNAs derived from human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines

研究代表者

石川 朋子（ISHIKAWA TOMOKO）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70212850

研究成果の概要：肝内胆管癌由来細胞株で発現が消失または著明に減少している胆管上皮特異的 microRNA を過剰発現させ、microRNA(miRNA)が制御している標的となる mRNA の同定を目的としたプロテオミクス解析を行った。この解析により、胆管上皮細胞特異的 miRNA が、胆管上皮の癌化、肝内胆管癌の増殖と転移に関連するシグナル伝達経路の調節に関与することを示唆する新知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胆道外科学、肝内胆管癌、microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

MicroRNA(miRNA)は、近年発見されたゲノム DNA 上のイントロンにコードされている一本鎖の small RNA である。miRNA は、標的とする mRNA の 3' -UTR 領域と相補な配列をもち、その mRNA と結合することで mRNA を分解したり、蛋白質への翻訳を抑制したりすることで、遺伝子発現を調節していると考えられている。その機能として細胞、組織、臓器の発生や分化に関与していることが報告されており、さらに、miRNA は癌遺伝子や癌抑制遺伝子として、癌の発達、増殖、転移

等への関与も示唆されている。また、miRNA は様々な癌疾患の診断ツール(バイオマーカー)としても注目を集めている。

肝内胆管癌は原発性肝癌のなかで胆管上皮由来の癌であり、その解剖学的部位から診断が難しく、外科的治療が行われているが、予後不良な癌の一つである。

## 2. 研究の目的

今回の基盤研究により、肝内胆管癌および肝-胆管系に特異的な miRNA の発現プロファイルを明らかにするとともに、miRNA が制御

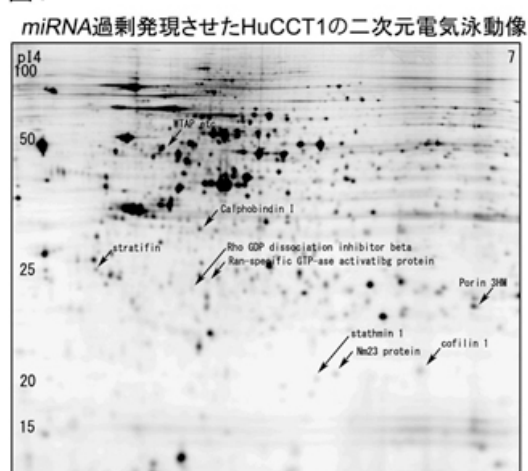
している mRNA、標的となる mRNA を特定することで、肝-胆管系における miRNA の機能の一端を解明することを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

プロファイリング解析にはクローニングによる small RNA ライブラリーを作製し、シーケンス解析する手法を用いた。細胞株 [正常胆管上皮細胞(HiBEpiC)と肝内胆管癌細胞株(HuCCT1, MEC)] の total RNA を抽出後 small RNA を単離し、両末端に linker を結合させた後、逆転写にて cDNA を作製した。引き続き PCR にて反応産物を増幅し、ライゲーション処理を施した後、TA クローニングをおこなった。得られた塩基配列を BLAST プログラムにて解析し、配列を同定することにより培養細胞の発現プロファイルを明らかにした。さらに、各培養細胞に特徴的な miRNA の発現に関して、real-time PCR 法を用いた定量的検証をおこなった。

次に、正常胆管上皮細胞株で強く発現し、肝内胆管癌由来細胞株(HuCCT1, MEC)で発現が消失または著明に減少している miRNA、胆管上皮細胞特異的 miRNA(miR-22, -125a, -127, -199a, -199a\*, -214, -376a, -368, and -424)を見出した。培養細胞(HuCCT1)に胆管上皮特異的 miRNA を過剰発現させ、miRNA が制御している標的となる mRNA の同定を目的としたプロテオミクス解析をおこなった。直接増減の変動をきたした蛋白スポットを2次元電気泳動により抽出し、質量分析をおこない、蛋白分子を同定した(図1)。

図1



### 4. 研究成果

肝内胆管癌由来の培養細胞株である HuCCT1、MEC とヒト正常胆管上皮細胞株 HiBEpic の microRNA(miRNA)発現プロファイルを明らかにすることにより、正常胆管上皮細胞株で強く発現し、肝内胆管癌由来細胞株で発現が消失または著明に減少している

miRNA、胆管上皮特異的 miRNA(miR-22, -125a, -127, -199a, -199a\*, -214, -368, -376a, and -424)を同定した。

次に、miRNA 過剰発現によるプロテオミクス解析により、胆管上皮細胞特異的 miRNA の標的 mRNA が growth factor receptor bound protein-2 (GRB2)と Wilms tumor associated protein (WTAP)であることを示唆する所見を得た。

GRB2 は、受容体チロシンキナーゼからの様々なシグナル伝達経路を仲介する鍵となるアダプター蛋白質であり、癌化、癌の増殖と転移に極めて重要な役割を果たしている。WTAP は、WT1(Wilms 腫瘍遺伝子の1つ)に強く結合する蛋白質として見出され、WT1 の転写調節を介した、細胞増殖・アポトーシスへの関与が示唆されている。これらを考え合わせると、今回の結果は、我々が見出した胆管上皮細胞特異的 miRNA が、胆管上皮の癌化、肝内胆管癌の増殖と転移に関連するシグナル伝達経路の調節に関与することを示唆する新知見である(成果は投稿準備中)。

今後、特異的 miRNA の転写後翻訳調節が肝内胆管癌関連シグナル伝達経路にどのように関わるのか分子レベルでの機能解析研究と、in vivo 解析(臨床解析)による肝内胆管癌の新規バイオマーカー開発のための基盤研究が課題として残された。

### 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 2 件)

1. Yutaka Kawahigashi, Takuya Mishima, Yoshiaki Mizuguchi, Yasuo Arima, Shigeki Yokomuro, Tomohiro Kanda, Osamu Ishibashi, Hiroshi Yoshida, Takashi Tajiri, Toshihiro Takizawa. MicroRNA profiling of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines reveals biliary epithelial cell-specific microRNAs. J Nippon Med Sch 76 (4): (in press), 2009. (査読有り)

2. Takuya Mishima, Takami Takizawa, Shan-Shun Luo, Osamu Ishibashi, Yutaka Kawahigashi, Yoshiaki Mizuguchi, Tomoko Ishikawa, Miki Mori, Tomohiro Kanda, Tadashi Goto, Toshihiro Takizawa. MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary. Reproduction 136 (6): 811-811, 2008. (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

1. 瀧澤 俊広 川東 豊、三嶋 拓也、水口 義昭、石橋 室、吉田寛、田尻孝. 肝内

胆管癌細胞株のマイクロ RNA プロファイリングによる胆管上皮特異的マイクロ RNA の同定. 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2009 年 3 月 30 日. 岡山.

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 朋子 (ISHIKAWA TOMOKO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70212850

(2)研究分担者

石橋 宰 (ISHIBASHI OSAMU)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70293214

瀧澤 敬美 (TAKIZAWA TAKAMI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：40386157

(3)連携研究者

羅 善順 (RA ZENJUN)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60339439