

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07608

研究課題名(和文) 肝細胞癌の脈管腫瘍栓形成機構における長鎖非コードRNAによる制御系の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the control system of intravenous tumor thrombus formation by long-noncoding RNA in hepatocellular carcinoma

研究代表者

稲垣 善則 (Inagaki, Yoshinori)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40733390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肝細胞癌の主腫瘍組織と腫瘍栓組織の網羅的遺伝子発現解析に基づき、脈管腫瘍栓形成における長鎖非コードRNAの役割の解明を目的として実施した。同一の肝細胞癌患者に由来する主腫瘍組織と腫瘍栓組織における遺伝子発現を比較した結果、細胞の接着や移動に関する因子の発現変動と共に、複数種の長鎖非コードRNAの発現変動をみとめた。腫瘍栓組織で発現上昇したCRNDE及びLINC00665の発現を低下させた肝癌細胞では、細胞の移動能が减弱し、マウスモデルにおける肝転移巣の形成数が減少した。従って、これらの長鎖非コードRNAの発現は肝細胞癌の腫瘍栓形成及び転移の誘導に関連性を有すると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌は現在もおお再発率が高く、脈管での腫瘍栓の形成や転移が患者予後の悪化に大きな影響を及ぼすが、その誘導に関する詳細な分子機構は不明である。外科的切除されることが希少である腫瘍栓組織を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した本研究の成果は、腫瘍栓と主腫瘍との間での遺伝子発現変動を比較した希少な知見として学術的に意義深い。また、長鎖非コードRNAが関与する腫瘍栓形成及び転移の分子機構の解明は、臨床的課題である肝細胞癌の再発の抑止などといった患者予後の改善に寄与する治療法の開発に有効であると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to study the molecular biological roles of long non-coding RNA (lncRNA) in the formation of tumor thrombosis by performing the transcriptomic analysis of hepatocellular carcinoma (HCC) and its tumor thrombosis. The transcriptomic analysis of main HCC tissue and tumor thrombotic tissue from the same patients showed the altered expression of genes and lncRNAs which relate to the cell adhesion and migration. Down-regulation of CRNDE and LINC00665, which showed the elevated expression in tumor thrombotic tissue, induced the suppression of cancer cell invasion in vitro and metastasis in vivo. These results suggested CRNDE and LINC00665 were related to the induction of tumor thrombosis formation and cancer metastasis.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 脈管腫瘍栓 長鎖非コードRNA 浸潤 上皮間葉転換

## 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、術後早期における高頻度な再発が課題となっている。その患者予後の悪化に大きく関与する病態として「脈管での腫瘍栓の形成」がある(1)。腫瘍栓の存在は、外科手術の実施の可能性にも影響するため、癌に対する治療方針を大きく左右する現象である。腫瘍栓の形成には、上皮間葉転換(EMT)の誘導や細胞の浸潤などに関わる因子が作用していると示唆されている。しかし、手術症例に関して原発巣組織と腫瘍栓組織を同時に検体として保有される場合が少なく、両組織を分子生物学的に比較評価した研究はない。そのため、腫瘍栓形成を制御する分子機構の詳細な解明には至っていない。

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他にタンパク質をコードしない非コード RNA がある。なかでも、200 塩基以上のものは長鎖非コード RNA に分類され、これまでに数多くの RNA が同定された。これらの長鎖非コード 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、長鎖非コード 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(2)。我々による最近の研究では、Cancer Genome Atlas による HCC 症例の遺伝子発現検索を実施し、癌組織において著しく高発現している長鎖非コード RNA を同定した。これらの長鎖非コード 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、癌細胞の性状に重要な役割を果たしていることが示唆された(3)。しかし、これらの長鎖非コード RNA の発現上昇が、脈管腫瘍栓の形成に関する因子を制御する分子機構は明らかではない。また、腫瘍栓組織における長鎖非コード RNA の発現自体も研究された例はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、HCC 患者の予後を大きく左右する病態である脈管腫瘍栓形成の分子機構を解明することを目的とする。腫瘍栓組織において発現変動する因子を網羅的解析により明らかにし、その発現変動が腫瘍栓形成に関連する諸現象に及ぼす機能的効果の提唱を図る。

## 3. 研究の方法

### (1) 同一症例に由来する主腫瘍組織及び腫瘍栓組織を用いた転写産物の網羅的解析

当科で外科的切除を施行した HCC 症例のうち、同時に腫瘍栓組織を採取した症例の主腫瘍 HCC 組織と腫瘍栓組織を用いて、マイクロアレイ法による転写産物の網羅的解析を実施した。術中採取した組織からカラム法により全 RNA を抽出した。逆転写により cDNA 化した後、Cy3 で標識した。標識化 cDNA を断片化し、SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray にハイブリダイズさせた。Microarray slide を Agilent SureScan Microarray Scanner にてスキャンし、Feature Extraction Software 11.5.1.1 にて解析を実施した。

### (2) 病態の異なる症例間における転写産物の発現性の検討

当科で外科的切除を施行した HCC 症例のパラフィン包埋組織標本を用いて組織切片を作製し、免疫組織化学的染色を実施した。組織切片をキシレン及びエタノールで処理後、マイクロウェーブにて抗原を賦活化した。正常血清によるブロッキング処理後、一次抗体を作用させた(overnight、4℃)。二次抗体及び酵素を標識した後、3,3'-diaminobenzidine にて発色させた。

### (3) モデル実験系を用いた基礎医学的解析による長鎖非コード RNA の機能的役割の解明

#### 遺伝子工学的制御による長鎖非コード RNA の機能解析

継代培養した肝癌細胞を回収し、6 ウェルプレートに  $5 \times 10^5$  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、各種長鎖ノンコーディング RNA に対する siRNA を含む培地に変換して、37℃、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 法により解析した。

各種タンパク質の発現への影響を検討するためにウエスタンブロット解析を実施した。上記の各種条件で培養した細胞を回収し、タンパク質抽出試薬中で細胞をホモジナイズし、タンパク質を抽出した。各種タンパク質試料を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、PVDF 膜に転写した。5%スキムミルク溶液あるいは 3%BSA 溶液にてブロッキングし、各種一次抗体を作用させた(overnight、4℃)。タンパク質の検出は化学発光にて実施した。

#### In vitro 浸潤解析による細胞の移動能の評価

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℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。細胞を再び回収し、1x10<sup>5</sup> 個/500 μL の密度でマトリゲルをコートさせたチャンパーに播種した。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。

#### In vivo 癌転移モデルを用いた長鎖非コード RNA の機能解析

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 1x10<sup>6</sup> 個/100μL 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 μL 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

### (1) 同一症例に由来する主腫瘍組織及び腫瘍栓組織における転写産物の発現変動

HCC は、病態が進行すると癌細胞の脈管への浸潤が誘導され、脈管内で浸潤腫瘍 (脈管内腫瘍栓) 組織を形成する。同一症例の原発巣組織と浸潤腫瘍組織における遺伝子発現を比較することにより、癌細胞の脈管浸潤に重要な因子を特定できると考えた。そこで、両組織間における長鎖ノンコーディング RNA を含む転写産物の発現変動を評価する目的で、同一 HCC 症例の主腫瘍組織と腫瘍栓組織の遺伝子発現を網羅的に解析した。

腫瘍栓組織における発現が、主腫瘍組織と比較して 2 倍以上変動した mRNA は 156 種類で、そのうち腫瘍栓組織で 2 倍以上発現上昇したものは 50 種類、2 倍以上発現低下したものは 106 種類であった。特に、細胞の接着性や上皮間葉転換 (EMT) の誘導において重要な役割を果たす E-cadherin の発現が、腫瘍栓組織において 3.4 倍低下していた。この発現低下は、ウエスタンブロット解析や免疫組織化学解析で示された通り、タンパク質レベルでもみとめられた (図 1、図 2)。また、タンパク質レベルでのウエスタンブロット解析では、腫瘍栓組織における vimentin の発現上昇もみとめられた (図 1)。遺伝子発現変動値の結果に基づいて GO 解析及び pathway 解析を実施した結果、「ECM-receptor interaction」「Focal adhesion」「cell migration」といった細胞の接着や移動に関する遺伝子群の変動が明らかとなった。門脈内腫瘍栓組織は、細胞間あるいは細胞外マトリックスとの接着性を減弱させて主腫瘍組織から移動し、門脈に到達した細胞が増殖して腫瘍栓を形成したものであると考えられる。本研究での結果は、門脈腫瘍栓組織の癌細胞が前述の現象を誘導するのに必要な遺伝子の発現変動を立証しており、これらの遺伝子の発現変動は腫瘍栓を形成する細胞において維持されていると示唆された。

一方、腫瘍栓組織における発現が主腫瘍組織と比較して 2 倍以上変動した長鎖ノンコーディング RNA は 52 種類で、そのうち腫瘍栓組織で 2 倍以上発現上昇したものは 46 種類、2 倍以上発現低下したものは 6 種類であった。予備的研究で実施した Cancer Genome Atlas を用いた解析において HCC 組織における発現上昇が示された長鎖ノンコーディング RNA と一致したものは、CRNDE と LINC00665 の 2 種類であった (図 3)。本研究では、以後の研究をこれらの 2 種類の長鎖ノンコーディング RNA に着目して研究を遂行した。



図 1. 腫瘍栓組織における E-cadherin 及び vimentin の発現変動。

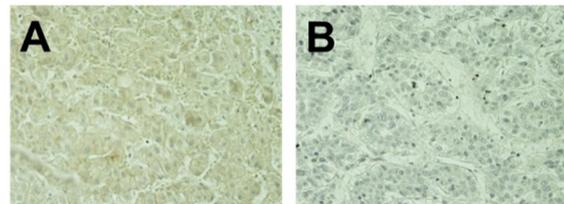


図 2. E-cadherin の組織発現。A: 主腫瘍組織、B: 腫瘍栓組織。

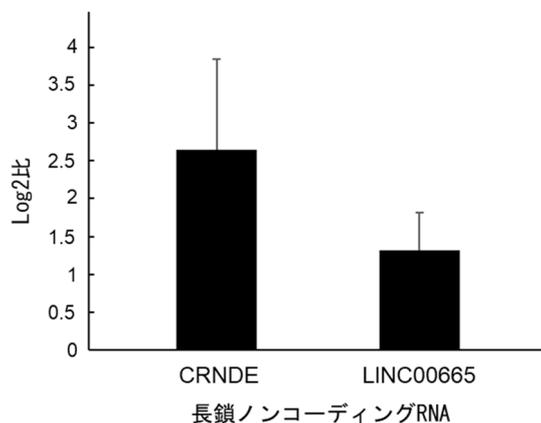


図 3. CRNDE 及び LINC00665 の腫瘍栓組織における発現変動比。対照は、同一症例の原発巣組織。

## (2) モデル実験系を用いた基礎医学的解析による長鎖非コード RNA の機能的役割の解明

### 遺伝子工学的制御による長鎖非コード RNA の機能解析

腫瘍組織における発現上昇が示された長鎖ノンコーディング RNA 2 種類 CRNDE と LINC00665 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、CRNDE 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 4、図 5)。なお、細胞の増殖に関しては、それぞれの siRNA を作用させた条件の間で有意差は生じなかった。以上の結果から、CRNDE 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 CRNDE 及び LINC00665 との分子生物学的関連性を検討する必要がある。

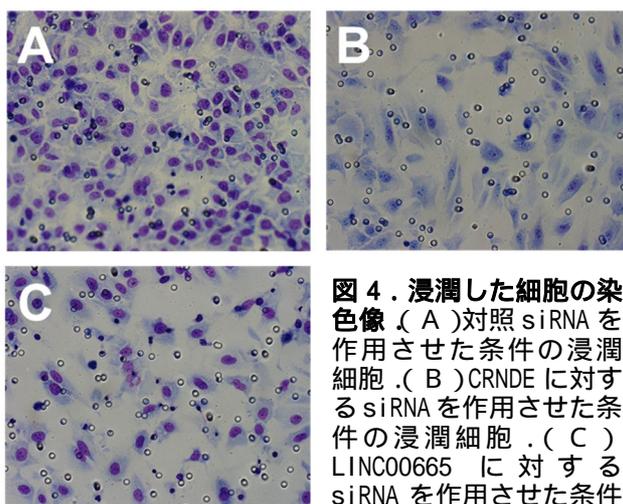


図 4 . 浸潤した細胞の染色像 (A) 対照 siRNA を作用させた条件の浸潤細胞。(B) CRNDE に対する siRNA を作用させた条件の浸潤細胞。(C) LINC00665 に対する siRNA を作用させた条件の浸潤細胞。画像は、顕微鏡観察下 200 倍のもの。

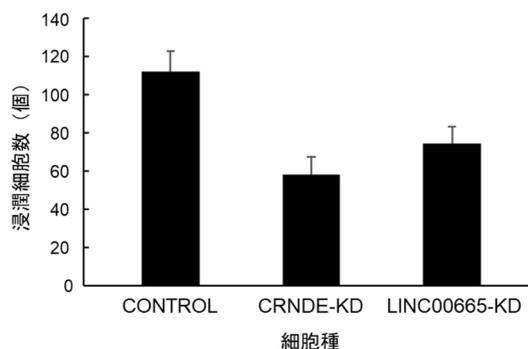


図 5 . CRNDE 及び LINC00665 に対する siRNA を作用させた条件での浸潤細胞数の変化。それぞれ施行回数 3 回の平均値を示す。

### *In vivo* 癌転移モデルの構築とそれを用いた長鎖非コード RNA の機能解析

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 6)。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。

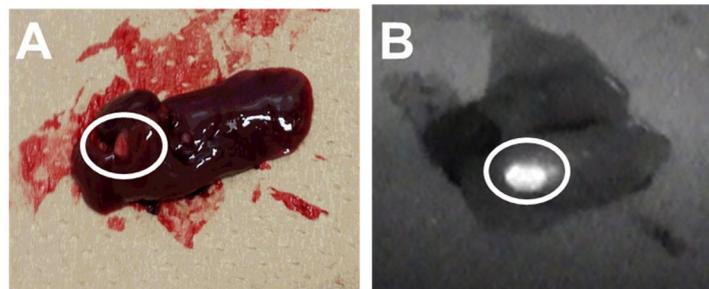


図 6 . 肝癌細胞を経脾臓移植したマウスの移植 3 週間後の肝臓。(A) 明視野像。白丸内に腫瘍組織が存在。(B) ICG 蛍光像。肝癌組織における特異的発光を検出。

続いて、腫瘍組織において発現上昇がみとめられた 2 種類の長鎖ノンコーディング RNA の発現を低下させた細胞を前述の肝転移モデルに移植して、肝臓での転移巣形成への効果を検討した。その結果、長鎖ノンコーディング RNA の発現を低下させた細胞を移植した肝転移モデルマウスでは、肝臓で形成される転移巣の数が減少した (図 7)。しかし、形成される転移巣の数における個体差が大きく、統計学的有意差を得るには至らなかった。また、長鎖ノンコーディング RNA の発現制御が移植後長期的に維持されていなかったことが示唆された。従って、恒常的な遺

伝子発現制御を達成する条件を確立し、標的とする長鎖ノンコーディング RNA の発現を低下させた細胞を樹立することを試みる必要がある。

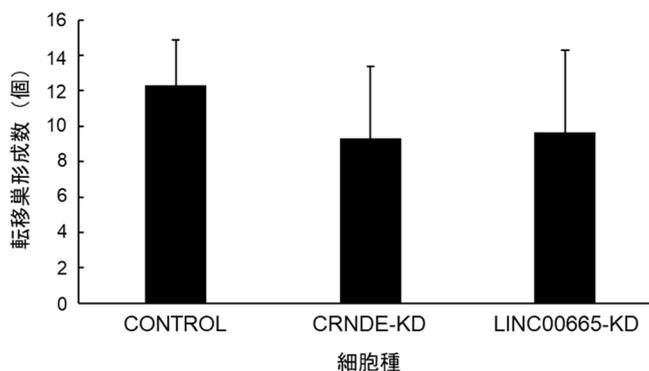


図7. CRNDE 及び LINC00665 の発現低下を誘導させた細胞を移植したマウスにおける転移巣形成数. それぞれ施行回数3回の平均値を示す.

< 参考文献 >

1. Kokudo T, Hasegawa K, Yamamoto S, Shindoh J, Takemura N, Aoki T, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugawara Y, Kokudo N. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma associated with hepatic vein tumor thrombosis. *J Hepatol.* 61(3), 583-8, 2014.
2. Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y, Ijiri K, Akimitsu N. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Lett.* 584(22), 4575-80, 2010.
3. Xia J, Inagaki Y, Sawakami T, Song P, Cai Y, Hasegawa K, Sakamoto Y, Akimitsu N, Tang W, Kokudo N. Preliminary investigation of five novel long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biosci Trends.* 10(4), 315-9, 2016.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ito Daisuke, Kawaguchi Yoshikuni, Inagaki Yoshinori, Ito Kyoji, Mihara Yuichiro, Kaneko Junichi, Tanaka Mariko, Fukayama Masashi, Kokudo Norihiro, Hasegawa Kiyoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Assessment of liver function-related mRNA expression and fluorescence imaging in outflow-obstructed regions in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 513 ~ 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-022-02588-3	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 Bae Sung Kwan, Arita Junichi, Akamatsu Nobuhisa, Maki Harufumi, Nishioka Yujiro, Kawahara Takuya, Miyata Akinori, Kokudo Takashi, Nagata Rihito, Mihara Yuichiro, Ichida Akihiko, Inagaki Yoshinori, Kawaguchi Yoshikuni, Ishizawa Takeaki, Kaneko Junichi, Tamura Sumihito, Tanaka Yasuhito, Moriya Kyoji, Hasegawa Kiyoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 The impact of the covalently closed circular DNA level on recurrence of hepatocellular carcinoma after initial hepatectomy: an analysis of patients with resolved hepatitis B virus infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 HPB	6. 最初と最後の頁 1780 ~ 1788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hpb.2022.06.013	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 Takahashi Ryugen, Ishizawa Takeaki, Sato Masumitsu, Inagaki Yoshinori, Takanka Mariko, Kuriki Yugo, Kamiya Mako, Ushiku Tetsuo, Urano Yasuteru, Hasegawa Kiyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Fluorescence Imaging Using Enzyme-Activatable Probes for Real-Time Identification of Pancreatic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2021.714527	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲垣善則
2. 発表標題 肝胆膵外科医療における生化学の貢献
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣善則、夏巨峰、澤上辰夫、宋培培、唐偉、長谷川潔
2. 発表標題 肝癌細胞におけるShufeng Jieduの抗癌効果とその誘導機構の検討
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣善則、白田力、金子順一、桐谷翔、佐藤祐充、國土貴嗣、赤松延久、有田淳一、國土典宏、長谷川潔
2. 発表標題 インドシアニングリーン特異的な近赤外光処理による肝細胞癌細胞でのアポトーシスの誘導
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	長谷川 潔  (Hasegawa Kiyoshi)  (20292906)	東京大学・医学部付属病院・教授    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	唐子 堯  (Karako Takashi)  (00313213)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・上級研究員    (82610)	

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