

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月13日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591754

研究課題名（和文）肝細胞癌の発生・進展におけるマイクロRNAの分子機能解析と治療への応用

研究課題名（英文）The molecular functional analysis of micro RNA on the occurrence and development of hepatocellular carcinoma

研究代表者

杉町 圭史（SUGIMACHI KEISHI）

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：90452763

研究成果の概要（和文）：

肝細胞癌におけるマイクロRNA発現を網羅的に解析した。肝細胞癌に対する生体肝移植症例3例を対象にして、マイクロRNAマイクロアレイを用いてマイクロRNAの発現プロファイリングを行った結果、原発巣および転移再発巣とともに非癌部肝組織に比べて高発現するmiR-18a、逆に原発巣および転移再発巣とともに非癌部肝組織に比べて低発現するmiR-199a-3pという二つの分子を同定した。

次にリアルタイムPCR法にて肝細胞癌に対する生体肝移植症例70例においてmiR-18aおよびmiR-199a-3pの個別発現解析を行ったところmiR-18aはT/N比=1.8(p<0.001)で癌部に高発現、miR-199aはT/N比=0.31(p<0.0001)で癌部にて発現が低下していた。

この二つのマイクロRNA分子の臨床的意義について検討を行った。miR-18a高発現群では腫瘍マーカー（AFP、PIVKA-II）が有意に高く、腫瘍径が有意に大きいことが分かった。逆にmiR-199a高発現群は腫瘍マーカーが低く、腫瘍血管浸潤が少ないことが分かった。miR-18a高発現群とmiR-199a低発現群はそれぞれ有意に手術後の再発が多いことが分かった。

in vitroの系にてmiR-18a、miR-199a-3pの機能解析を行った。miR-18aの標的遺伝子TNFAIP3、miR-199a-3pの標的遺伝子HIF1R、cdc42を同定した。ルシフェラーゼアッセイで標的遺伝子の発現が抑えられることを確認した。miR-18a、miR-199aを肝細胞癌細胞へ導入することによって標的遺伝子の蛋白合成が実際に抑制されることを確認した（Western blotting法）。このようにmiRが標的遺伝子の機能抑制において肝細胞癌の進展に重要な役割を果たしていることが分かった。今回の結果によってmiRが肝細胞癌の新たな治療の標的となりうることが示された。

研究成果の概要（英文）：

The expression of microRNA (miR) on hepatocellular carcinoma (HCC) was comprehensively examined by miR microarray. miR was extracted from 3 HCC cases who underwent liver transplantation. We detected miR-18a which showed high expression in cancerous lesion, and miR-199a-3p which existed in non cancerous liver tissue.

The quantitative expression analysis of miR was done using a real-time PCR method. The miR samples were collected from 70 HCC cases which underwent liver transplantation. The result showed the level of miR-18a was significantly high in cancerous lesion (T/N=1.8), and miR-199a was significantly deteriorated in cancerous lesion (T/N=0.31). The higher miR-18a and lower miR-199a were significantly correlated with higher serum AFP and DCP, and larger tumor diameter. Furthermore, those cases showed significantly worse recurrence-free survival rate after surgery.

The molecular function was analyzed in vivo using cultured HCC cells. Target genes of miR-18a, 199a

were detected using online database. We examined THFAIP3; target gene of miR-18a and HIF1R and cdc42; those of miR-199a. The expression of these target genes were significantly inhibited by transfection of the miRs in HCC cells. Our study indicated that miR-18a and miR-199a had important role on the progression of HCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、肝臓外科学

キーワード：マイクロRNA、肝細胞癌、肝移植、マイクロアレイ、リアルタイムPCR

1. 研究開始当初の背景

本邦において肝臓癌は死亡者数第3位、罹患率第4位を占めている。肝細胞癌に対して切除、局所療法、塞栓療法、肝移植などの集学的な治療が発展してきたが、ほとんどの患者がウイルス性肝炎や肝硬変を合併していることもあり未だに治療後に高頻度に再発を来し、全症例の5年生存率は35.4%である。このような現況を踏まえると肝細胞癌の治療成績の向上のためにはその腫瘍の分子的生質を解析し、肝細胞癌に特異的な新しい分子標的治療を開発することが急務であると考えられる。

近年、miRNAが癌の発生、進展において重要な役割を果たすことが分かり注目されている。miRNAとは19~25個の塩基により構成されるタンパク質をコードしない小さなRNA分子である。核内で作られた前駆体が細胞質で切り出されて成熟体となり、相補的な配列をもつメッセンジャーRNA(mRNA)と不完全にハイブリダイゼーションし、標的mRNAの翻訳抑制を行うことにより遺伝子の一次構造の変異を伴わない遺伝子のエピジェネティックな変異に重要な役割を果たしていると考えられているがそのメカニズムには未知の部分が多い。miRNAは現在までにヒトで800個ほどあると考えられており、5300以上の遺伝子の発現調節に関わっていると考えられている。miRNAの機能は多岐にわたっていると考えられその全貌は明らかでないが、特に細胞増殖、ウイルス感染、癌細胞において発現異常があることが最近報告されてきており、癌の発生、進展において

重要な役割を果たしていることが示唆されている(Esquela-Kerscher A et al, *Nat Rev Cancer*, 2006)。miRNAと癌と関係を示す例として、let7/mir-98(miRNA)がRas癌遺伝子を抑制することや、miR-17(miRNA)がc-myc遺伝子の過剰発現を誘導することで癌発生に深く関与していることなどが報告されてきている。肝細胞癌においても癌部と非癌部の間で発現に有意差を認めるmiRNAの存在が指摘されており(Kutay H et al, *J Cell Biochem*, 2006)、miRNAによるエピジェネティックな変異が肝発癌に関連していることが示唆されている。我々は今までに肝細胞癌の発生、転移、再発における上皮間葉移行、C型肝炎ウイルス感染の意義について研究、報告を行ってきた。近年のmiRNA研究の進展によりこれらの現象におけるmiRNA発現異常の役割が注目されている。

癌におけるmiRNAの領域の研究は始まったばかりで現時点では未知の部分が多いが、miRNAの機能は多岐にわたっておりmiRNAの研究は今後の癌研究において非常に重要になると考えられる。本研究では肝細胞癌におけるmiRNAの発現異常を解析する初めての研究であり、肝細胞癌のエピジェネティックな異常を明らかにするブレイクスルーとなり得る。そのため肝細胞癌の発癌、進展、転移に関する分子機構の解明に寄与し、当該領域の研究推進に貢献可能である

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞癌におけるmiRNA

の発現異常の解析と新しい治療法への応用を検討することである。肝細胞癌の発生・進展・再発における miRNA 発現異常の解析を行い、分子標的治療のターゲットとなりうる可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1)肝細胞癌における miRNA マイクロアレイを用いた miRNA 発現の網羅的解析

肝細胞癌の発生、進展、転移、再発に関連する miRNA 分子を同定するために miRNA マイクロアレイ法を用いた発現の網羅的解析を行う。具体的手順は①total RNA より小分子量 RNA のみを分離・精製、②miRNA サンプルの定量、③miRNA に蛍光色素を標識、④miRNA マイクロアレイと miRNA とのハイブリダイゼーション、⑤マイクロアレイのスクランニングを行う。

#### (2)リアルタイム PCR 法を用いた個別 miRNA の発現解析

リアルタイム PCR 法にて高感度に miRNA を定量できる方法が開発された。この方法によって少ない肝細胞癌臨床組織検体より miRNA を確実に定量することができるようになった。肝細胞癌切除標本を用いて、癌部組織、非癌部組織 (C 型肝炎感染および非感染) を摘出し、研究室において分子生物学的解析用の DNA、RNA、cDNA を調整し保存している。RNA マイクロアレイにて同定された新規 miRNA 分子の定量を行い、臨床的背景因子、病理学的因子、進行度、再発形式、予後との関連を調べる。

#### (3)miRNA の標的遺伝子発現調節機能解析

miRNA の肝細胞癌における機能を確認するために肝細胞株を使用し、*in vitro* にて機能の解析を行う。オンラインデータベースにて新規 mi-RNA の標的遺伝子を検索する。ルシフェラーゼアッセイによって mi-RNA の標的遺伝子発現調節機能を解析する。さらに mi-RNA を強制発現させることによる実際の標的遺伝子の蛋白発現の変化を Western blotting 法にて確認する。

### 4. 研究成果

まず肝細胞癌におけるマイクロRNA発現を網羅的に解析した。肝細胞癌に対する生体肝移植症例3例を対象にして、原発肝癌病巣(T)、非癌部肝組織(N)、転移再発肝癌病巣(M)からそれぞれRNAを抽出した。マイクロRNAマイクロアレイを用いてマイクロRNAの発現プロファイリングを行った。その結果、原発巣および転移再発巣とともに非癌部肝組織に比べて高発現するmiR-18a、逆に原発巣および転移再

発巣とともに非癌部肝組織に比べて低発現するmiR-199a-3pという二つの分子を同定することができた。

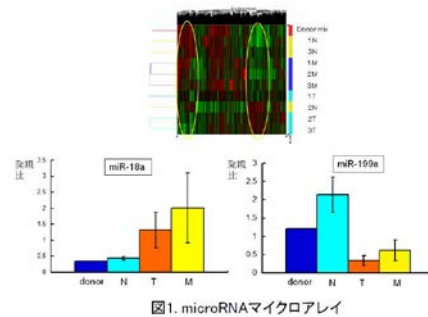


図1. microRNAマイクロアレイ

次に高感度に少ない肝細胞癌臨床組織検体より多数の検体のマイクロRNAを正確に定量することができるリアルタイムPCR法を確立した。肝細胞癌に対する生体肝移植症例70例において肝癌組織および非癌部肝組織よりそれぞれRNAを抽出し、miR-18aおよびmiR-199a-3pの個別発現解析を行った。miR-18aは非癌部において $1.1 \pm 0.7$ 倍であったのに対して癌部では $1.6 \pm 1.2$ 倍でありT/N比 $=1.8$  ( $p < 0.001$ )であった。miR-199aは非癌部において $3.4 \pm 2.5$ 倍であったのに対して癌部では $1.0 \pm 1.3$ 倍でありT/N比 $=0.31$  ( $p < 0.0001$ )と癌部で有意に発現が低下していることが判明した。

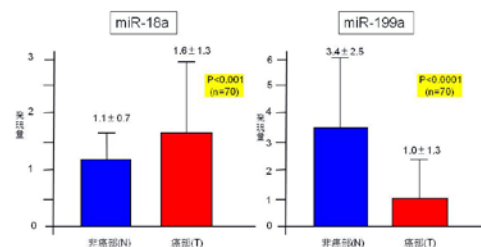


図2. 癌部、非癌部のmicroRNA発現

次にこの二つのマイクロRNA分子の臨床的意義について検討を行った。miR-18a高発現群では腫瘍マーカー(AFP, PIVKA-II)が有意に高く、腫瘍径が有意に大きいことが分かった。逆にmiR-199a高発現群は腫瘍マーカーが低く、腫瘍血管浸潤が少ないことが分かった。手術後の肝癌再発率を検討したところ、miR-18a高発現群とmiR-199a低発現群はそれぞれ有意に手術後の再発が多いことが分かった。以上の結果より、miR-18aおよびmiR-199aの腫瘍における発現は肝細胞癌の生物学的特性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

日本消化器外科学会定期学術総会（2009年7月17日）

2. 森田和豊、調 憲、武富紹信、本村貴志、間野洋平、武石一樹、戸島剛男、梅田健二、萱島寛人、二宮瑞樹、内山秀昭、副島雄二、前原喜彦：「肝細胞癌に対する生体肝移植後の予後因子としてのmicroRNAの意義」第20回日本消化器癌発生学会総会（2009年11月27日）

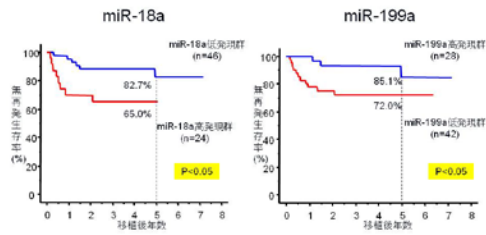


図3. 移植後無再発生存率

in vitro の系にて miR-18a、miR-199a-3p の機能解析を行った。オンラインデータベースにて miR-18a の標的遺伝子 TNFAIP3 (TNF  $\alpha$  刺激により誘導され、NF  $\kappa$ B を抑制するタンパク)、miR-199a-3p の標的遺伝子 HIF1R、cdc42 (Rho の subfamily。細胞周期の進行、アクチンの形成に関わる) を同定した。ベクターに miR 遺伝子を導入し luciferase assay にて標的遺伝子の発現が抑えられることを確認した。次に Western blotting 法にて miR-18a、miR-199a を肝細胞癌細胞へ導入することによって標的遺伝子の蛋白合成が実際に抑制されることを確認した。このように miR が標的遺伝子の機能抑制において肝細胞癌の進展に重要な役割を果たしていることが分かった。

Anti-miR-18a, pre-miR-199a (Ambion) を肝細胞癌株(PLC/PRF5)に導入して、48時間後の標的遺伝子の発現をWestern blotで評価。



図4. miRNA標的遺伝子の検討

#### 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 1 件)

1. Morita K, Taketomi A, Shirabe K, Umeda K, Kayashima H, Ninomiya M, Uchiyama H, Soejima Y, Maehara Y. Clinical significance and potential of hepatic microRNA-122 expression in hepatitis C. Liver Int. 2011;31:474-84.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 森田和豊、武富紹信、梅田健二、井口友宏、永田茂行、杉町圭史、池上 徹、祇園智信、副島雄二、前原喜彦：「C型肝炎における肝組織中のmicroRNA-122発現の意義」第64回

3. K Morita, K Shirabe, A Taketomi, T Motomura, Y Mano, K Takeishi, T Toshima, K Umeda, H Kayashima, M Ninomiya, H Uchiyama, Y Soejima, Y Maehara. Clinical significance of microRNA expression as a prognostic factor after living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. American Society of Clinical Oncology 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium: Science and Multidisciplinary Management of GI Malignancies. January 22-24, 2010, in Orlando, Florida

4. 森田和豊、調 憲、武富紹信、本村貴志、間野洋平、武石一樹、戸島剛男、梅田健二、萱島寛人、二宮瑞樹、内山秀昭、副島雄二、前原喜彦：「肝細胞癌に対する生体肝移植後の予後因子としてのmicroRNA発現の意義」第110回日本外科学会総会（2010年4月8日～10日）

5. K Morita, K Shirabe, A Taketomi, T Motomura, Y Mano, K Takeishi, T Toshima, H Uchiyama, Y Soejima, Y Maehara. MicroRNA-18/199 regulates progression of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. 第69回日本癌学会総会（2010年9月22日～24日）

6. 森田和豊、調 憲、前原喜彦：「肝細胞癌に対する生体肝移植後の予後因子としてのmicroRNA発現の意義」JDDW2010 第8回日本消化器外科学会大会（2010年10月13日～16日）

7. K Morita, K Shirabe, A Taketomi, T Motomura, Y Mano, K Takeishi, T Toshima, K Umeda, H Kayashima, M Ninomiya, H Uchiyama, Y Soejima, Y Maehara. MicroRNA-18/199 regulates progression of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. The 7th International Symposium on Cancer Research and Therapy. November 26-27, 2010, Tokyo, Japan

8. K Morita, K Shirabe, A Taketomi, T

Motomura, Y Mano, K Takeishi, T Toshima, H Uchiyama, T Yoshizumi, Y Maehara. Clinical significance of microRNA expression as a prognostic factor after living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. 6TH International Society of gastroenterological Carcinogenesis (ISGC). January 6-8, 2011, Houston, Texas

9. 森田和豊、調 憲、武富紹信、本村貴志、間野洋平、戸島剛男、萱島寛人、池上 徹、吉住朋晴、前原喜彦：「肝細胞癌に対する生体肝移植後の予後因子としての microRNA の意義」第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (2011 年 6 月 24 日 ワークショップ 東京)

10. 森田和豊、調 憲、武富紹信、吉屋匠平、武藤 純、的野る美、本村貴志、間野洋平、戸島剛男、橋本直隆、萱島寛人、増田稔郎、池上 徹、吉住朋晴、前原喜彦：「肝細胞癌に対する生体肝移植後の予後因子としての microRNA の意義」第 49 回日本癌治療学会学術集会 (2011 年 10 月 27 日 ワークショップ 7 名古屋)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉町 圭史 (SUGIMACHI KEISHI)  
九州大学・大学病院・特任助教  
研究者番号：90452763

### (2) 研究分担者

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：80165662

武富 紹信 (TAKETOMI AKINOBU)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：70363364

池上 徹 (IKEGAMI TORU)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：80432938