

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 5 月 28 日現在

機関番号：32666
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591784
 研究課題名（和文） 肝内胆管癌におけるマイクロ RNA の役割解明とバイオマーカー開発のための分子基盤
 研究課題名（英文） Profiling and functional analyses of microRNAs in human intrahepatic cholangiocarcinoma
 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(和文):胆管上皮細胞特異的 miRNA の標的となる mRNA の同定と機能解析を行いました。胆管上皮細胞特異的 miRNA の標的 mRNA が受容体チロシンキナーゼ関連分子である成長因子受容体結合蛋白質が標的分子であることを明らかにしました。肝内胆管癌細胞では、胆管上皮細胞特異的 miRNA の発現が抑制されることで成長因子受容体結合蛋白質の発現抑制が解除され、その発現が上昇し、成長因子からチロシンキナーゼ型受容体を介した下流のシグナル伝達が増強された結果、肝内胆管癌の細胞運動能が向上する新知見を見出しました。

研究成果の概要(英文): We examined functional analysis of biliary epithelial cell-specific miRNAs in a human intrahepatic cholangiocarcinoma cell line (HuCCT1). We identified a growth factor receptor binding protein (GRB), which is implicated in tyrosine kinase signal transduction, as a biliary epithelial cell-specific miRNA target. It is likely that upregulation of the GRB protein by downregulation of the biliary epithelial cell-specific miRNAs contributes to motility in HuCCT1.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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:外科学、胆道、癌、microRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、microRNA (miRNA) は転写後の遺伝子発現を調節する“機能性 RNA 分子”として注目されています。Small RNA のうち、内在性の長さ 22 塩基程度の 1 本鎖 RNA である miRNA は、miRNA と部分的に相補的な、標的となる mRNA と結合し、翻訳抑制作用を有すると考えられています。miRNA は、2000 種類近いヒト miRNA が同定され、様々な組織や疾患における miRNA のプロファイルおよびその機能解析が進みつつあります。また、臨床的には、miRNA を癌の診断・治療予後判定における新規バイオマ

ーカーとしての有用性が期待されています (Calin and Croce *Nat Rev Cancer* 6: 857-866, 2006)。しかし、肝内胆管癌に関しては、特徴的な miRNA のプロファイリングや役割は明らかにされていません。

我々は、「肝内胆管癌における miRNA の役割の解明と、miRNA を臨床ツールとして応用することは、新しい診断・治療法の開発や創薬への突破口を開く大きな可能性を秘めている」と考え、平成 19-20 年度基盤研究(C)「胆道系悪性腫瘍に特異的なマイクロ RNA の機能解析」の助成をいただき、肝内胆管癌由来の細胞株を用いて

miRNA 発現プロファイル解析を行いました。肝内胆管癌細胞株 (HuCCT1) と正常ヒト胆管上皮細胞 (HiBEpic) から miRNA のクローニングとシーケンス解析に成功しました。この解析により胆管系正常および悪性細胞株に特徴的な、27種類の miRNA を同定しました。さらに、その内の9種類の miRNA (*miR-22*, *miR-125a*, *miR-127*, *miR-199a*, *miR-199a**, *miR-214*, *miR-368* [*miR-376c*], *miR-376a*, *miR-424*) は、正常胆管上皮細胞に特異的な miRNA であり、肝内胆管癌細胞株では発現が抑制されていることを明らかにすることができました (Kawahigashi et al. *J Nippon Med Sch* 77:188-197, 2009)。

そこで、特異的 miRNA の転写後翻訳調節が肝胆道系疾患 (肝内胆管癌、閉塞性黄疸等) 関連シグナル伝達経路にどのように関わるのか、網羅的な分子レベルでの機能解析を目指すとともに、*in vitro* の解析から *in vivo* の解析 (臨床解析) を進めることにより、miRNA の切り口から肝胆道系疾患の分子病態の解明と診断のための新規バイオマーカー開発のための基盤研究を進めたいと考えました。

2. 研究の目的

胆管上皮細胞特異的 miRNA の標的となる mRNA の同定を行います。次に、胆管上皮細胞特異的 miRNA の疾患 (肝内胆管癌、閉塞性黄疸等) に関連するシグナル伝達経路におよぼす効果を網羅的に解析するとともに、特異的 miRNA の増殖・浸潤・転移に関する機能解析を行い、miRNA の役割解明を目指します。さらに、病理組織標本から胆管上皮細胞特異的 miRNA の発現プロファイルを明らかにし、バイオマーカーとしての miRNA の有用性の検討を行い、臨床展開のための基盤解析を進めます。

3. 研究の方法

(1) 胆管上皮細胞特異的 miRNA の標的 mRNA の検証と、miRNA の機能解析を行いました。

①ルシフェラーゼ・アッセイによる標的 mRNA の検証

胆管上皮細胞特異的 miRNA の標的 mRNA の 3'-非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子のコード領域の下流に挿入したレポータープラスミドを構築し、これを当該 miRNA とともに COS-7 等に導入し、培養を行いました。細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性について、発光・蛍光測定用マルチプレートリーダー (プロメガ社 GloMax-Multi Luminescence System) 等を用いて測定した。

②miRNA 機能解析: RTK→Ras/Raf/MAPK カスケード解析

培養肝内胆管癌細胞株 (HuCCT1 等) に、Ambion 社 Pre-miR miRNA Precursor Molecules にて特異的 miRNA を過剰発現させます。試薬投与後に蛋白質、RNA を抽出しました。RTK→

Ras/Raf/MAPK カスケード等のシグナル分子 (EGF 受容体、Grb、Ras、MAPK 等) を、Western blot にて蛋白レベル、real-time PCR (Applied Biosystems 社 7900HT Fast リアルタイム PCR システム) にて mRNA レベルにおける標的 mRNA の発現変動を定量的解析し、miRNA による転写後翻訳調節を解析しました。さらに、上記と同様に細胞より、RNA を回収し、高分解能マイクロアレイスキャナ (Agilent 社 G2565CA) を用いて、網羅的分子相互作用の解析の準備を進めました。

③miRNA 発現のエピジェネティック解析: DNA メチル化パターン解析

培養肝内胆管癌細胞株と正常胆管上皮細胞より DNA を回収し、バイサルファイト処理後、胆管上皮細胞特異的 miRNA の上流領域のシーケンス解析 (Applied Biosystems 社 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer) を行いました。

(2) 閉塞性黄疸の miRNA プロファイル解析

生後 8 週 BALB/c マウスの胆管を結紮し切離することで閉塞性黄疸モデル (BDL モデル) を作製しました。12 時間後、1 週間後に BDL モデルと sham モデル (コントロール) から肝臓を摘出した。発現プロファイリング解析 (シーケンス解析) を行いました。次に、BDL モデルに特徴的な miRNA、胆管上皮細胞特異的 miRNA の発現に関して、real-time PCR 法を用いた定量的検証を行いました。さらに、発現に有意差を認めた miRNA の発現部位を同定するためレーザーマイクロダイセクション (ライカ社 LMD6000) を用いてモデルマウス胆管、肝実質を切り出し、定量的発現解析を行いました。In vitro 解析として、ヒト正常胆管上皮細胞 (HiBEpic) にインターロイキン 6 (IL6) を作用させ増殖と miRNA の関係を調べました。

(3) 肝内胆管癌バイオマーカー開発

手術症例の肝内胆管癌パラフィン包埋ブロック標本から、パラフィンブロックより切片を作製します。レーザーマイクロダイセクションにて癌病変部位、正常胆管部位を回収し、RNA を抽出しました。real-time PCR にて miRNA の発現解析を行いました。

4. 研究成果

(1) 胆管上皮細胞特異的 miRNA の標的 mRNA の検証と miRNA の機能解析

胆管上皮細胞特異的 miRNA の標的 mRNA の 3'-非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子のコード領域の下流に挿入したレポータープラスミドを構築し、当該 miRNA とともに COS-7 等に導入・培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼアッセイにより、受容体チロシンキナーゼ関連分子である成長因子受容体結合蛋白質が標的分子であることを証明しました。胆管上皮細胞特異的 miRNA は、正常胆管上皮細胞で

は特異的に発現していますが、肝内胆管癌細胞株 (HuCCT1) では発現していません。そこで、HuCCT1 細胞に特異的 miRNA を過剰発現させ、運動能、増殖能、アポトーシスの解析を行いました。増殖の抑制は認められませんでした。しかし、トランズウェルを用いた運動能解析から、過剰発現後にウェル下面に移動した細胞数をカウントすると、胆管上皮細胞特異的 miRNA を過剰発現させた HuCCT1 細胞では移動した細胞が有意に減少することを見出しました。このことは、肝内胆管癌細胞では胆管上皮細胞特異的 miRNA の発現が抑制されることで成長因子受容体結合蛋白質の発現抑制が解除され、その発現が上昇し、成長因子からチロシンキナーゼ型受容体を介した下流のシグナル伝達が増強された結果、肝内胆管癌の細胞運動能が向上することが示唆されました(論文投稿準備中)。さらに、上皮成長因子受容体から癌細胞の浸潤抑制へリンクするシグナルカスケードを解明するため、マイクロアレイによる網羅的解析とバイオインフォマティクス解析の準備を進めました。

miRNA 発現抑制の制御機構の一端を明らかにするために、DNA メチル化解析(エピジェネティック解析)を行いました。バイサルファイト処理シーケンシング法により、胆管上皮細胞特異的 miRNA の上流域に存在する CpG アイランドのメチル化解析を行いました。正常胆管上皮細胞と比較して HuCCT1 細胞では強くメチル化されていました。さらに、HuCCT1 細胞に DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を細胞に添加することで、胆管上皮細胞特異的 miRNA の発現が検出されるようになりました。この解析から、HuCCT1 細胞では、胆管上皮細胞特異的 miRNA の発現がエピジェネティックな制御により抑制されていることが明らかとなりました。

(2) 閉塞性黄疸の miRNA プロファイル解析

マウス肝臓組織の small RNA ライブラリー解析から、最も多くクローニングされた miRNA は、miR-122 でした。プロファイル解析 (BDL モデルと sham モデルの比較解析) から特徴的な miRNA、13 個を見出しました。これらのうち 9 個の miRNA (*let-7a*、*let-7d*、*let-7f*、*let-7g*、*miR-21*、*miR-125b-5p*、*miR-194*、*miR-221*、*miR486*) に関して real-time PCR 法を用いた定量的検証を行い、BDL モデルにおいて高発現していることを突き止めました。胆管上皮細胞に特徴的な miRNA のうち、シーケンシング解析において BDL モデルにのみ発現を認めた miRNA (*miR-125a-5p*、*miR-199a-3p*、*miR-199a-5p*、*miR-214*) に関して real-time PCR 法を用いた定量的検証を行ったところ、*miR-199a-3p*、*miR-199a-5p*、*miR-214* は、BDL モデルの肝臓で有意に発現上昇していることが確認できました。レーザーマイクロダイセクションによる解析から、*miR-21* は BDL モデルの肝実質、胆管ともに

有意に高発現していることを見出しました。*miR-199a-5p* は BDL モデルの胆管にのみ有意に高発現を示しました。次に、培養ヒト正常胆管上皮細胞に IL6 を作用させると、細胞の増殖に一致し、*miR-199a-5p* の発現が上昇することを見出しました。

BDL モデルの miRNA 発現プロファイルを解析することにより、閉塞性黄疸に特徴的な miRNA をはじめて明らかにすることができました。また、BDL モデルマウスの *in vivo* 解析、および IL6 で刺激した胆管細胞の *in vitro* 解析より、胆管上皮細胞に特徴的な miRNA である *miR-199a-5p* は、胆管上皮細胞の増殖に関与している可能性が示唆されました。

(3) 肝内胆管癌バイオマーカー開発

肝内胆管癌の病理標本の発現解析を進めました。しかし、レーザーマイクロダイセクションにより回収したサンプルから、安定して発現が検出できず、微量の RNA 抽出およびその濃度測定を正確に行う技術開発が必要となりました。技術開発に成功し、レーザーマイクロダイセクションにより組織標本切片から癌細胞を回収し、開発したプロトコールを用いて RNA を抽出し、プロファイル解析を継続して行っていますが、*in vivo* の臨床解析は課題として残されました。

また、胆汁に含まれる miRNA 解析を行い、胆汁中の miRNA、特に *miR-9* が胆管癌のバイオマーカーとして有用であることを見出しました。

今回の基盤研究により、肝胆道系疾患の分子病態の解明、新しい診断・治療ツールの開発に役立つ miRNA 研究としての成果を収めることができました。

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 5 件)

- (1) Shigehara K, Yokomuro S, Ishibashi O, Mizuguchi Y, Arima Y, Kawahigashi Y, Kanda T, Akagi I, Tajiri T, Yoshida H, Takizawa T, Uchida E. Real-time PCR-based analysis of the human bile microRNAome identifies miR-9 as a potential diagnostic biomarker for biliary tract cancer. *PLoS One* 6: e23584, 2011. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0023584
- (2) Mizuguchi Y, Mishima T, Yokomuro S, Arima Y, Kawahigashi Y, Shigehara K, Kanda T, Yoshida H, Uchida E, Tajiri T, Takizawa T. Sequencing and bioinformatics-based analyses of the microRNA transcriptome in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 6: e15304, 2011. 査読有 doi:

- 10.1371/journal.pone.0015304
- (3) 菊池邦生, 石橋幸, 竹下俊行, 瀧澤俊広. 絨毛と胎盤をめぐる新知見【絨毛研究最前線4】絨毛細胞におけるマイクロRNA. 臨床婦人科産科 65:254-259, 2011. 査読無
 - (4) Kanda T, Ishibashi O, Kawahigashi Y, Mishima T, Kosuge T, Mizuguchi Y, Shimizu T, Arima Y, Yokomuro Y, Yoshida H, Tajiri T, Uchida E, Takizawa T. Identification of obstructive jaundice-related microRNAs in mouse liver. *Hepato-Gastroenterology* 102-103: 1013-1023, 2010. 査読有PMID:21410023
 - (5) 石橋幸, 羅善順, 石川朋子, 小管拓治, 倉品隆平, 石川源, 朝倉啓文, 泉章夫, 大口昭英, 松原茂樹, 竹下俊行, 瀧澤俊広. マイクロRNA 3.女性生殖器(胎盤)におけるマイクロRNA. 産婦人科の実際 59: 2077-2083, 2010. 査読無

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 菊池邦生, 曲光瑾, 羅善順, 瀧澤俊広. 胎盤特異的microRNAの発現に關与するCpG配列のメチル化解析. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012 年 3 月 26 日 山梨
- (2) 菊池邦生, 川東豊, 石川朋子, 三嶋拓也, 水口義昭, 石橋幸, 吉田寛, 内田英二, 瀧澤俊広. 肝内胆管癌で発現が抑制されているmiRNAの機能解析の試み. 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2011 年 3 月 30 日 神奈川
- (3) 菊池邦生, 川東豊, 石川朋子, 三嶋拓也, 水口義昭, 石橋幸, 吉田寛, 内田英二, 瀧澤俊広. 肝内胆管癌で発現が抑制されているmiRNA の同定と機能の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 9 日 兵庫
- (4) 菊池邦生, 川東豊, 石川朋子, 三嶋拓也, 水口義昭, 石橋幸, 吉田寛, 内田英二, 田尻孝, 瀧澤俊広. 胆管上皮細胞で発現するmiRNAのプロファイリングと機能解析の試み. 第 12 回日本RNA学会年会 2010 年 7 月 28 日 東京
- (5) 菊池邦生, 川東豊, 石川朋子, 三嶋拓也, 水口義昭, 石橋幸, 吉田寛, 内田英二, 田尻孝, 瀧澤俊広. 胆管上皮細胞に発現しているmiRNAの機能解析. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 3 月 28 日 岩手

[その他: 学術賞]

- (1) 川東豊, 三嶋拓也, 水口義昭, 有馬保生, 横室茂樹, 神田知洋, 石橋幸, 吉田寛, 田尻孝, 瀧澤俊広. MicroRNA profiling of

human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines reveals biliary epithelial cell-specific microRNAs. *J Nippon Med Sch.* 77:188-197, 2009. 査読有 優秀論文賞 日本医科大学医学会(第 78 回日本医科大学医学会総会) 2010 年 9 月 4 日 東京

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

吉田 寛 (YOSHIDA HIROSHI)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60246999

菊池 邦生 (KIKUCHI KUNIO)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 22791553

(3)連携研究者

()
研究者番号: