

## 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 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590727

研究課題名（和文） 肝線維化の制御による肝発癌抑制方法の開発

研究課題名（英文） The development of method for liver fibrosis inhibition by controlling liver fibrosis

研究代表者

村上 善基 (MURAKAMI YOSHIKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：00397556

研究成果の概要(和文):慢性肝疾患は適切な治療を行わなければ経過中線維化が進行する、今回慢性C型肝炎の肝組織とマウス支援課炭素モデルの肝組織を使ってヒトとマウス共通して肝線維化に関係するマイクロRNAを同定した。これらのマイクロRNAは肝線維化に関係するprocollagen alpha-1の発現を誘導した。また年齢が進み長期にわたるHCV感染では発癌率が亢進するが、60歳を境に発癌に関与するマイクロRNAが異なっていることを示した。

研究成果の概要(英文): Liver fibrosis in chronic liver disease was progressed without suitable medical treatment. We clarified the microRNA (miRNA) of which aberrant expression was related to the progression of liver fibrosis by using microarray analysis in liver tissue of 105 chronic hepatitis C patients and carbon tetrachloride mouse model. We determined the expression pattern of same human and mouse miRNAs accordance to the progression human and mouse liver fibrosis. Then treatment of these miRNAs induced the overexpression of procollagen alpha 1 in human stellate cell lines LX-2. Finally long duration of infection. Moreover, although age progressed and the rate of oncogenesis rose in the HCV infection over a long period of time, it was shown that the microRNAs which participate in oncogenesis bordering on 60 years old differ.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科・肝臓学

キーワード：マイクロRNA、肝線維化、肝発癌

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において肝細胞癌は年間に男性で2万人以上、女性でも1万人以上みられ、死因も

癌の中で第5位を占めるため、肝発癌の制御はきわめて重要である。肝癌治療の問題点は肝外だけではなく肝内への腫瘍転移が

ある事、多中心性発癌という肝臓独特の発癌様式がある事により再発率も高く、5年生存率は50%程度にとどまる。そのため肝癌に至ってからの癌治療ではなく、慢性肝炎、肝硬変時の肝発癌抑制は患者自身の肉体的、精神的苦痛を軽減するだけではなく、保険、医療の向上や医療費の削減に役立つと考えられる。現在の慢性肝疾患からの発癌抑制の主たるものは慢性C型肝炎におけるペグインターフェロンとリバビリン併用療法である。しかし日本人に多いHCV遺伝子型1b感染例では本治療方法による奏率が50-60%であり、十分に制御しているとは言えない。また肝硬変は持続的な炎症の結果肝線維化が進行し肝組織の構築が変わってしまい発癌ポテンシャルをあげる。肝線維化進行防止は有効な発癌予防策であるが、現在肝線維化を直接のターゲットとした治療法はなく、肝硬変に至ってしまった場合には主に対症療法が行なわれている。マイクロRNAは全長22nt程度の小分子RNAで生物の発生、分化など生命現象に深く関わっており、その発現異常は疾患との関わりで注目されている。我々は今まで慢性肝疾患(慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌)それぞれに特異的なマイクロRNA発現プロファイルを得た。さらに慢性C型肝炎においてペグインターフェロンとリバビリン併用療法治療効果別、組織学的肝線維化別、また肝癌の悪性度を反映する組織学的分化度について固有のマイクロRNA発現プロファイルを得た。これらの情報は病態解析を解明するのに有用であり、さらに各病態を診断するためのバイオマーカーとしての利用が期待できる。本解析はマイクロRNA情報基盤を利用して患者個人の臨床情報に応じた肝癌発生抑制方法の開発を目標とする。

## 2. 研究の目的

### (1) 慢性肝疾患の制御による肝発癌予防。

慢性肝炎は持続的な炎症に引き続き肝線維化が起こり、肝組織の構築の改変が起こり、最終的に肝硬変に至る。我々は今までに現在の標準的治療であるペグインターフェロン+リバビリン併用療法の治療効果予測の作成を行った。抗ウイルス治療歴のない患者を対象に併用療法前の肝生検組織 99 例を用いて SVR(sustained virological responder)、R(relapse)、NR(non responder)それぞれ特異的なマイクロ RNA

発現プロファイルを作成した。これをもとに Monte Carlo Cross Validation(MCCV)を用いて治療効果予測を行った所 SVR と non SVR の分別は accuracy 70.5%の確率で行うことができた、引き続き R と NR の分別は accuracy70.0%であった。さらに肝線維化程度別 (F0 から F3 まで) のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。これを元に肝線維化の分別診断を Leave one out cross validation(LOOCV)を用いて行なったところ 80-82%の確率で分別する事が出来た。これらの情報を利用してインターフェロン応答や肝線維化の程度を診断する新規バイオマーカーの作成を試みる。またこの情報を元にインターフェロン治療に代わる新規抗ウイルス活性のもつ遺伝子の探索と、肝線維化の制御を目指した遺伝子治療開発の基盤整備を行う。

### (2) 肝発癌メカニズムの解明を基にした新規肝癌治療方法の開発。

我々は外科的に切除した肝臓癌を用いて組織学的分化度別のマイクロ RNA 発現プロファイルを報告した (Murakami et al. Oncogene. 2006)。この中で組織学的分化度と相関して発現の亢進するマイクロ RNA が 1 種、低下するマイクロ RNA を 7 種同定した。組織学的分化度は病期の進展、予後予測に有用である。本解析では組織学的分化度を診断するための新たなバイオマーカーの作成を行ない。この結果を元にマイクロ RNA の発現異常が肝癌罹患患者の予後予測にどのように影響するかを明らかにする。またこの情報基盤を用い分化誘導を利用した新たな肝癌の遺伝子治療の開発を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 慢性肝疾患の制御による肝発癌予防 (1-1)マイクロ RNA を用いた肝線維化の制御

平成 22 年  
過去にウイルスの治療歴のない患者のペグインターフェロンとリバビリン併用療法直前に採取した肝生検組織 105 例を用い肝線維化の程度別のマイクロ RNA 発現プロファイルをマイクロアレイ解析にて得た。肝線維化の程度に応じて発現の上昇したマイクロ RNA、逆に発現の低下したマイクロ RNA をそれぞれ同定した。マウスの慢性肝疾患モデルの一つである四塩化炭素投与マウスを用いて、肝に線維化を起こした場合に発現が亢進したマイクロ RNA を同定した。こ

の二つの実験でマウスとヒトマイクロ RNA を比較したところ二つのマイクロ RNA ファミリーがそれぞれ肝線維化の進展に応じて発現が亢進している事を見いだした。この結果を確認するためにヒト星細胞株 (LX2) にそれらのマイクロ RNA ファミリーを過剰発現したところ、MMP13, TIMP1, TIMP2, procollagen alpha1 など線維化を惹起したときに発現が亢進する遺伝子の発現が亢進していた。以上の結果よりこれらのマイクロ RNA ファミリーは肝線維化に関与していると考えた。

肝線維化は現在肝組織の病理組織学の診断が golden standard となっている、血液検査、画像診断にてある程度の推定はできるものの、正確性は病理組織の診断に及ばないのが現状であるが、肝組織の診断に慣れた病理医の診断であることと、診断医のバイアスが全く入らない事が除外できない事が問題である。肝線維化の程度を数量化し、客観的な診断をするためにマイクロ RNA の発現パターンを肝線維化の程度を診断するためのバイオマーカーを作製する。さらに肝線維化のメカニズム解析のために肝線維化の程度に応じて発現の変化したマイクロ RNA のターゲット遺伝子の同定を行い、マイクロ RNA が *in vitro* で線維化を起こすメカニズム解析をする。

平成 23 年以降

肝線維化のバイオマーカー作成のために validation set を作成し、平成 22 年度まで得られた training set の結果を検証する。線維化の程度に応じて発現の変化のあったマイクロ RNA とそのターゲット遺伝子の同定を試み、LX2 を用いて *in vitro* でこれらの遺伝子が線維化に関与している事を検討する。特に線維化の程度が亢進するに連れて発現の低下するマイクロ RNA または発現が亢進するマイクロ RNA のターゲット遺伝子 (ターゲット遺伝子は線維化の亢進とともに発現が低下する) が *in vitro* で確認できた際には *in vivo* で四塩化炭素にて線維化を誘導させた ICR マウスを用い、線維化制御実験を試みる。また我々はマイクロ RNA を効率よく肝に発現させ、肝毒性は見られない drug delivery 技術を確立している。この方法を用い新たな治療方法の開発を試みる。

(1-2) ペグインターフェロン+リバビリン併用療法応答のメカニズム解析と新規抗

ウイルス治療法の確立 平成 22 年度  
ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果別のマイクロ RNA 発現プロファイルを利用し、解析件数を増やす事によって結果の検証とより有効な治療効果予測バイオマーカー作成を行なう。また平行してインターフェロン関連遺伝子 200 種の発現解析が出来るマイクロアレイを用い、同様に治療効果別のインターフェロン関連遺伝子発現プロファイルを作成した。両者の情報を元により正確性の高い薬物治療効果予測方法の作成、インターフェロン関連遺伝子を制御するマイクロ RNA の同定、を試みる。

平成 23 年以降

インターフェロン治療反応にはいろいろな因子があるが代表的なものに HCV 遺伝子型別差、特に日本人に多い遺伝子型 1b は遺伝子型 2a に比べて効果が弱いことが知られている。既に遺伝子型 1b 型におけるマイクロ RNA 発現プロファイルとインターフェロン関連遺伝子発現プロファイルを作成した。50-60 例をめどに遺伝子型 2a に感染している患者よりマイクロ RNA 発現解析とインターフェロン関連遺伝子解析を行ない、それぞれの遺伝子群にて特有のプロファイル作成を試みる。この結果を元に発現の異なった遺伝子がインターフェロン応答にどのように影響するか、また現在の所全くわかっていない遺伝子型別のインターフェロン応答に違いがあるか否かを解析し、*in vitro* では既に遺伝子型 2a の塩基配列を持つレプリコン細胞 JFH1 を用いて、発現に差が見られた遺伝子の機能の同定を行なう。以上の事より薬剤における C 型肝炎ウイルスが宿主に及ぼす影響を明らかにし、新規抗ウイルス分子の発見と、治療法開発の情報基盤作成とする。

## (2) 肝発癌メカニズムの解明を基にした新規肝癌治療方法の開発

組織学的分化度を反映するマイクロ RNA 発現プロファイルの作成とマイクロ RNA 発現プロファイルを用いた肝癌の臨床情報と予後予測の解析

平成 22 年度

肝癌の組織学的分化度 (高分化度 5 例、中分化度 14 例、未分化 3 例) の肝癌を用いてそれぞれの分化度に応じたマイクロ RNA 発現プロファイルを確立した (Murakami Y et al. 2006 Oncogene)。追加解析数を 45 例程

度に増やし、現在得られている結果の確認を行なう。これらの情報を元に組織学的分化度を規定するマイクロ RNA を同定し、平行してそれぞれのマイクロ RNA についてターゲット遺伝子の同定を試みる。

また肝癌における臨床情報（遠隔転移の有無、治療反応性、予後）毎にマイクロ RNA 発現プロファイルの作成を試みる。ちなみにマイクロ RNA をマイクロアレイ解析する際の利点として、マイクロ RNA 発現は mRNA に比較して個体差の影響をあまり受けず、搭載される probe 数はマイクロ RNA が 700 程度であるのに対し、mRNA では 20000 前後になる事から、有意差のあるプロファイル作成には有用なツールと考えている。

治療反応性は黒田らが開発した白血病細胞の薬物治療を末梢血のマイクロ RNA の発現パターンにて同定できる方法を利用する (Tanaka M et al. PLoS One. 2009)。この方法で末梢血中の exosome 画分のマイクロ RNA を realtime PCR にて解析したところ肝癌の治療（外科的切除）前後の 10 例で、一つのマイクロ RNA の発現が切除前に低かったものが有意に上昇し、再発すると同じマイクロ RNA の発現が低下している事を見いだした（投稿準備中）。この結果は AFP 等の治療に対するバイオマーカーになりうるものである。これを利用し外科的に切除する方法だけではなく、経血管的に治療する (TACE)、ラジオ波焼却 (RFA)、VEGF 阻害剤のソラフェニブ投与、等の各種治療において、マイクロ RNA 発現解析を行なう。

平成 23 年以降

組織学的悪性度に関係したマイクロ RNA とそのターゲット遺伝子の同定を試みる。

解析に供した肝癌の臨床情報（組織学的分化度、転移の有無、腫瘍の大きさ、腫瘍マーカー、など）と治療した後の再発の有無と関係したマイクロ RNA 発現プロファイルをそれぞれ作成し、臨床病期や予後予測等の利用、薬剤反応性をはじめとした治療に対する有効性の予測などが出来るようなデータベースの作成を試みる。これらを利用して患者個人情報に応じた肝癌治療戦略（治療の選択、副作用発現の予測、予後予測）をたて、患者の QOL 向上を目標とする。

#### 4. 研究成果

(1) 肝線維化に関係したマイクロ RNA (miRNA) の同定  
慢性 C 型肝炎患者 105 例を用いて線維化の

程度別に肝組織中マイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。また四塩化炭素投与にてマウス慢性肝疾患モデルを作成し、肝線維化に関与した miRNA を同定した。これらの情報から肝線維化の進行に応じて発現の亢進している miRNA を 10 種、低下している miRNA を 10 種選択し、肝星細胞株の LX-2 に強制発現を行った。線維化の影響は LX-2 の細胞増殖能、線維化に係る遺伝子発現能 (procollagen alpha-1、platelet derived growth factor receptor beta、tumor necrosis factor beta) を解析した。細胞増殖能はどの miRNA を過剰発現しても有意差を持つものは見られなかったが、遺伝子発現は miR-A と miR-B にて亢進しており、miR-C、miR-D、miR-E では抑制されていた。以上よりこれら 5 種の miRNA をマウス肝線維化モデルに投与し肝線維化への影響を観察する。

#### (2) 肝細胞癌の組織学的悪性度別のマイクロ RNA

肝細胞癌 (HCV 由来) の患者 73 例を用いて組織学的悪性度に関するマイクロ RNA を同定した。このマイクロ RNA の発現は生存率には影響しなかったが、再発度には差が見られた。また発癌年齢を 60 歳未満と 60 歳以上に分けたところ発癌に関係している miRNA が異なっており、年齢別に発癌のメカニズムが変わっていることが示唆された。

#### 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 9 件)

- ① Toyoda H, Kumada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Kitabatake S, Murakami Y. Association between Hepatic Steatosis and Hepatic Expression of Genes Involved in Innate Immunity in Patients with Chronic Hepatitis C. Cytokine in press
- ② Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W, Brojigin N, Kaneoka Y, Maeda A,

- Kumada T, Kawada N, Kubo S and Kuroda M. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis BMC Cancer. 2013;13:99
- ③ Toyoda H, Kumada T, Kiriyama T, Tanigawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada Y, and Murakami Y. Higher Hepatic Gene Expression and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 are Associated with Steatohepatitis in Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. Biomarkers. 2013;18:82-7.
- ④ Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, and Y-h Taguchi. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. PLoS ONE. 2012; 7: e48366
- ⑤ Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. PLoS One. 2011; 6: e19799
- ⑥ Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. PLoS One. 2011; 6: e16081.
- ⑦ Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. BMC Medical Genomics. 2010; 3: 48
- ⑧ Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by TRIM23 is critical in antiviral defense. PNAS 2010; 107: 15856-61
- ⑨ Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Dereglulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. Pathol Int. 2010; 60: 351-357
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Murakami Y, Tamori A, Kubo S, Kawada N. Expression level of miR-18b can diagnose the prognosis and malignancy of hepatocellular carcinoma. 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 20 日札幌市
- ② 村上善基、豊田秀徳、熊田卓。インターフェロン関連遺伝子発現プロファイルは慢性 C 型肝炎治療効果予測に有用なマーカーである 第 15 回日本肝臓学会大会 平成 23 年 10 月 20 日福岡市
- ③ 村上善基、豊田秀徳、熊田卓。マイク

ロ RNA 発現プロファイルは慢性肝疾患の病態評価に有用なマーカーである。第 97 回日本消化器病学会総会  
平成 23 年 5 月 15 日 東京都

- ④ Murakami Y, Tanaka M, Kuroda M, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Aberrant expression of miR-199 and 200 families is associated the progression of liver fibrosis. 第 69 回日本癌学会学術総会 平成 22 年 9 月 22 日 大阪市
- ⑤ 村上善基。インターフェロン関連遺伝子発現パターンを利用した慢性 C 型肝炎治療効果予測 第 75 回日本インターフェロンサイトカイン学会 シンポジウム 平成 22 年 6 月 25 日 北九州市
- ⑥ 村上善基、豊田秀徳、下遠野邦忠。マイクロ RNA 発現プロファイルを用いた慢性 C 型肝炎ウイルス治療効果予測 第 13 回日本肝臓学会大会 平成 21 年 10 月 15 日 京都市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 善基 (MURAKAMI YOSHIKI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・病院  
講師  
研究者番号：00397556

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし