

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31日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791285

研究課題名（和文） 肝細胞癌における門脈浸潤関連遺伝子 RDBP の発現および機能解析

研究課題名（英文） Over-expression of the RD RNA binding protein is associated with portal vein invasion in hepatocellular carcinoma.

研究代表者

飯田 通久 (IIDA MICHIHISA)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50554797

研究成果の概要（和文）：

肝細胞癌（HCC）において RDBP は mRNA および蛋白レベルで、非癌部に比べ癌部で有意に発現亢進し、HCC のうち、RDBP 蛋白高発現群では、低分化癌が多く、門脈浸潤陽性症例が多かった。また2年以内に残肝再発を認めた症例は有意に RDBP 発現率が高く、RDBP 発現率は多変量解析で独立した再発危険因子であった。また HCC 細胞株で RDBP の knock down 株は増殖能の低下と浸潤能の低下を認めた。RDBP は HCC で発現が上昇し、脱分化、腫瘍の増殖、門脈浸潤と関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Both mRNA and protein levels of RDBP were significantly higher in HCC than in non-HCC liver tissue, and that these levels were also significantly higher in HCC with PVI than in HCC without PVI. Multivariate analysis revealed that RDBP protein levels were an independent risk factor for early intrahepatic recurrence of HCC within two years of surgery. Knockdown of RDBP protein significantly inhibited the proliferation and invasion of cells *in vitro*. These data demonstrate that RDBP is related to the metastatic potential of HCC, suggesting a possible candidate for prevention of HCC cell metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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： 肝細胞癌門脈浸潤

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌（以下 HCC）は肝切除後の再発率の高い予後不良な悪性腫瘍である。

肝切除後の肝内再発には門脈浸潤（以下 PVI）が深く関わっており、PVI は肝切除後の最も重要な予後因子である。すなわち PVI 陽性 HCC に対する有効な治療の開発が HCC の予後改善に必要と考えられる。

また一方、RDBP (RD RNA binding protein) は RNA polymerase II による転写伸長を阻害する NELF (negative elongation factor) の subunit の 1 つとして同定され、NELF の活性に重要な働きを有するとされている。悪性腫瘍における発現やその進展への役割については不明である。

2. 研究の目的

PVI 陽性 HCC の新規標的分子を同定すべく、教室の肝癌マイクロアレイデータベースから PVI 陽性 HCC 関連候補遺伝子 RDBP を抽出した。HCC 切除標本 60 例の癌部、非癌部から抽出した mRNA による realtime PCR で RDBP mRNA は HCC では非癌部に比して有意に RDBP 発現が上昇していることを認めた。また PVI 陽性 HCC では PVI 陰性 HCC に比べ有意に RDBP mRNA の発現が高かった。

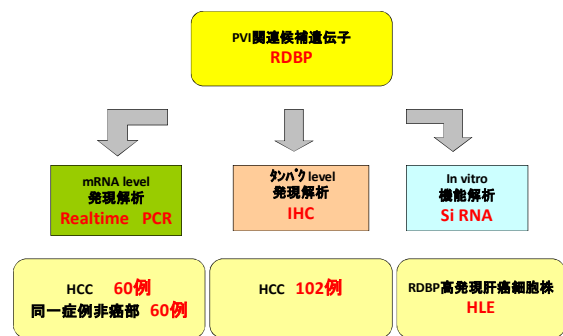
これらの結果から HCC における RDBP の PVI 陽性 HCC との関係および治療の可能性について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HCC 切除標本を用いて免疫染色を行い HCC における RDBP 蛋白発現上昇の確認を行う。また門脈浸潤や早期肝内再発、肝切除後予後などの臨床病理学的因子と RDBP 発現の関連について検討する。

(2) 肝癌細胞株 HLE を用いて RDBP の knockdown 株を作成し、浸潤能や増殖などの機能解析実験を行う。（図 1）

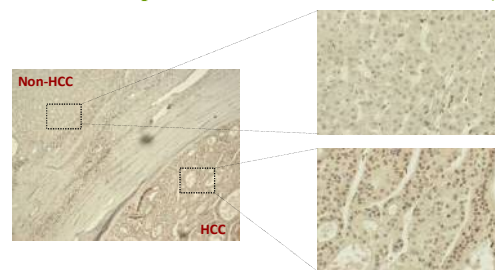
図1 対象・方法



4. 研究成果

(1) HCC 102 例について免疫染色を行い、HCC では非癌部に比して有意に RDBP 発現が上昇していることを認めた。（図 2）

図2 RDBP expression in Non-HCCs and HCCs (IHC)



Histology	RDBP positivity (%)		
	~10	10-60	>60
Non-HCC	82(80%)	16(16%)	2(2%)
HCC	7(7%)	30(30%)	65(64%)

} P<0.01

(2) RDBP の高発現群は低発現群に比して分化度が低く、門脈浸潤例が多く、2年以内再発率が有意に高い結果であった。(図3)

また RDBP は多変量解析で早期肝内再発に対する有意な独立危険因子であった。

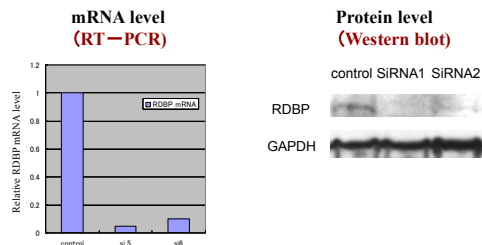
RDBP の発現と全生存期間については明らかな関係を認めなかった。

図3 Clinicopathologic findings of HCC in relation to RDBP expression (IHC)

Clinicopathologic factor	RDBP expression		P-value
	Strong(N=63) 60%<	Weak(N=39) 0-60%	
Age	68.0±8.1	68.5±7.8	P=0.75
Gender			P=0.35
Male	44	31	
Female	19	8	
Tumor size			P=0.14
<3cm	29	12	
≥3cm	34	27	
Degree of differentiation			P<0.01
Well	7	15	
Moderate	43	24	
Poor	14	0	
Portal vein invasion (PVI)			P<0.01
negative	41	35	
positive	22	4	
Early IHR			P=0.02
Strong(N=40)	15	16	
Weak(N=24)	25	8	

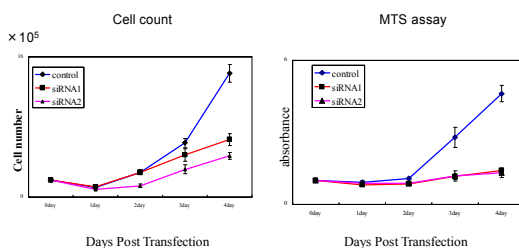
(3) HCC 細胞株 7 株のうち、RDBP 発現が最も高かった HLE について siRNA を用いた knockdown 株を作成した。90% 程度の knockdown 効率を得た。(図4)

図4 Knockdown of RDBP HLE



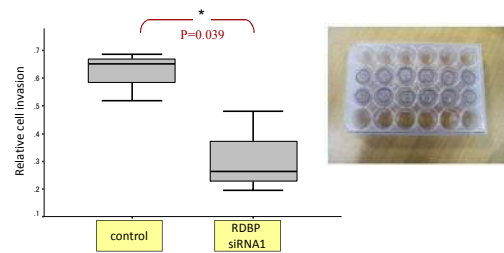
RDBP knockdown 株はコントロール株に比して細胞数、MTS assay で有意に増殖能の低下を来した。(図5)

図5 Cell proliferation assay



また RDBP knockdown 株はコントロール株に比して有意に invasion assay で浸潤能の低下を認めた。(図6) また healing assay でも RDBP knockdown 株はコントロール株に比して有意に移動能の低下を認めた。

図6 Invasion Assay (Matrigel chamber)



一方、フローサイトメトリーを用いたアポトーシス細胞の比率は RDBP knockdown 株とコントロール株に明らかな差を認めなかった。

以上の結果をまとめると、HCV 陽性 HCC において RDBP-mRNA は非癌部に比較して癌部で発現上昇し、PVI 陽性症例で有意に発現上昇していた。また RDBP 蛋白は非癌部肝臓での発現に乏しいが、HCC では発現上昇し、高発現症例は門脈浸潤陽性症例が有意に多い。

また RDBP 蛋白発現量は早期肝内再発の独立危険因子である。RDBP 高発現細胞株の knockdown では細胞増殖能低下と浸潤能の低下が見られた。

これらの結果から RDBP は HCC の増殖・門脈浸潤に関与しており、新しいバイオマーカーおよび分子標的となりうる可能性を示唆している。

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)

Iida M, Iizuka N, Oka M, (他 8 名 1 番目) Overexpression of the RD RNA binding protein in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2012 May 18. doi: 10.3892 査読あり

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 飯田通久、飯塚徳男、岡正朗、肝細胞癌における転写関連因子 RDBP の発現とその意義 第 66 回日本消化器外科学会総会 2011.7.15 国際会議場（名古屋）
- ② 飯田通久、飯塚徳男、岡正朗、肝細胞癌における RDBP の発現とその機能 日本外科学会 2011.4.1（誌上発表）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 通久 (IIDA MICHIHISA)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50554797