

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590960

研究課題名(和文) RNP構成因子DDX20によるB型肝炎関連肝癌の抑制機構の解析

研究課題名(英文) Analyses about the role of DDX20 in hepatocarcinogenesis

研究代表者

五藤 忠 (Goto, Tadashi)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：40444088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝発癌の一因として網羅的解析で同定されたDDX20の発現低下によって惹起される分子変化を検討した。その結果、DDX20はmicroRNAの成熟に必須の因子であるRISCの構成因子であり、発現が減ると特定のmicroRNAの成熟が阻害されることが判明した。特にmicroRNA140-5pの発現低下は発癌に密接に関わるNF- $\kappa$ Bの活性化に關与することを見いだしたが、それは、microRNA140の発現低下によってDnmt1の発現が増え、メタロチオネインを減らすためと考えられた。これらの現象はmicroRNA140のノックアウトマウスでも確認された。今後これらの結果を応用した肝癌予防策が期待される。

研究成果の概要(英文)：DDX20 was previously identified as one of the causes of hepatocarcinogenesis. In this project, we identified that DDX20 is a component of RISC, which mediates microRNA maturation. By DDX20 decrease, microRNA140-5p amount was specifically decreased, which enhanced DNMT1 leading to the decrease of metallothionein expression, which is closely related to NF $\kappa$ B activities, a major cause of hepatocarcinogenesis. These phenomena were confirmed in miR140 knockout mice and chemically-induced hepatocarcinogenesis. Therefore, it will be promising that based on these results, novel preventive methods against hepatocarcinogenesis are developed by further analyses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学 DDX20 microRNA

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓癌の遺伝子異常としては、c-myc, cyclinD, p53, beta-catenin, p16, などの発現変化や変異が比較的多く見られるものの、これまでのところ集積する特定の遺伝子異常は報告されていない。研究開始当初、miRNA と病態についての研究が盛んになってきていたこともあり、「microRNA pathway と肝臓癌」という観点で肝臓癌の病態生理についての解析を進めていたところ、マウスの肝臓癌モデルと siRNA library を用いた in vivo でのスクリーニングによって機能未知の肝臓癌抑制遺伝子候補を同定した報告がなされた (Zender, Cell. 2008;135:852-64)。この網羅的解析によって同定された 13 の新たな肝臓癌の癌抑制遺伝子候補の中で、我々は Ddx20 (DP103) が miRNA が機能を発揮するのに必要な Ribonucleoprotein complex の構成因子の一つであることに注目し、Ddx20 蛋白が肝臓癌にどのように寄与するのかという点の解明とその防御法について検討を開始した。実際に Ddx20 蛋白の発現量を肝臓癌細胞株・肝臓癌組織アレイで検討をおこなったところ、Ddx20 蛋白は肝臓癌のなかでも B 型肝炎ウイルス感染によって惹起された癌においてその発現が著明に低下していた。Ddx20 は DEAD box domain (Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD)) を有する RNA helicase 活性と ATPase 活性を持つ蛋白であり、翻訳開始やスプライシング、リボゾームのアセンブリや転写活性抑制作用などの多彩な生理活性を有し (Cell. 2002;109:169-80, Mol Cell Biol. 2003;23:414-23)、細胞内の主要なシグナル伝達系に関わっていることが予測されている。また Ddx20 は Ribonucleoprotein complex の構成因子であり microRNA もその complex に含まれることから (Genes Dev. 2002;16:720-8)、miRNA の機能にもなんらかの影響を及ぼしていることが想定される。これらの想定される様々な細胞内の役割から Ddx20 は細胞の生理的機能を維持するのに重要な分子のひとつであることが考えられた。実際に Ddx20 内のアミノ酸置換を伴う SNP が膀胱がんの risk を高めることも報告されており (Cancer Res. 2008;68:2530-7)、Ddx20 は機能的に肝臓だけでなく他臓器の発癌においても普遍的な役割を担っている可能性も考え、検討を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究ではこの Ddx20 による肝臓癌抑制機構、とくに Ddx20 蛋白の発現が落ちている B 型肝炎関連肝臓癌における機能的役割を明らかにし、この分子に関わる発癌メカニズムを解明して将来の肝臓癌治療の分子標的の少なくともひとつとすることを第一の目的とする。すなわち Ddx20 蛋白の過剰発現・ノックダウン系による発癌に結びつく可能性のある細胞内情報伝達系の攪乱、その作用機構、

miRNA 機能に及ぼす影響、などを in vitro で検討し、発癌過程における作用メカニズムを解明する。さらには、本研究を通して「miRNA の機能の変化をもたらす分子による新しい発癌メカニズムの同定」につなげることを究極の目標とした。

### 3. 研究の方法

(1) 肝臓癌細胞株・肝臓癌臨床検体での Ddx20 の発現量の検討: マウスモデルで実験的に同定された癌抑制遺伝子候補の Ddx20 の発現が、実際のヒト肝細胞癌検体でどのような発現状況を示すか、肝臓癌細胞株での蛋白発現量の確認と組織アレイでの免疫染色により検討する。

(2) Ddx20 過剰発現系での細胞内シグナル伝達系に与える影響: Ddx20 の発現が低下している複数の肝臓癌細胞株に Ddx20 を過剰発現させ、細胞内情報伝達経路の活性化状態の変化を、網羅的なゲルシフトアッセイおよびレポーターアッセイによって同定する。この時転写因子結合配列を持つ oligo DNA をラベルした mixture を準備し、細胞の核抽出物と mix したのち、形成された DNA-転写因子複合体を電気泳動で分離、そこから回収される DNA を準備した oligo DNA mixture に相補的な oligo DNAs をスポットしたメンブレンとハイブリダイゼーションさせることで活性化している転写因子を同定する転写因子活性化測定アレイを用いて、先のレポーターアッセイやゲルシフトアッセイのデータを補完する。

Ddx20 は細胞質と核に均一に分布し、核内に局在する Ddx20 はある種の転写因子活性を転写因子の補因子とともに抑制的に働くという報告もあり、この検索により影響を及ぼしている細胞内情報伝達系の同定を行う。

(3) Ddx20 の発現による細胞機能の変化の解析: 細胞内シグナル伝達への影響と並行して、Ddx20 の過剰発現細胞株においてコントロールと比較して、癌発生に寄与する表現型を呈するか検討する。具体的には細胞増殖・抗アポトーシス効果・transformation 活性などを検討する。

先に同定した細胞内シグナル伝達系の modulation と、ここでの細胞機能の表現型とのリンクが可能か検証する。

(4) シグナル伝達に関わる分子との直接相互作用の有無の検定: 同定したシグナル伝達系と Ddx20 蛋白とのあいだに直接作用があるのか、すなわち、シグナル伝達系に関与する分子との相互作用の有無を免疫沈降・質量分析を用いて検討する。直接の相互作用ではなく他の分子を介した間接的な作用である場合も想定して、関連分子の蛋白発現量の変化、リン酸化状態の変化の有無についても合わせて検討する。

(5) microRNA 機能への影響についての検討: Ddx20 の特徴として RNP complex の構成因子の一つであるという点があり、Ddx20

のノックダウンの系で miRNA 機能が維持されるか検討する。具体的には 肝細胞で高発現している miR122 の標的配列を luciferase の下流 3' UTR に組み込んだ miRNA 機能判定用レポータープラスミドを作製し、これの反応性を Ddx20 の有無で検討する。実際にはこの点についての検討はすでに始めており、下左図のごとく Ddx20 のノックダウン下では miRNA の機能が落ちることを確認している。さらに数種の miRNA についても同様のレポーター作製と検討を行い、miRNA 全般的な現象であるか確認する。

(6) 細胞内シグナル伝達系に関わる miRNA の同定 : 先に同定した Ddx20 が modulate する細胞内シグナル伝達系について luciferase ベースのレポーターを恒常的に組み込んだ stable cell line を確立する。そのうえで、肝組織で発現量の多い miRNA library (oligonucleotides) を 96-well plate 内に合成し、レポーターを発現する細胞を reverse transfection することで、その細胞内シグナル伝達系を制御する miRNA を同定する。

同定した miRNA は 特定のシグナル伝達系を制御する miRNA と考えられるが、Ddx20 は miRNA の機能発揮に必須の分子と考えられるので、Ddx20 のノックダウンにより miRNA によるそのシグナル伝達の制御機能が抑えられるかを検討する。これによって、miRNA 機能を攪乱することによる細胞内シグナル伝達機構の破綻に Ddx20 の発現変化が関与している可能性が示唆される。

(7) In vivo モデルでの確認 : これまでの検討結果を in vivo マウスモデルで確認する。

#### 4. 研究成果

(1) 肝癌細胞株・肝臓癌臨床検体での Ddx20 の発現量の検討 : 肝癌細胞株では 8 細胞株中 2 株で発現の著明低下、組織では 50 検体を超える背景肝と癌組織での Ddx20 の発現を検討し 約 25% の症例で背景肝よりも癌組織での発現が低下していることを確認した。特に B 型肝炎ウイルス感染細胞株あるいは組織で多く発現が低下している傾向があった。

(2) Ddx20 過剰発現系での細胞内シグナル伝達系に与える影響 : DDX20 の過剰発現系では種々の細胞内シグナル伝達に与える影響を検討した結果、NFkB の活性を抑えることが判明した。逆に DDX20 の発現をノックダウンすると NFkB の活性が増強することが示された。DDX20 は核内転写のコアクティベーターである NCOA1 や NRIP と相互作用して NFkB の活性を調節していることも示され、これらの核内へのリクルートの変化が NFkB 活性の変化に結び付いている可能性が示唆された。

(3) Ddx20 の発現による細胞機能の変化の解析 : Ddx20 のノックダウン細胞では細胞の増殖能には大きな影響はなかったが、TRAIL 刺激によるアポトーシスの誘導には抵抗性

を示した。そのアポトーシス抵抗性には NFkB の活性化が関与していた。

(4) シグナル伝達に関わる分子との直接相互作用の有無の検定 : DDX20 は既報の通り RISC 構成因子である Ago2 と結合することが免疫沈降法で示された。そのため、DDX20 の発現低下細胞では RISC 機能が低下しなにかの影響が microRNA に作用することが示唆された。

5) microRNA 機能への影響についての検討 : そこで DDX20 のノックダウン細胞で網羅的に microRNA の発現量をアレイ法を用いてみたところ、microRNA140 の発現が低下していた。この結果 microRNA140-5p の機能が低下することがレポーターアッセイなどの結果で示された。

(6) 細胞内シグナル伝達系に関わる miRNA の同定 : miRNA140 は NFkB の活性に強く関与することはそれまでの検討で判明していたが、その分子機序として、miRNA140 が直接標的とする分子のひとつメタロチオネインの発現が DDX20 ノックダウン細胞で低下することが示された。メタロチオネインはもともとその発現が低下すると NFkB を活性化することが知られている分子である。そこでなぜ DDX20 の発現低下がメタロチオネインの発現低下に結びつくのか検討を加えたところ、microRNA140 の発現が低下すると、直接の標的分子である Dnmt1 の発現が増え、これがメタロチオネインのプロモーター領域をメチル化し、発現を減らすことが判明した。そのけっか NFkB の活性が増強することが示された。

(7) In vivo モデルでの確認 : これまでの検討結果は microRNA140 のノックアウトマウスと化学発癌モデルを用いて in vivo でも確認された。すなわち、microRNA140 のノックアウトマウスでは DNMT1 の発現が増え、メタロチオネインの発現が低下し、NFkB 活性が増強し、化学物質による肝癌誘発を増強していた。

これらの結果から、DDX20 は新たな肝癌抑制因子であり、特定の microRNA の発現低下を介して NFkB の活性を攪乱し、そのため肝癌に寄与していることが示唆された。

今後 DDX20 あるいは microRNA140 あるいは NFkB 活性への介入法を開発することで肝癌発症の予防ができないかを検討する価値があるものと考えられた。

#### 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3件)

1) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang Y, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling

NF-κB activity via directly targeting Dnmt1 expression. **Hepatology** 2013;57(1):162-70 doi: 10.1002/hep.26011  
2) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Kudo Y, Goto T, Yoshida H, Koike K. A miRNA machinery component DDX20 controls NF-κB via microRNA-140 function. **Biochem Biophys Res Commun.** 2012;420(3):564-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.034.  
3) Takata A, Otsuka M, Kojima K, Yoshikawa T, Kishikawa T, Yoshida H, Koike K. MicroRNA-22 and microRNA-140 suppress NF-κB activity by regulating the expression of NF-κB coactivators. **Biochem Biophys Res Commun.** 2011;411(4):826-31. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.048.

以上すべて査読有。

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 大塚基之、高田朱弥、小島健太郎、前田愼、立石敬介、池上恒雄、平田善裕、建石良介、椎名秀一朗、吉田晴彦、小池和彦 microRNA machinery 構成因子 DDX20 の発現低下に伴う microRNA 機能の減弱によって惹起される肝発癌経路の同定 第 47 回日本臨床分子医学会(東京、2010 年 4 月 10 日-11 日)  
2) 高田朱弥、大塚基之、小池和彦 microRNA 機能に関わる分子 DDX 2 0 の発現低下に伴う microRNA 機能の減弱によって惹起される新しい肝発癌経路の同定 第 46 回日本肝臓学会総会 山形 2010 年 5 月 27-28 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研究成果については

<https://sites.google.com/site/225kenncrna/>  
にて概説。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五藤 忠 (Goto Tadashi)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：40444088

(2) 研究分担者

大塚 基之 (Otsuka Motoyuki)

東京大学・医学部附属病院消化器内科・助教

研究者番号：90518945

吉田晴彦 (Yoshida Haruhiko)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：60240305

(3) 連携研究者

なし