

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590953

研究課題名(和文) MiR-224：肝癌を標的とした新たながん克服医療への展開

研究課題名(英文) A translational research on miR-224: towards novel diagnostic and therapeutic approach for hepatocellular carcinoma

研究代表者

邵力(Sho, Ri)

山形大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80344787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、miR-224を標的とした、新たな肝癌分子標的薬の開発および新しいバイオマーカーへの応用展開を目指した。肝癌患者において血中miR-224のレベルを検討したところ、miR-224は肝癌転移の診断マーカーとしての展開可能性は低いと考えられた。ヒト肝癌細胞株のマウス皮下移植モデルを用いてantagomir-224の抗腫瘍効果を検討したところ、in vitroでantagomir-224を導入した肝癌細胞の腫瘍形成能が低下すること、また、in vivoにおいてはantagomir-224がモデル腫瘍に対して成長阻害効果があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Our previous study has determined that aberrant expression of miR-224 in hepatocellular carcinoma (HCC) was associated with cancer cell invasion. Using mouse xenograft model, we further investigated whether miR-224 could serve as a potential target for HCC therapy. Inoculation of HCC cells transfected with miR-224 inhibitor (antagomir-224) into subcutaneous of athymic nude mice revealed that inhibition of miR-224 in HCC cells significantly delayed tumor formation as compared to control. Direct intratumoral injection of antagomir-224 didn't cause tumor regression, but did show a delay in tumor growth in comparison to mice treated with control substance, suggesting that miR-224 may serve as a potential therapeutic target in HCC.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝癌 microRNA 分子標的治療 診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

ヒト肝癌組織における miRNA の発現異常は近年多数報告され、これらの発現異常を示す miRNA の一部は、肝癌に対して癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子として働き、一部は肝癌の転移に深くかかわっていることが証明されつつある。また、肝癌に対する miRNA の臨床応用に関する研究も欧米を中心に急速な勢いで進められ、miRNA を用いた肝癌に対する新たな診断・治療が臨床応用可能であることを示唆するものである。

これまでの研究で我々は、1) すでに miRNA array より示唆される miR-224 の肝癌組織における発現の亢進が、7 種類の肝癌細胞株においても異常発現が見られることを検証し、2) 細胞株を用いた機能解析では、miR-224 が肝癌細胞の増殖能には影響しなかったものの、細胞の遊走や浸潤を促進することを見出した。このことから、miRNA-224 が肝癌再発・転移を克服するための新たな診断・治療における極めて有望な分子標的ではないかと考えられ、核酸医薬および診断マーカーとしての開発の必要性を感じている。

2. 研究の目的

本研究では、miR-224 の診断マーカーとしての展開及び分子標的としての核酸新薬候補の創出によって、肝癌転移の新たな診断・治療の開発基盤の確立を目指した。

3. 研究の方法

研究は、大きく 2 つのステップに分けて進められた (図 1)。1 転移のある肝癌患者と転移のない患者において血液の miR-224 の定量的検出・比較を行い、miR-224 の転移・再発マーカーとしての可能性を検討した、2 ヒト肝癌細胞を移植したマウスモデルを用い、miR-224 を標的とする miRNA 阻害剤 (antagomir-224) の腫瘍形成及び転移の抑制効果を評価して核酸新薬候補の可能性を検討した。

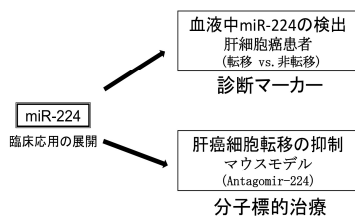


図1. 研究計画

具体的な方法について、

- (1) 臨床サンプル：これまでの研究で -80 凍結保存されている、遺伝子解析に関する同意が得られた本大学附属病院受診

歴のある肝癌患者の血液検体から、転移がある患者とない患者それぞれ 25 人ずつの血漿を選んだ。

- (2) 血漿中 miRNA の定量測定：mirVana™ miRNA Isolation Kit (life technologies 社)を用いて、100 µl の血漿から miRNA を抽出し、real-time TaqMan® MicroRNA Assays 法を用いて miR-224 を定量測定した。発現量の解析は、血漿に加えた cel-miR-39 の発現量を内部標準として miR-224 の発現量を補正し、Ct 法にて相対定量を行った。

- (3) *In vitro*での導入による antagomir-224 の抗腫瘍効果の評価：BALB/c ノードマウス 24 匹 (オス、週齢:4w) を 12 匹ずつ 2 群に分け、mirVana™ miR-224 inhibitor (antagomir-224) と mirVana™ miRNA Inhibitor Negative Control (inhibitor control, life technologies 社)を導入したヒト肝癌細胞株 HLF を用いて、それぞれ  $5 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$  DMEM (10%マトリゲルを含む)/匹ずつマウスの頸背部皮下に移植した。移植開始時より週 1 回腫瘍径及び体重を経時的に測定し、腫瘍径が 20mm 以上を越えたら、麻酔過剰吸入により安楽死させ、腫瘍のサイズを測定、及び転移の有無を観察 (肉眼/病理)・評価した。

- (4) *In vivo*での導入による antagomir-224 の抗腫瘍効果の評価：BALB/c ノードマウス 28 匹 (オス、週齢:4w) を  $2.5 \times 10^6$  HLF 細胞 /  $200 \mu\text{l}$  DMEM (10%マトリゲルを含む)/匹ずつマウスの頸背部皮下に移植した。腫瘍の長径が 100mm に達した時点で、マウスを 14 匹ずつ antagomir-224 投与群と inhibitor control 投与群に分け、antagomir-224 (5 µg) あるいは inhibitor control (5 µg) と jetPEI (N/P=6; Polyplus Bioscience 社)との複合体を、週に 1 回  $120 \mu\text{l}$  ずつ各群の移植腫瘍内に注射した。投与開始時より週 1 回腫瘍径及び体重を経時的に測定し、8 ~ 10 週後に麻酔過剰吸入により安楽死させ、腫瘍のサイズを測定、及び転移の有無を観察 (肉眼/病理) して antagomir-224 の *in vivo*での抗腫瘍効果を評価する。

- (5) 血管新生アッセイ：antagomir-224 及び inhibitor control がそれぞれ導入されたヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を細胞外マトリックスがフォーマットされた 96 ウェルプレートに接種し、24 時間培養後に染色、蛍光顕微鏡観察と画像解析ソフトで血管内皮細胞のチューブ形成を解析した。

4. 研究成果

- (1) 血中 miR-224 の診断マーカーとしての可能性：転移のある肝癌患者と転移のない患者において、血中の miR-224 を

real-time PCR 法で定量測定した。その結果、血中 miR-224 はどちらも極めて低いレベルであり、肝癌転移の診断マーカーとしての展開可能性は低いと考えられた。

- (2) miR-224 を標的とした新たな肝癌分子標的薬開発の可能性：miR-224 を標的とした新しい肝癌治療法の開発の可能性を検討するために、ヒト肝癌細胞株 HLF のマウス皮下移植モデルを用いて antagomir-224 の抗腫瘍効果を評価した。antagomir-224 を導入した HLF 細胞をヌードマウスの頸背部皮下に移植したところ、コントロール群と比較してその腫瘍形成能が低下した（図 2）。また、予め HLF 細胞の皮下移植により腫瘍を形成させたヌードマウスに antagomir-224

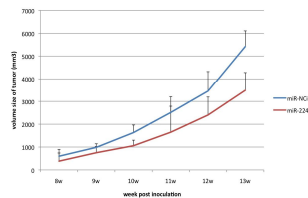


図2. Antagomir-224を導入したHLF細胞とコントロールの腫瘍形成能の比較  
(*in vivo*, volume size of tumor = (length × width<sup>2</sup>)/2.)

を腫瘍内に直接投与したところ、antagomir-224 が *in vivo* において腫瘍の転移に対する影響は観察されなかったが、一方でモデル腫瘍に対する成長阻害効果は認められた（図 3）。さらに、免疫染色を行った結果、antagomir-224 は腫瘍血管新生を阻害することが示された。従って、miR-224 を標的とした新たな肝癌分子標的薬の開発が可能であると考えられた。

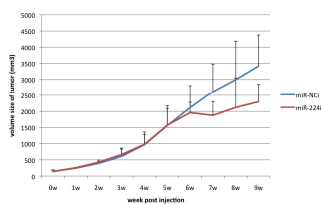


図3. Antagomir-224による抗腫瘍効果  
(*in vivo*, volume size of tumor = (length × width<sup>2</sup>)/2.)

- (3) Antagomir-224 による血管新生の影響：マウス実験で観察された antagomir-224 の血管新生の抑制作用を検証するために、HUVEC を用いた血管新生アッセイを行った。図 4 に示すように、*in vitro* においても antagomir-224 は血管新生阻害作用があった。

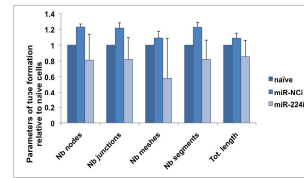
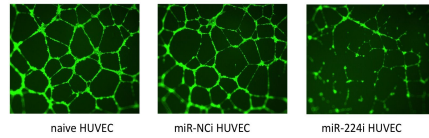


図4. Antagomir-224による血管内皮細胞チューブ形成の変化  
(Calcein 染色、NIH Image画像解析)

以上の結果から、antagomir-224 が新たな肝癌分子標的薬として有力な候補であることが示唆された。今後、antagomir-224 の臨床応用に向けた Drug Delivery System(DDS)の開発及び安全性の確認を目指している。

## 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 5 件)

- (1) Narimatsu H, Nakata Y, Nakamura S, Sato H, Sho R, Otani K, Kawasaki R, Kubota I, Ueno Y, Kato T, Yamashita H, Fukao A, Kayama T. Applying data envelopment analysis to preventive medicine: a novel method for constructing a personalized risk model of obesity. Plos One. e0126443. (2015). 査読あり
- (2) Saito T, Mizuno K, Katsumi T, Tomita K, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Shao L, Ueno Y. Transmission of Hepatitis C Virus From a Mother to a Child Carrying IL28B Heterozygote rs8099917 Among Three Brothers: A Long-Term Follow-Up. J Med Cases. 5(4): 227-31, (2014). 査読あり
- (3) Saito T, Sugimoto M, Igarashi K, Saito K, Shao L, Katsumi T, Tomita K, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Tomita M, Ueno Y, Soga T. Dynamics of serum metabolites in patients with chronic hepatitis C receiving pegylated interferon plus ribavirin: a metabolomics analysis. Metabolism. 62(11): 1577-86, (2013). 査読あり
- (4) Ishii R, Saito T, Shao L, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Makino N, Fukao A, Kitanaka C, Kayama T, Ueno Y, Kawata S. Serum prolactin levels and prolactin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells in hepatitis C virus infection. J Med Virol. 85(7): 1199-205. (2013). 査読

あり

- (5) Sato M, Hozawa A, Konta T, Shao L, Otani K, Narimatsu H, Sasaki S, Kato T, Kubota I, Yamashita H, Kayama T, Fukao A. Relationship between dietary intake and microalbuminuria: findings from the Takahata study. Clin Exp Nephrol. 16(1): 147-55. (2012). 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

- (1) Watanabe H, Sho R, Ueno Y. Genetic polymorphism in interferon- 4 gene and treatment response to peginterferon and ribavirin in Japanese chronic hepatitis C. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov.11, 2014; Boston (USA).
- (2) 邵力,張旭紅,渡辺久剛. ヒト肝癌細胞異種移植モデルを用いた antagomiR-224 の抗腫瘍活性の検討. 第 87 回日本生化学会大会. 2014 年 10 月 18 日. 国立京都国際会館(京都).
- (3) 橘寛彦,邵力,張旭紅. 歯肉癌患者血漿を用いた網羅的解析により発見した miR-223 の機能解析と臨床的有用性の検討. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 26 日. パシフィコ横浜(横浜).
- (4) 渡辺久剛, 邵力,上野義之. 日本人 C 型肝炎患者におけるインターフェロン 4 遺伝子多型性の検討. 第 100 回日本消化器病学会総会. 2014 年 4 月 26 日. 東京国際フォーラム(東京).
- (5) Zhang XH, Sho R, Watanabe H. Is microRNA-224 a potential therapeutic target for HCC? 第 86 回日本生化学会, 2013 年 9 月 13 日. パシフィコ横浜(横浜).
- (6) Zhang XH, Sho R, Watanabe H, Identification of miR-224 target genes and pathways related to hepatocellular carcinoma. 第 58 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日. 福岡国際会議場(福岡).
- (7) Sho R, Zhang XH, Watanabe H, The Use of RNAi-based Screens to Identify Host Factors Involved in HCV Replication. The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science".Nov.21.2012. KEIO PLAZA HOTEL (Tokyo).
- (8) Sho R, Zhang XH, Watanabe H. A potential host-directed therapeutic target against HCV infection elucidated by RNA interference screen. Japan-China Joint Medical Workshop 2012. Oct.22, 2012. Sanjo Conference Hall(Tokyo).

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/PublicHealth/PH-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

邵力 (SHO Ri)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80344787

(2)研究分担者

渡辺久剛 (WATANABE Hisayoshi)

山形大学・医学部・講師

研究者番号: 00332536

(3)研究分担者

石井里佳 (ISHII Rika)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 60466612

(4)研究分担者

張旭紅 (ZHANG Xuhong)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10292442