

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701029

研究課題名(和文)肝細胞癌の発生・進展におけるマイクロRNAの分子機能解析と革新的治療への展開

研究課題名(英文)Clinical significance and therapeutic potential of microRNAs in hepatocellular carcinoma

研究代表者

森田 和豊 (Morita, Kazutoyo)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00608862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌の進展に関連するmicroRNAとして、肝細胞癌で上昇しているmiR-18a、低下しているmiR-199aを同定した。miR-18aが高い群では腫瘍マーカーが高く、腫瘍径が大きかった。miR-199aが低い群では腫瘍マーカーが有意に高く、癌が血管に入っている率が高かった。また、miR-18aが高い群、miR-199aが低い群は肝細胞癌に対して肝移植を行った後の再発が多いことがわかった。miR-18a、miR-199aが制御する遺伝子をそれぞれ同定した。肝癌細胞株を用いて、miR-18aを抑える、miR-199aを増やすことにより肝癌細胞の増殖や浸潤が抑えられることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified key microRNAs in recurrent cases of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. miR-18a expression was increased, and miR-199a-5p expression was decreased in HCC and metastasis. High levels of miR-18a expression correlated with high levels of tumor markers, larger tumor size, and a high recurrence rate. Lower miR-199a-5p expression levels correlated with high levels of tumor marker levels, portal venous invasion, and a high recurrence rate. In HCC cells, miR-18a regulated the expression of tumor necrosis factor alpha induced protein 3 (TNFAIP3), and miR-199a-5p regulated the expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1A), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), and insulin-like growth factor 2 (IGF2). Increased miR-18a levels and decreased miR-199a-5p levels are involved in progression and poor prognosis of HCC and affect the expression of multiple genes.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：microRNA 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

(1)肝細胞癌の予後と治療法

本邦において肝臓癌は死亡者数第3位、罹患率第4位を占めている。肝細胞癌に対して切除、局所療法、塞栓療法、肝移植などの集学的な治療が発展してきたが、ほとんどの患者がウイルス性肝炎や肝硬変を合併していることもあり未だに治療後に高頻度に再発を来し、全症例の5年生存率は35.4%である。このような現況を踏まえると肝細胞癌の治療成績の向上のためにはその腫瘍の分子的生質を解析し、肝細胞癌に特異的な新しい分子標的治療を開発することが急務であると考えられる。

(2)MicroRNA (miRNA)の機能と癌細胞における発現異常

近年、miRNAが癌の発生、進展において重要な役割を果たすことが分かり注目されている。miRNAとは19~25個の塩基により構成されるタンパク質をコードしない小さなRNA分子である。核内で作られた前駆体が細胞質で切り出されて成熟体となり、相補的な配列をもつメッセンジャーRNA(mRNA)と不完全にハイブリダイゼーションし、標的mRNAの翻訳抑制を行うことにより遺伝子の一次構造の変異を伴わない遺伝子のエピジェネティックな変異に重要な役割を果たしている(図1)と考えられているがそのメカニズムには未知の部分が多い。miRNAは現在までにヒトで800個ほどあると考えられており、5300以上の遺伝子の発現調節に関わっていると考えられている。miRNAの機能は多岐にわたっていると考えられ、その全貌は明らかでないが、特に細胞増殖、ウイルス感染、癌細胞において発現異常があることが最近報告されてきており、癌の発生、進展において重要な役割を果たしていることが示唆されている(Esquela-Kerscher A et al, Nat Rev Cancer, 2006)。miRNAと癌と関係を示す例として、let7/mir-98(miRNA)がRas癌遺伝子を抑制することや、miR-17(miRNA)がc-myc遺伝子の過剰発現を誘導することで癌発生に深く関与していることなどが報告されてきている。

(3)miRNA発現異常と肝細胞癌

肝細胞癌においても癌部と非癌部の間で発現に有意差を認めるmiRNAの存在が指摘されており(Kutay H et al, J Cell Biochem, 2006)、miRNAによるエピジェネティックな変異が肝臓癌に関連していることが示唆されている。我々は今までに肝細胞癌の発生、転移、再発に関わる分子機構について研究、報告を行ってきた。近年のmiRNA研究の進展によりこれらの分子機構におけるmiRNA発現異常の役割が注目されている。

(i)細胞接着因子発現抑制による上皮間葉移行

癌細胞の浸潤・転移のメカニズムの一つとしてepithelial-mesenchymal transition(EMT; 上皮間葉移行)という現象が注目されている。

我々は肝細胞癌においてEMTの代表的な指標であるE-cadherinが抑制されることにより悪性腫瘍の悪性度が増すことを示してきた(Sugimachi K et al, Clin Cancer Res, 2003)。非常に興味深いことにE-cadherin遺伝子はmiRNAの結合部位を持っており、そのmir-9(miRNA)結合部位はE-cadherinによって細胞を上皮型に規定する役割を担っている。肺癌は乳癌においてmir-9の発現上昇や発現低下が報告されており癌における機能の解明が待たれる(図2)。

(ii)C型肝炎ウイルス(HCV)

本邦の肝細胞癌患者の約8割はHCV感染が原因である。HCV感染は肝細胞癌発生や治療後再発のリスクを高め、治療成績向上の大きな障壁となっている。最近、肝臓に特異的に発現するmiR-122がHCVゲノムに結合してウイルスが肝細胞内で増殖するのに必須の役割を果たしていること、肝細胞株にmiR-122のアンチセンスRNAを導入することによりHCVの増殖を抑制できることが報告された(Jopling CL et al, Science, 2005)。我々は肝臓特異的に発現するmiR-122がC型肝炎感染症例において肝障害の程度や肝癌の分化度と関連していることを報告した(Morita K et al, Liver Int, 2011)。最近ではHCV感染チンパンジーに対してアンチセンスmiR-122を投与することによって肝臓や血液のHCV RNAを著減させることに成功している(Lanford RE et al, Science, 2010)。これらの結果より肝臓特異的なmiRNAを標的としたHCV感染や肝癌再発に対する新しい治療法の開発の可能性が広がっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞癌におけるmiRNAの発現異常の解析と新しい治療法への応用を検討することである。具体的には、(1)肝細胞癌におけるmiRNA発現異常、(2)肝細胞癌の進展に重要である増殖・浸潤シグナルにおけるmiRNAの役割、(3)miRNAによる肝細胞癌の革新的治療の開発について詳細な検討を行う。癌におけるmiRNAの意義はまだ明らかになっていないことも多く、miRNAの機能は多岐にわたっておりmiRNAの研究は今後の癌研究において非常に重要になると考えられる。本研究では肝細胞癌におけるmiRNAの発現異常を解析する研究であり、肝細胞癌のエピジェネティックな異常を明らかにするブレークスルーとなり得る。そのため肝細胞癌の発癌、進展、転移に関する分子機構の解明に寄与し、当該領域の研究推進に貢献可能である。

本研究の特徴として、miRNAは直接的に抑制することのできるため癌の新たな治療法の開発に結びつく可能性が高いことが挙げられる。肝細胞癌の浸潤転移、再発に関連するmiRNA分子が同定されることで肝細胞癌に対する新たな分子標的治療の開発に繋がると予想される。進行肝細胞癌症例に対して有

効な治療手段が無い現状より新たな治療の開発は目下の急務であり、本研究の意義は高い。

3. 研究の方法

1. 肝細胞癌における miRNA マイクロアレイを用いた miRNA 発現の網羅的解析

肝細胞癌の発生、進展、転移、再発に関連する miRNA 分子を同定するために miRNA マイクロアレイ法を用いた発現の網羅的解析を行う。具体的手順は(1)total RNA より小分子量 RNA のみを分離・精製、(2)miRNA サンプルの定量、(3)miRNA に蛍光色素を標識、(4)miRNA マイクロアレイと miRNA とのハイブリダイゼーション、(5)マイクロアレイのスキャン、を行う(図 3)。

2. リアルタイム PCR 法を用いた個別 miRNA の発現解析

マイクロアレイによって同定された miRNA について、肝細胞癌に対する生体肝移植症例の癌部、非癌部についてリアルタイム PCR を行い、臨床病理学的因子との解析を行う。

3. 個別の miRNA の発現解析および機能抑制による治療への応用の検討

肝癌細胞株に transfection 法によって miRNA を強制発現あるいは抑制し、細胞の増殖や浸潤を制御できるか検討する。

4. 個別の miRNA の標的遺伝子の検討

アルゴリズムから miRNA の標的遺伝子候補を検索し、Western blot およびルシフェラーゼアッセイにより標的遺伝子であるかどうかを検討する。

4. 研究成果

肝細胞癌の発生、進展、転移、再発に関連する microRNA 分子を同定するためにマイクロアレイにより発現の網羅的解析を行った。生体肝移植後肝細胞癌再発症例 3 例について、原発巣(T)、非癌部(N)、転移再発巣(M)から抽出した RNA を用いてマイクロアレイによるプロファイリングを行った肝癌原発巣および転移再発巣においてそれぞれ発現亢進している miR-18a, 発現低下している miR-199a を同定した。

この miR-18a, 199a について肝細胞癌に対する生体肝移植症例 70 例について検討したところ、miR-18a は癌部で有意に発現亢進しており、非癌部では有意に発現低下していた。臨床病理学的因子との解析を行ったところ、miR-18a 高発現群では AFP, PIVKA が有意に高く、腫瘍径が有意に大きかった。miR-199a 低発現群では PIVKA が有意に高く、門脈侵襲が有意に高率であった。また、miR-18a 高発現群、miR-199a 低発現群はそれぞれ無再発生存が有意に不良であった。以上より、miR-18a, 199a が肝細胞癌に対する肝移植後の予後因子となりうる可能性、肝細胞癌の生物学的悪性度に関連している可能性が示唆された。

肝癌細胞株を用いて、Western blot およびルシフェラーゼアッセイを行い、miR-18a の標的

遺伝子として TNFAIP3 を、miR-199a の標的遺伝子として HIF1A、VEGFA、IGF1R、IGF2 を同定した。

肝癌細胞株を用いて、細胞増殖アッセイ、細胞浸潤アッセイを行った。Anti-miR-18a、Pre-miR-199a の導入により肝癌細胞の増殖や浸潤が抑制されることを明らかにした。

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 0 件)以下、投稿中
Role of MicroRNA-18a and MicroRNA-199a-5p in Hepatocellular Carcinoma. Kazutoyo Morita, Ken Shirabe, Akinobu Taketomi, Yuji Soejima, Tomoharu Yoshizumi, Toru Ikegami, Yo-ichi Yamashita, Norifumi Harimoto, Shinji Itoh, Tetsuo Ikeda, Yoshihiko Maehara. *Annals of Surgical Oncology, revised.*

〔学会発表〕(計 1 件)

肝細胞癌に対する生体肝移植後の予後因子および分子標的としての microRNA に関する検討。森田和豊、調 憲、武富紹信、吉屋匠平、武藤 純、的野美、本村貴志、間野洋平、戸島剛男、橋本直隆、萱島寛人、増田稔郎、池上 徹、吉住朋晴、池田哲夫、前原喜彦。第 112 回日本外科学会

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 和豊 (九州大学)

研究者番号 : 00608862

(2)研究分担者
()

研究者番号 :

(3)連携研究者
()

研究者番号 :