

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790686

研究課題名(和文) ウイルス性慢性肝疾患からの発癌に関わるマイクロRNAの探索

研究課題名(英文) Micro RNA expressions of chronic hepatitis related hepatocellular carcinoma

研究代表者

上田 晃之 (UEDA, TERUYUKI)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80600741

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)：B型慢性肝炎では、肝細胞癌でのAP1発現と、背景肝のDNA損傷応答関連遺伝子発現間に直接相互作用を認めた。また、癌部におけるAP1発現は、癌部で発現亢進する多くの遺伝子と直接相互作用を有していた。一方、C型慢性肝炎では背景肝でのSTAT1およびPTEN発現は、癌部での血管新生、線維形成、および腫瘍形成促進遺伝子である、EGR1およびFAK1発現を抑制していた。リアルタイムPCRでの検証では、発癌時点での背景肝におけるSTAT1およびPTEN発現は、発癌以前と比較し低下していた。マイクロRNAでの検証では肝癌発癌における発現変化の検証をし、以前の報告を確認しえた。

研究成果の概要(英文)：DNA damage response genes in non-tumor lesions were associated with AP1 signaling which mediates the expression of many genes in CH-B-related HCC. In contrast, signal transducers and activators of transcription 1 and phosphatase and tensin homolog in non-tumor lesions were associated with early growth response protein 1 signaling that potentially promotes angiogenesis, fibrogenesis, and tumorigenesis in CH-C-related HCC. MicroRNAs were up- or down-regulated in cancerous tissue. These expression changes were confirmed as previously. Gene expression profiling of HCC and non-tumor lesions revealed the predisposing changes of gene expression in HCC. This approach has potential for the early diagnosis and possible prevention of HCC.

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：肝細胞癌 ウイルス性肝疾患 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

本邦における肝細胞癌は慢性肝疾患、特に線維化の進行した肝硬変を発症母地として発症することが大多数であり、約90%はウイルス性慢性肝炎である。原因ウイルスはB型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)であるが、いずれも慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を引き起こす。cDNAマイクロアレイを用いた包括的遺伝子発現解析を行うと、両肝炎および両肝炎により惹起された癌組織での細胞内情報伝達機構が異なることが明らかとなった。応募者はこれまでに慢性肝炎および肝細胞癌における網羅的遺伝子発現解析を行い、これらの遺伝子発現情報を有機的に結び付けるアルゴリズムを用いて、慢性肝炎から肝細胞癌発症にかかわる遺伝子群のネットワーク解析を行ってきた。応募者はこの検討によりB型肝炎およびC型肝炎における発癌に関与する遺伝子群ならびにネットワークを推定してきた。

今回応募者はこの実験結果を踏まえ、新規肝癌発症症例の背景肝(非癌部)における先の発癌に寄与する遺伝子群の発現変化を検証する。

一方、発癌時に寄与する遺伝子群と関連する non-coding RNA の一種である microRNA(miRNA)を特定することが可能であれば血清をはじめとした体液中からも癌予測マーカー候補、治療ターゲット候補となる miRNA 同定が期待される。

2. 研究の目的

肝疾患組織より作成した約65万遺伝子からなる SAGE(serial analysis of gene expression) library を作成し、うち肝疾患を検討するに適した10800遺伝子からなる in house cDNA マイクロアレイチップ(In house-liver chip 10k)を用い、発現遺伝子を検証した。同 in-house cDNA マイクロアレイチップを用い、B型肝炎とC型肝炎における遺伝子発現変化の検証より、B型肝炎とC型肝炎での発癌機序の違いを推定した(Honda et al, 2009, Hepatology)。B型肝炎では肝細胞におけるp53を中心としたアポトーシスシグナルが顕著であったことをはじめ図1の変化を認め、これらと発癌との関連を推定した。一

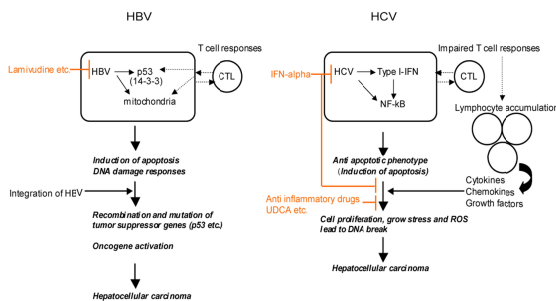
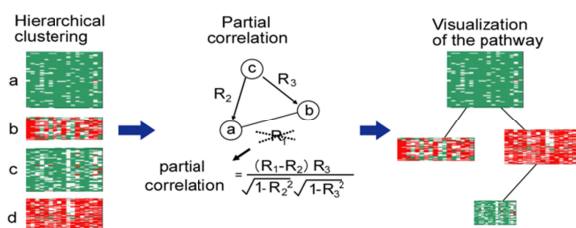


図 1

方C型肝炎では、タイプ1インターフェロンスシグナルの活性化ならびに NF-kB を中心とした抗アポトーシスパスウェイが顕著であり、炎症と肝細胞の再生、サイトカインや増殖因子による増殖ストレスが誘因となり発癌に向かうものと推定した。

応募者は慢性肝炎で生じている遺伝子発現変化が実際の発癌との関連性を、Bioinformatics の手法を用い検証することを試みた。B型肝炎(CH-B)37例、CH-B関連肝癌(HCC-B)17例(HCC-B)およびC型肝炎(CH-C)35例、CH-C関連肝癌(HCC-C)17例の肝組織を用い、In house-liver chip10kを使用してのcDNAマイクロアレイを行った。各群における発現上昇・低下する遺伝子を選定し、

各群での至適階層クラスター数を決定した。CH-B、CH-C、HCC-B、HCC-Cそれぞれにおいて、順に11、7、10、12クラスターを用いた各群でのネットワーク構築が可能であった。各クラスターにおける発現プロファイルの平均を算出し、偏相関係数を用いて、

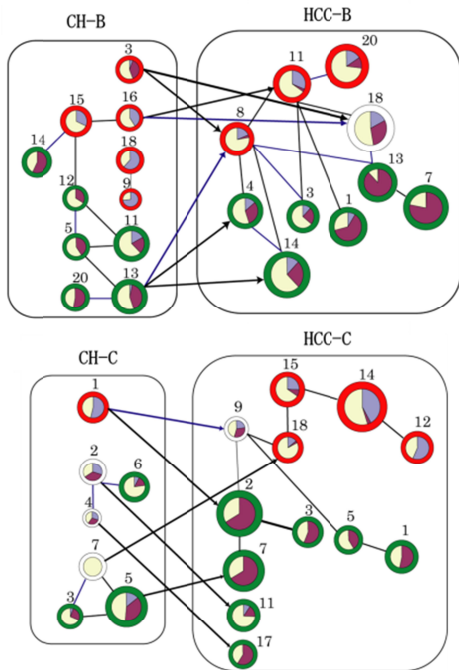


各クラスター間の関係を明らかにし、可視化することで、ネットワークを構築した(図2)。

偏相関係数を用いて、各クラスター間のネットワークを可視化する

図 2

HCC-Cでは発現上昇を4つの遺伝子クラスターで認め、これらはそれぞれ細胞増殖群、間質系細胞群、免疫応答群、腫瘍マーカー群であり、主にリンパ球や間質で発現する遺伝子を多く含んでいた。一方、発現低下のクラスター群の多くは代謝関連遺伝子にて形成されており、これらの遺伝子は主に肝細胞で発現する遺伝子であった。これらの遺伝子発現と密接に関連するCH-Cの遺伝子クラスターは、ケモカインを中心とした炎症に関わるクラスターであり、おもにリンパ球で発現する遺伝子であった。一方、HCC-Bの遺伝子発現はHCC-Cとは異なり、細胞増殖群が多く、免疫応答群が少ない傾向が認められた。またこれら遺伝子発現と密接に関連するCH-Bの遺伝子クラスターはCH-Bの炎症に関わる遺伝子群のほか、主に肝細胞にて発現する機能未知の遺伝子群であった(図3)。



癌遺伝子と関連を示すクラスター（数字：クラスターNo.、黒→：正の相関、青→：負の相関、周囲赤：発現亢進クラスター、周囲緑：発現低下クラスター、内部紫：肝優位に発現する遺伝子の割合、内部緑：浸潤リンパ球優位に発現する遺伝子の割合）

図 3

以上より、慢性肝炎組織での発癌にかかわる遺伝子群が明らかとなった。この慢性肝炎で生じる遺伝子発現変化が新規発癌症例の非癌部でも生じているかを Real time PCR にて検証する。また、非癌部でのマイクロ RNA を網羅的に解析し、先の発癌にかかわる遺伝子群と関連するマイクロ RNA を明らかにすることは、肝細胞癌の診断および治療に有用と考えられる。

3. 研究の方法

肝細胞癌初発症例の肝組織を用い、cDNA を作成（B 型慢性肝炎症例および C 型慢性肝炎症例）する。ウイルス性慢性肝炎組織中の肝細胞癌発癌に関連した遺伝子群の発現変化が、肝細胞癌新規発癌症例の非癌部で認められることを確認するため、各遺伝子でリアルタイム PCR を施行し、発癌関連遺伝子が新規肝細胞癌症例にても認められることを検証する。

ウイルス性肝炎からの発癌に寄与する遺伝子群の推定には先のネットワーク推定から、各遺伝子間の相互作用を推定する。

肝細胞癌初発症例の背景肝（B 型慢性肝炎症例、C 型慢性肝炎症例）から RNA を抽出し、miRNA-TaqMan アレイ（TaqMan Human MicroRNA Array v2.0）を用いて、マイクロ RNA の発現を網羅的に解析する。上記遺伝子と関連するマイクロ RNA を同定する。

4. 研究成果

B 型慢性肝炎ならびに C 型慢性肝炎からの発癌に関し、図 3 で示した遺伝子クラスターに含まれる遺伝子間の関係を明らかにした。

B 型慢性肝炎で認める遺伝子発現変化では機能未知の遺伝子群を含むクラスター 3 と

DNA 応答と関連するクラスター 16 が癌部における遺伝子変化と関連していた。癌部における遺伝子変化では、AP1 が腫瘍遺伝子としてあげられた。AP1 は癌部でのクラスター 18 に含まれる免疫応答、代謝、細胞周期、発達に関わる各遺伝子発現を調整していた。また、クラスター 18 には B 型肝炎ウイルスの遺伝子断片も含まれており、B 型肝炎ウイルスとの関連も示唆された。AP 1 はアポトーシスに関わる遺伝子群を含むクラスター 16 と関連していた。また、グリコーゲン代謝に関わる遺伝子群を含むクラスター 13 遺伝子を調整していた。（図 4）

遺伝子クラスター間における既知の遺伝子間の関連①

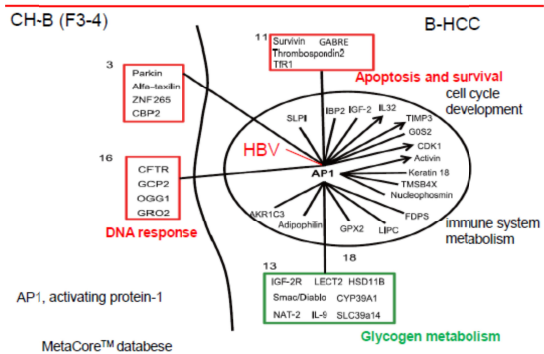


図 4

一方、C 型慢性肝炎からの発癌においては、慢性肝炎患者組織における、免疫応答をつかさどるクラスター 1 のうち STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) が重要な役割を担っていた。背景肝における STAT1 発現は、癌部における、クラスター 9 に含まれる EGR1 に対し負の制御をおこなっていた。EGR1 は血管新生ならびに線維化関連遺伝子である PAI 1, COL1A1, FAK 1 を制御していた。また、FAK 1 は癌遺伝子である SHC 発現を制御していた。また、背景肝のクラスター 7 に含まれる PTEN (phosphatase and tensin homolog) 発現は、FAK1 に対し、負の制御をおこなっていた。背景肝内において PTEN は Oct-3/4 発現を介して、各代謝関連遺伝子発現を制御していた。（図 5）

遺伝子クラスター間における既知の遺伝子間の関連②

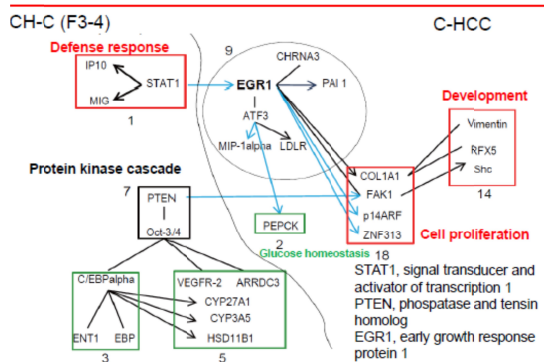
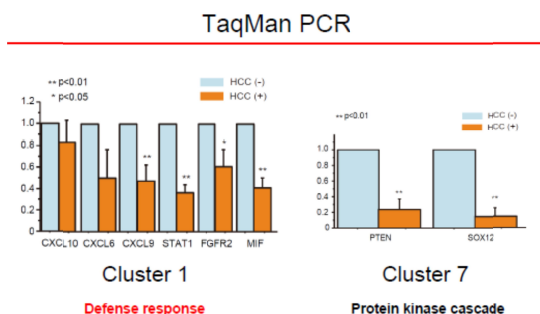


図 5

想定した発癌に関する遺伝子群の検証をリアルタイム PCR を用いて行った。C 型慢性肝炎症例で肝細胞癌発現前と発症時における遺伝子発現変化を検証した。本検証にて、肝細胞癌発症時には非癌部でのクラスター 1 および 7 の遺伝子発現は低下した。(図 6) 背景肝における遺伝子発現変化が、肝細胞癌発癌と関連を有することが示唆された。



- HCC発症時には非癌部でのcluster 1および7の遺伝子発現は低下していた。

図 6

一方、miRNA-TaqMan アレイ (TaqMan Human MicroRNA Array v2.0) を用いてのウイルス慢性肝炎からの発癌過程の推定では、以前の報告内容と相違のない発癌に関わるマイクロ RNA の推定にとどまった。以前報告と矛盾せず、肝細胞癌で発現低下しているマイクロ RNA 群、すなわち癌関連の発現している遺伝子群として、細胞周期、接着因子、タンパク分解、転写、翻訳に関わる遺伝子群を再確認した。また、発現亢進を認めるマイクロ RNA 群、すなわち発現低下を認める遺伝子群として免疫応答関連遺伝子を確認した。

バイオインフォマティックスの手法を用いることにより、背景肝での遺伝子発現プロファイリングと、B 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌ならびに C 型慢性肝炎関連肝細胞癌での遺伝子発現プロファイリングとの関係を明らかにした。肝細胞癌の遺伝子発現に関連する背景肝の遺伝子発現の同定は、肝細胞癌の診断および治療に有用と考えられる。

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)

著者名 : Teruyuki Ueda, Masao Honda, Katsuhisa Horimoto, Sachiyo Aburatani, Shigeru Saito, Taro Yamashita, Yoshio Sakai, Mikiko Nakamura, Hajime Takatori, Hajime Sunagozaka, Shuichi Kaneko

論文題名 : Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling.

雑誌名 : Genomics

査読の有無 : 有

巻 : 104 (4)

発行年 : 2013

最初と最後の頁 : 238-248

掲載論文の DOI : doi: 10.1016/j

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上田 晃之 (Ueda Teruyuki)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号 : 80600741