様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成２９年　６月　７日現在

機関番号：１５３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６１００７

研究課題名（和文）miRNA阻害による効率的肝癌動注化学療法の開発

研究課題名（英文）Enhancement of the effect of hepatic arterial infusion chemotherapy by introducing microRNA

研究代表者
中村　進一郎（Nakamura, Shinichiro）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：７０５１４２３０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：シスプラチンは肝癌に対する抗がん剤として広く使用されているが、奏効率は低い。シスプラチン耐性に関連することが示唆されているマイクロＲＮＡを細胞内に導入し、奏効率を上昇させようというのが、本研究の目的である。４１種類の候補となるマイクロＲＮＡを、様々な組み合わせを用いて検討し、7種類のマイクロＲＮＡをシスプラチンとともに用いると、効果的に肝癌細胞の増殖を抑えることが可能であることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Cisplatin is widely used for the therapy of hepatocellular carcinoma. However, the response rate of cisplatin is not high. In this study, we tried to enhance the effect of cisplatin by introducing microRNA that had been reported to correlate with cisplatin resistance into cancer cells. The effect of forty-one candidate micro RNA was examined. Among various combinations of micro RNA, cocktail of 7 micro RNA and cisplatin could effectively suppress the growth of hepatocellular carcinoma cels.

研究分野：消化器内科

キーワード：miRNA　肝細胞癌　シスプラチン感受性

１．研究開始当初の背景

肝細胞癌は、男性の死因の第４位であり、如何に肝細胞癌を克服するかが社会的問題となっている。我々は中四国の基幹病院との共同研究で、3000 症例を越える肝細胞癌患者の臨床経過をデータベース化し、肝癌を様々な観点より解析してきた（Aliment Pharmacol Ther 2010, Br J Cancer 2008, Am J Gastroenterol 2006 etc.)。これらの結果を俯瞰すると、現在、肝癌治療の最も重要な問題点として、分子標的薬をはじめとした化学療法が開発されているにも関わらず、進行肝細胞癌の予後が不良であるという事があげられる。

シスプラチンは古くより様々な癌に対する化学療法薬として使用され、様々な併用療法が開発されるなど、いわゆる key drug として認知されている。進行肝細胞癌では、著効例も存在する一方、全体としての奏効率は 20-30%と低く、いかに奏効率を上昇させるかという事が重要な命題となっている。

近年癌細胞中での発現量がシスプラチン感受性と関連する microRNA (miR)が相次いで報告された。しかし、肝細胞癌のシスプラチン感受性に対する miR の直接効果についてはほとんど解明されていない。

２．研究の目的

①肝細胞癌のシスプラチン感受性/耐性にかかわる microRNA (miR)を明らかとし、その miR の発現制御による、シスプラチン効果増強薬の開発を行う

②標的 miR は、データベース、自然耐性獲得肝細胞株、random expression vector 導入や、上皮間葉移行（EMT）により耐性を獲得した細胞等を用い、多角的視点より選択する。

③癌細胞特異的に miR を制御するため、hTERT 発現細胞（癌細胞）でのみ anti-miR/pre-miR を発現するアデノウイルスを構築し、臨床応用されている miravirsen と同じ方法論で作成した anti-sense と共に、シスプラチン感受性増強作用を検証し、臨床応用に結びつける。

④治療対象症例を適切に選択するための、コンパニオン診断薬も同時に開発する。

本研究の目的は、肝細胞癌のシスプラチン感受性/耐性にかかわる miR を明らかとし、その miR の発現制御による、薬剤効果増強薬の開発を行う事である。

効率的な抗癌剤感受性増強/耐性克服のためには、ターゲットとすべき miR の選択が最も重要である。本研究では以下の４つの方法論を用い、多角的にターゲットの選定を行う。

①抗がん剤感受性/耐性に関するデータベース（Pharmaco-miR）上において、肝癌に限定せず、シスプラチン耐性に関与することが報告されている miR を選定

②我々が既に樹立しているシスプラチン耐性肝細胞癌株における、miR 発現パターンを網羅的に解析し、親細胞と比較することで耐性克服のターゲット候補を選定

③自然薬剤耐性獲得時には、miR 以外の様々な要因で耐性を獲得する可能性もあるため、miR random expression vector を導入して miR を過剰発現させた培養細胞を用い、シスプラチン耐性に関与する miR を抽出。

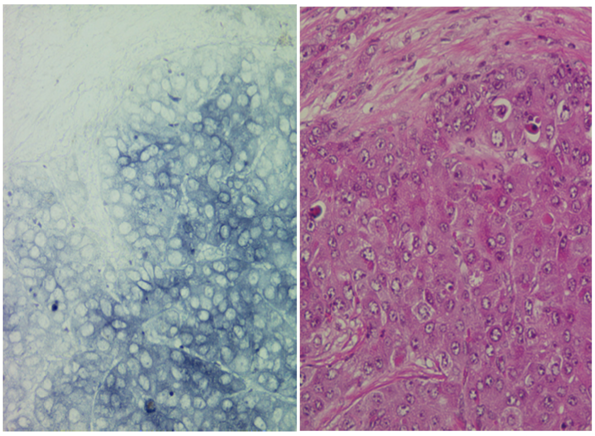
④上皮間葉移行（EMT）や EpCAM 陽性の癌幹細胞が薬剤耐性に関与する事が報告されている事をふまえ、当科で樹立している培養肝癌細胞の EMT 誘導系を用い、変化する miR を抽出し、候補として選定。

上記 study で標的候補となった miR のうち、肝癌での発現増強・もしくは低下が認められる miR に限定し、anti-miR や pre-miR を肝癌培養細胞にトランスフェクションすることによって、実際に肝癌でシスプラチンの抗腫瘍効果を増強させる miR を選択する。

シスプラチン感受性増強薬の開発には以下の 2 つの方法論を用い、選択された miR を生体内で発現制御する系を確立する。

① テロメスキャンの応用

我々は癌の不死化因子（テロメラーゼ）の構成成分である hTERT が、9 割の肝細胞癌で認められること、大半の肝癌細胞に hTERT mRNA が検出されること (下図　左：*in situ* hybridization, 右；HE staining いずれも自験例； J Gastroenterol Hepatol 2003;18:1168-74, Br J Cancer 2000 ;82:833-7)、また hTERT のプロモータ



ー活性を有する細胞（癌細胞）で GFP を発現するアデノウイルス（テロメスキャン、J Clin Invest 2009; 119: 3172-81）を用いて、患者血清中に循環肝癌細胞が存在する事を明らかとしてきた(基盤研究 C: 22590736)。本研究では GFP に変えて pre-miR あるいは anti-miR を発現するウイルス
を構築し、miR の発現制御に用いる。このシステムでは癌細胞に限定した miR の制御が可能であり、正常細胞への影響を最小限に抑えた革新的治療法となる。

②アンチセンス療法

miR は様々な細胞に存在し、生理作用を持つため、生体内で anti-sense 等を用いて治療する事は困難であると考えられていたが、本年 miR-122 に対する anti-sense を皮下注射す

ることにより、肝内の miR-122 発現を抑え、C 型肝炎の増殖を低下させる薬剤（miravirsen）が臨床応用された。これは、利用できる miR は限定されるが，適切に miR を選択すれば、肝細胞癌においても anti-sense 療法が可能となることを示している。本研究では、発現増強が薬剤感受性を低下させている miR に標的を絞り、LNA 等で修飾を行った、安定な anti-miR を作成しその効果を検証する。

コンパニオン診断薬（non touch biopsy）の開発について，肝癌細胞中での miR 発現を確認するためには、腫瘍生検が必要であるが、癌細胞中での変化を明らかとする non touch biopsy 法の開発も同時に行う。ago1 蛋白に結合した進行肝細胞癌患者の血漿中 miR に加え、血中で安定に存在するとされているエクソソーム中の miR の発現量と、手術で摘出された肝細胞癌組織中の miR 量を比較検討する。
また、GFP を発現する従来のテロメスキャンを用い、循環癌細胞中の miR についても、その発現量を測定し、治療対象患者選択のためのコンパニオン診断薬としての可能性を検証する。

３．研究の方法

①本研究は、様々な薬剤効果予測を行ってきた能祖・大西と、動物実験を多く行ってきた白羽を共同研究者とし、包括的にシスプラチン感受性増強法を開発するプロジェクトである。
②シスプラチン感受性増強法としては、コンベンショナルな anti-miR に加え、我々が研究に用いてきた、hTERT promoter 活性を利用したアデノウイルス(telomescan)を応用する。
③標的 miR の選定には、4 種の異なる方法論を用いる。miR21, miR93 については、2 種のシスプラチン感受性増強法の効果を同時に検証できるため、治療標的の第一候補とする
④日本で普及しているシスプラチンと 5FU の併用療法に対する効果も検証する。
⑤コンパニオン診断薬として、エクソソーム、テロメスキャンを応用する。

具体的には，本研究は各々の研究者が現在行っている実験を有機的に組み合わせ、進展させる共同研究であり以下のごとく役割分担をする。

コンパニオン診断薬開発は、ソラフェニブに対する効果予測法の開発を行ってきた能祖と大西が行う（Br J Cancer 2013, Hepatology 2013, Epub ahead of print)。

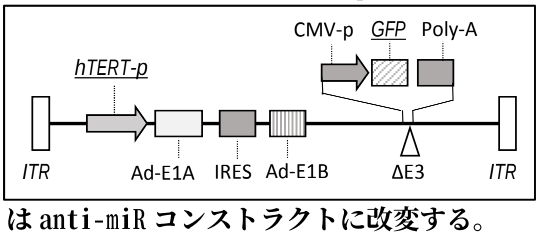
miRNA の同定と治療薬の開発は、テロメスキャンを用いて循環肝癌細胞の存在を明らかとしてきた中村が主導的立場で、大学院生 1 名及び研究補助員 2 名を指導し、進める。

EMT やマウスモデルを用いた研究は、RUNX3 欠損細胞を用いた実験担癌モデルを作成している白羽が中心となって行う（BMC Cancer 2009;9:240)。

miR 候補の選択を以下のように行った.
①抗がん剤感受性/耐性に関するデータベース（Pharmaco-miR）上に、41 種類の miR について、既にその発現量・作用機序・シスプラチンの効果の関係が報告されている。現段階で肝細胞癌について、3 者の関連の明らかなものはないが、この 41 種類のうち miR21, miR93 については、肝癌細胞で発現増強しており、2 種のシスプラチン感受性増強法の効果を同時に検証できるため、治療標的の第一候補とする。
②HepG2, HUH7 細胞を用いて既に我々が作成している自然シスプラチン耐性肝細胞株を用い、耐性細胞と親細胞との間で発現量の異なっている miR をアレイ解析で拾い上げ、新たな標的候補とする。
③ランダムに miR を発現するベクターを用いて miR を導入した肝癌細胞を、シスプラチン存在下で培養し、耐性にかかわっていた miR を検出する。
④既に構築している培養肝癌細胞の EMT 誘導系を用いた実験では，EMT により変化する miR をアレイ解析で抽出し、候補とする。

前述の 4 つの方法論で候補となった miR に対する anti-miR もしくは pre-miR を siPORT NeoFx (Ambion Inc.)等を用いて複数の培養肝癌細胞にトランスフェクションし、癌細胞内の miR 発現量を変化と、シスプラチン感受性との関係を明らかとする。miR-21 と miR-93 については、これらの miR のターゲットであると判明している PTEN、PDCD4 に対する効果も同時に検証する。

シスプラチン感受性増強薬の開発には以下の方法を用いる計画をたてた.
① テロメスキャンの改変
アデノウイルスの中に hTERT プロモーターで制御される GFP 遺伝子を組み込み、感染した細胞が hTERT を発現しているときにのみ GFP による蛍光を発するよう構築されたテロメスキャン（下図）の GFP を、pre-miR あるい



は anti-miR コンストラクトに改変する。
正常細胞では hTERT は発現していないため、このウイルスを用いると癌細胞内（hTERT 陽性）での miR 発現を、特異的に操作できると考えられる。
②アンチセンスによる miRNA の発現制御
発現増強が薬剤感受性を低下させている miR 候補に対し，LNA 修飾した anti-miR を作成し、培養細胞株のシスプラチン感受性に対する効果を検証する。一般的に anti-miR の生体内での使用時には前述の LNA 修飾を用いるが、東北大学よりコレステロール修飾を行った

mi-R の導入効率が良いことが報告された（2013 年肝臓学会)。導入効率が悪い際には、この結果を参考に修飾方法の変更を考慮する。

４．研究成果

マイクロ RNA（miR）の阻害による、作用増強を試みた。抗がん剤感受性/耐性に関するデータベース（Pharmaco-miR）上に、シスプラチンとの関係が報告されていた 41 種類の miR について検討した。この中で肝癌細胞株で発現が増強していた miR-21, miR-93 を中心に、アンチセンスを用いて、シスプラチンの感受性増強を試みたが，十分な効果が得られなかった。そこで、シスプラチン耐性株を樹立し、アンチセンスによる効果増強でなく、耐性の解除の可能性について検討した。また、親細胞と耐性細胞との間の miR 発現変化をマイクロアレイで解析し，新たな治療標的となる miR(10a，146b，363，424，1246，3607，4324 等）を見出し、同様の検討を行った。個々のアンチセンスではその感受性亢進効果は限定的であったが，複数の miR を対象としたアンチセンスのカクテル療法を用いた結果、強い効果が得られることが明らかとなった。またこの効果は、シスプラチン濃度に依存せず、単独で約 40%の増殖抑制効果を発揮することが判明した。薬剤耐性解除という作業仮説は十分に達成できなかったが、アンチセンスによる抗腫瘍効果、そしてカクテル療法の可能性が明らかとなり、今後の研究の方向性を固めることができた。現在、カクテル療法に使用する miR の再選定を行うとともに、これらの成績の論文化を試みている。

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０件）

〔学会発表〕（計１件）

① 森元裕貴，能祖一裕，大山淳史，赤穂宗一郎，和田望，土肥千紘，竹内康人，安中幸，安中哲也，桑木健志，大西秀樹，池田房雄，中村進一郎，白羽英則，高木章乃夫，岡田裕之「マイクロRNA阻害による肝癌化学療法治療効果増強の試み」肝癌分子標的治療研究会，2016年1月16日，虎ノ門ヒルズフォーラム（東京）

〔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
中村　進一郎（NAKAMURA, Shinichiro）
岡山大学病院　消化器内科・助教
研究者番号：70514230

(2)研究分担者
能祖　一裕　（NOUSO, Kazuhiro）
岡山大学　医学部・客員研究員
研究者番号： 10314668

白羽　英則（SHIRAHA, Hidenori）
岡山大学病院　消化器内科・講師
研究者番号：40379748

大西　秀樹　（ONISHI, Hideki）
岡山大学病院　消化器内科・助教
研究者番号：30595468