

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860510

研究課題名(和文)肝発癌進展過程におけるマイクロRNAと血管新生分子を標的とした診断・治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of diagnostic procedure and the therapy that assumed microRNA and neovascularisation molecules a target in the hepatocarcinogenesis

研究代表者

野村 貴子(Nomura, Takako)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70645415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌細胞株におけるmiRNAの発現を網羅的に解析し、発現プロファイルを作成後、クラスター解析を行い、種々の肝細胞癌細胞株において特異的に発現変化を起こしたmiRNAを同定した。肝細胞癌の根治術を行った肝細胞癌患者の末梢血液を用いて、治療前後でのmiRNAの変化を検討した。治療前後でmiRNA量は明らかな変化を示し、異なるクラスターを形成していた。治療後に有意に減少のみられた7分子の内、新たな腫瘍マーカーの候補としてmiR-125a-5pに注目して検討を追加したところ、miR-125a-5pは細胞周期アレストやアポトーシス誘導などの癌抑制に関わる分子を標的遺伝子とすることが判明した。

研究成果の概要(英文)： We analyzed expression of miRNA in the hepatocellular carcinoma cell line cyclopedically, and clusters analyzed expression profiles after making and specifically identified miRNA s which caused expression changes in various kinds of hepatocellular carcinoma cell line.

Using the peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma given the radical operation of the hepatocellular carcinoma, we examined changes of miRNAs in the before and after therapy. The quantity of miRNA showed clear changes in before and after therapy and formed a different cluster. We significantly paid attention to miR-125a-5p as a candidate of a new tumor marker among 7 seen molecules of the decrease after treatment. It became clear that miR-125a-5p assumed molecules about cancer suppression such as the that strike of the cell cycle and the instruction of the apoptosis a target gene.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 マイクロRNA 血管新生分子

1. 研究開始当初の背景

本邦において肝癌による死亡者は年間3万5千人に達し、全癌死の10%を占める。原発性肝癌の90%を占める肝細胞癌については、B型・C型ウイルス肝炎、アルコール性肝炎、近年増加傾向にある非アルコール性脂肪肝炎(NASH)といったハイリスクグループの囲い込みに加えて、画像診断の進歩により、早期に検出され、適切な内科的および外科的治療が行われるようになったとは言え、5年生存率はステージで50%程度、ステージとなると10%未満と、肝細胞癌は今なお予後不良の癌腫である。そのため、肝細胞癌の新たな診断、治療、発生予防の開発をはかる上で肝発癌分子機構の解明は重要課題である。

我々のグループは、10年に渡り、肝発癌分子機構について研究を続け、肝細胞癌における、癌遺伝子の活性化、細胞周期の破綻、血管新生分子の関与について検討し、現在それらの研究から、肝細胞癌進展抑制のための分子標的治療薬になりうる候補分子を同定し、医師主導型の臨床試験前の動物実験を押し進めている。主にタンパク質を標的とした抗体療法(HER2の抗体:ハーセプチン、EGFRの抗体:エルピタックス、VEGFRの抗体:アバスタチン)を動物実験で肝細胞癌進展抑制効果を検討しているが、ある程度の効果は見られるものの、満足できるものではない。よって新しい視点による肝発癌機構の解明もまた必要であると考えている。

腫瘍の増殖は多段階のステップを経て進行することが明らかであり、癌細胞の変化以外にも腫瘍血管新生が必須であることは1970年代にFolkmanにより提唱された。腫瘍径が 2mm^3 以上となると拡散による酸素や栄養供給では限界を超えるため、それ以上の腫瘍の増大には血管新生が必要となることが示され、これらの点から腫瘍の血管新生を阻害することを標的とした治療薬が誕生した。血管新生シグナル伝達(VEGFR、PDGFR)を阻

害するマルチキナーゼ阻害薬であるソラフェニブが、本邦でも2009年に切除不能な肝細胞癌に対して承認された。しかしソラフェニブの適応となる肝予備能の保たれた症例は多くはなく、投薬中断となる症例も多いのが現状である。

また、ヒトゲノム解析の成果により、多くの蛋白コード遺伝子の機能が解明されているが、同時に、蛋白をコードしない部分から転写される多数のマイクロRNA(miRNA)の存在が浮き彫りとなり、遺伝子発現調節への関与が注目されるようになった。miRNAは内在性の20~25塩基程度の小さな一本鎖RNAであり、標的mRNAの3'側非翻訳領域の一部と配列依存的に結合することにより、分解または翻訳の阻害を引き起こし発現の調節を行っている。miRNAは複数の標的遺伝子の発現を調節しており、発生や分化、腫瘍形成や転移にも関与している可能性があり、診断もしくは予後に関するバイオマーカーとしても有用視されている。

2. 研究の目的

ある種の血管新生分子とmiRNAが、肝細胞癌に特異的に発現増強・減弱し、肝細胞癌の発生、増殖、進展に関与している可能性があると考えられている。そこで、肝細胞癌での特異的miRNAと血管新生分子の同定、治療における標的分子としての可能性、診断及び治療の有効性のマーカー、予後判定としての有用性を明らかにすることを本研究の目的とする。また、慢性肝炎及び肝硬変症、肝細胞癌患者の癌部・非癌部の肝組織と種々の肝細胞癌細胞株、あるいは、肝細胞癌患者の末梢血液についてmiRNAと血管新生分子の網羅的解析を行い、発現に変化を示したmiRNAと血管新生分子に関する生物学的特徴を検討する。

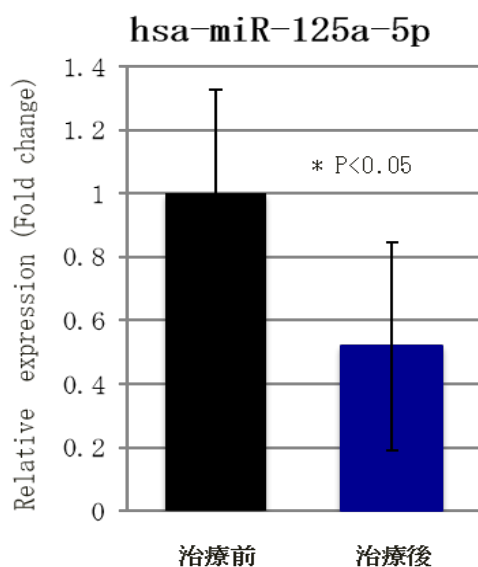
これらの検討により、今後、肝細胞癌の発生・進展過程における新たな発見、適切な個

マイクロアレイを用いて肝細胞癌細胞株における miRNA の発現を網羅的に解析し、発現プロファイルを作成後、クラスター解析を行った。種々の肝細胞癌細胞株において、特異的に発現変化を起こした miRNA を同定した。

肝細胞癌の根治術を行った肝細胞癌患者の末梢血液を用いて、治療前後での miRNA の変化について検討したところ、治療前後で miRNA 量は明らかな変化を示し、異なるクラスターを形成していた。また、治療前後で有意に変化していた miRNA を同定し、根治術後には減少していることが示された。

肝細胞癌の根治術前後で有意に減少のみられた 7 分子 (miR-125a-5p、miR-204-3p、miR-423-5p、miR-1247-3p、miR-1304-3p、miR-3648m、miR-6857-5p) の内、新たな腫瘍マーカーの候補として miR-125a-5p に注目して検討を追加した。miR-125a-5p はゲノム内容として chr19: 51693254-51693339 [+], UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA、標的遺伝子としては p53、p21 Cip/Waf、Bak1 があり、細胞周期アレストやアポトーシス誘導などの癌抑制に関わる分子を標的遺伝子とすることが判明した (図 2)。

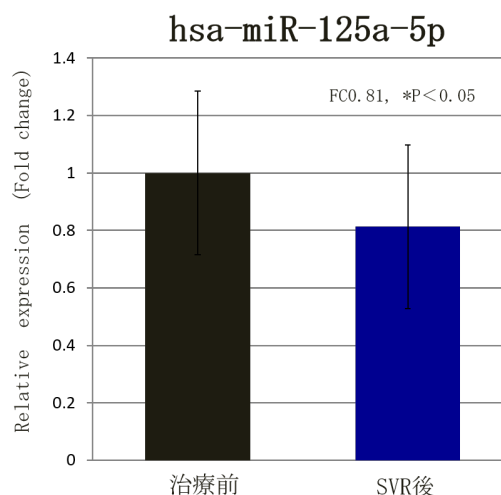
図 2



また、C 型肝炎ウイルスについてウイルス持続陰性化 (SVR) が得られた後にも、

miR-125a-5p は有意に減少がみられていた。血液中に安定して存在する circulating miRNA はバイオマーカーとして有用性が高く、更には、C 型肝炎ウイルスのウイルス持続陰性化が発癌抑制に繋がることから、これらの検討でも示唆されたと言える (図 3)。

図 3



あらゆる細胞が分泌する細胞外小胞であるエクソソームは新しい研究対象として注目されており、直径は 50-1,000nm と幅広く、内部にはタンパク質及び mRNA や miRNA、tRNA、DNA、ペプチド等の様々な情報伝達物質が内包されている。それ故に、エクソソームは細胞から細胞、あるいは個体から個体へ遺伝情報を伝搬するデリバリーカーゴ (cargo) となりうる。よって、エクソソーム内の miRNA は疾患に関連がより深いことが容易に予想される。今後、miRNA を内包するエクソソームと肝細胞癌の関係を明らかにし、新たな診断・治療法の解明に繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

MicroRNA profile of hepatic epithelioid hemangioendothelioma: A case report.

Morishita A, Iwama H, Yoneyama H, Sakamoto T, Fujita K, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Fujihara S, Nishiyama N, Kobara H, Mori H,

Yamamoto N, Okano K, Suzuki Y, Ibuki E, Haba R, Himoto T, Masaki T.

Oncol Lett. 2017 ;13(3):1655-1659. doi: 10.3892/ol.2017.5643. 査読有.

Identification of microRNA profiles associated with refractory primary biliary cirrhosis.

Sakamoto T, Morishita A, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Iwama H, Himoto T, Masaki T.

Mol Med Rep. 2016 ;14(4):3350-6. doi: 10.3892/mmr.2016.5606. 査読有.

Metformin-suppressed differentiation of human visceral preadipocytes: Involvement of microRNAs.

Fujita K, Iwama H, Oura K, Tadokoro T, Hirose K, Watanabe M, Sakamoto T, Katsura A, Mimura S, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Morishita A, Yoneyama H, Okano K, Suzuki Y, Himoto T, Masaki T.

Int J Mol Med. 2016 ;38(4):1135-40. doi: 10.3892/ijmm.2016.2729. 査読有.

MicroRNA profiles in cisplatin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

Miyata M, Morishita A, Sakamoto T, Katsura A, Kato K, Nishioka T, Toyota Y, Fujita K, Maeda E, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Kobara H, Fujiwara S, Nishiyama N, Iwama H, Himoto T, Hirashima M, Masaki T.

Int J Oncol. 2015 ;47(2):535-42. doi: 10.3892/ijo.2015.3036. 査読有.

Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via apoptosis in vitro and in vivo.

Fujita K, Iwama H, Sakamoto T, Okura R, Kobayashi K, Takano J, Katsura A, Tatsuta M, Maeda E, Mimura S, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Morishita A, Yoneyama H, Yamana

Y, Himoto T, Okano K, Suzuki Y, Niki T, Hirashima M, Masaki T.

Int J Oncol. 2015;46(6):2419-30. doi: 10.3892/ijo.2015.2941. 査読有.

MicroRNA profiles following metformin treatment in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.

Katsura A, Morishita A, Iwama H, Tani J, Sakamoto T, Tatsuta M, Toyota Y, Fujita K, Kato K, Maeda E, Nomura T, Miyoshi H, Yoneyama H, Himoto T, Fujiwara S, Kobara H, Mori H, Niki T, Ono M, Hirashima M, Masaki T.

Int J Mol Med. 2015 ;35(4):877-84. doi: 10.3892/ijmm.2015.2092. 査読有.

Profile of microRNAs associated with aging in rat liver.

Mimura S, Iwama H, Kato K, Nomura K, Kobayashi M, Yoneyama H, Miyoshi H, Tani J, Morishita A, Himoto T, Deguchi A, Nomura T, Sakamoto T, Fujita K, Maeda E, Izuishi K, Okano K, Suzuki Y, Masaki T.

Int J Mol Med. 2014 ;34(4):1065-72. doi: 10.3892/ijmm.2014.1892. 査読有.

〔学会発表〕(計10件)

肝細胞癌における新しい腫瘍マーカーとしての候補 circulating microRNA の同定.

大浦杏子, 米山弘人, 正木 勉.

第52回日本肝臓学会総会 2016.5.19-20, ホテルニューオータニ幕張・東京ベイ幕張ホール(千葉県・美浜市).

肝細胞癌に対する telmisartan の抗腫瘍効果の検討.

大浦杏子, 桑村英里, 山名佳美, 千代大翔, 田所智子, 山下拓磨, 藤原新太郎, 藤田浩二, 三村志麻, 坂本鉄平, 野村貴子, 谷丈二, 三好久昭, 森下朝洋, 米山弘人, 正木 勉.

第52回日本肝臓学会総会 2016.5.19-20, ホ

テルニューオータニ幕張・東京ベイ幕張ホール（千葉県・美浜市）。

原発性胆汁性肝硬変患者の血清における microRNA の網羅的解析。

坂本鉄平，森下朝洋，大浦杏子，明石瑛美子，田所智子，藤田浩二，三村志麻，野村貴子，谷 丈二，三好久昭，米山弘人，岩間久和，正木 勉。

第 51 回日本肝臓学会総会 2015.5.21-22，ホテル日航熊本・くまもと県民交流館パレア・熊本ホテルキャッスル（熊本県・熊本市）。

次世代シーケンサを用いた慢性肝炎から肝発癌に關与する候補遺伝子の同定。

森下朝洋，岩間久和，田所智子，大浦杏子，藤田浩二，三村志麻，坂本鉄平，野村貴子，谷 丈二，三好久昭，米山弘人，正木 勉。

第 51 回日本肝臓学会総会 2015.5.21-22，ホテル日航熊本・くまもと県民交流館パレア・熊本ホテルキャッスル（熊本県・熊本市）。

核酸アナログによる HBV-DNA 陰性化に關連する血清マイクロ RNA の網羅的解析。

三村志麻，藤田浩二，大浦杏子，田所智子，明石瑛美子，坂本鉄平，豊田由花，野村貴子，谷 丈二，三好久昭，森下朝洋，米山弘人，小川 力，出口章広，樋本尚志，正木 勉。

第 51 回日本肝臓学会総会 2015.5.21-22，ホテル日航熊本・くまもと県民交流館パレア・熊本ホテルキャッスル（熊本県・熊本市）。

門脈圧亢進症を有する肝障害度 C の肝細胞癌症例に対する摘脾の有効性。

野村貴子，谷 丈二，出口章広，三好久昭，米山弘人，森下朝洋，山本尚樹，岡野圭一，鈴木康之，正木 勉。

第 18 回日本肝臓学会大会 2014.10.23-26，神戸国際展示場・ポートピアホテル・神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）。

高度脈管浸潤を伴う切除不能進行肝細胞癌に対する内科的治療戦略。

谷 丈二，野村貴子，三好久昭，米山弘人，森下朝洋，永野拓也，高口浩一，守屋昭男，安東正晴，小川 力，正木 勉。

第 18 回日本肝臓学会大会 2014.10.23-26，神戸国際展示場・ポートピアホテル・神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）。

NASH に対するメトホルミン作用機序に關連するマイクロ RNA の網羅的解析。

森下朝洋，桂 明子，谷 丈二，坂本鉄平，龍田美和，藤田浩二，前田瑛美子，野村貴子，三好久昭，米山弘人，正木 勉。

第 18 回日本肝臓学会大会 2014.10.23-26，神戸国際展示場・ポートピアホテル・神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）。

メトホルミンによる NASH の進行抑制効果に關連する miRNA の網羅的解析。

藤田浩二，坂本鉄平，前田瑛美子，龍田美和，桂 明子，豊田由花，三村志麻，野村貴子，谷 丈二，三好久昭，森下朝洋，米山弘人，樋本尚志，正木 勉。

第 101 回日本消化器病学会四国支部例会 2014.6.14-15，松山市総合コミュニティセンター（愛媛県・松山市）。

脈管浸潤を伴う切除不能進行肝細胞癌に対する局所放射線併用リザーバー動注治療 fail 後ソラフェニブ導入例の検討。

野村貴子，谷 丈二，前田瑛美子，三好久昭，米山弘人，森下朝洋，樋本尚志，正木 勉。

第 50 回日本肝臓学会総会 2014.5.29-30，ホテルニューオータニ（東京都・千代田区）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 貴子（NOMURA, Takako）
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70645415

(2) 研究協力者

正木 勉（MASAKI, Tsutomu）