

平成22年 5月14日現在

研究種目： 基盤研究（B）
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19390198
 研究課題名（和文） 肝臓の炎症性発がん初期段階を構築する oncomiR 分子の同定と治療応用
 研究課題名（英文） Research of oncomiRs contributing to initiation process of inflammation-associated carcinogenesis in liver
 研究代表者
 中本 安成（NAKAMOTO YASUNARI）
 金沢大学・附属病院・講師
 研究者番号： 40293352

研究成果の概要（和文）： 慢性肝炎から肝がんに至るがん化のイニシエーション過程に作用するマイクロRNA分子 [oncogenic micro RNA ; oncomiR(s)] を同定することを目的とした。これまで確立したB型肝炎ウイルス（HBV）トランスジェニックマウスを用いた炎症性発がんモデルにおいて、経時的な遺伝子発現および酸化ストレスと相関する8個の oncomiR 分子を明らかにした。これらの分子は、肝臓における前がん状態で悪性転化を制御する標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： The current study was designed to identify oncogenic micro RNAs (oncomiRs) contributing to the initiation process of inflammation-associated carcinogenesis in chronic viral hepatitis. Using a unique mouse model of chronic hepatitis B, the expression levels of eight oncomiR molecules were observed to be correlated with gene expression profiles and oxidative stress detected during disease progression. These molecules were suggested to be targets in the development of a novel class of anticarcinogenic agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野： 肝臓病学

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： 癌、遺伝子、マイクロアレイ、動物、内科

1. 研究開始当初の背景

肝細胞がん（肝がん）の分子病態に関して

これまで幾多の検討が行われてきたが、発がん予防につながる標的遺伝子は明らかになっていない。この原因として、既存の遺伝子

を対象とする研究手法に限界があったものと推察される。

【新たな制御分子 microRNA】近年ヒト、マウスをはじめとするゲノム解読プロジェクトが進行する中で、全RNAの半分近くがタンパク質をコードしない non-coding RNA 分子であることが明らかになった。non-coding RNA は未知の多様な分子の総称であり、遺伝子の発現を抑制する microRNA (miRNA) や small interfering RNA (siRNA) が含まれている。なかでも miRNA 分子は、メッセンジャーRNAのイントロン部分に由来する22塩基程度の短い一本鎖RNAであり、機能としては遺伝子の読み枠(ORF)に直接結合して分解したり、メッセンジャーRNA 3'非翻訳領域に結合して遺伝子翻訳を抑制する。その90%以上は広く動植物に渡って保存されているという特徴があり、これまで300個以上のmiRNA分子が報告されたが、ヒト染色体には1000個くらい存在するものと推測されている。またそれぞれのmiRNA分子は複数の遺伝子を制御しており、ヒトの全遺伝子の1/3以上がmiRNAに制御されているものと予測される。

生体においてはmiRNA分子が細胞の増殖、分化、アポトーシスを制御する可能性が報告されており、いずれかに破綻を来した場合にがん化を誘発することが考えられる。そして、がんを引き起こすmiRNA分子は、がんマイクロRNA [oncogenic micro RNA ; oncomiR(s)] (Nature 435:828,2005; Nature Rev. Cancer 6:259,2006) と呼ばれ、国内外で精力的に検索されているものの、その標的となる遺伝子(標的遺伝子)を含めた全貌は未だ明らかになっていない。

【炎症性発がんモデルの特徴】これまで我々は細胞免疫学的手法を用いて、B型肝炎ウイルストランスジェニックマウスのウイルス抗原に対する慢性炎症が、組織学的に慢性肝炎→前がん状態→肝がんと炎症性発がんのプロセスを誘導するモデルを確立した(Nakamoto et al.: J. Exp. Med. 188:341,1998)。さらに細胞免疫機序に関して、CD8⁺ Tリンパ球が誘導する一連の反応を解明した(Nakamoto et al.: J. Exp. Med. 196:1105,2002; Cancer Res. 64:3326,2004)。しかし、これらの細胞免疫を抑制する手法の治療応用を考えると、感染、自己免疫、他臓器の発がんといった多くの副反応が生じる可能性が推察された。

そこで、炎症反応自体の制御ではなく、慢性炎症が作用して形質が転換した肝細胞内の発がん責任分子を探索する研究計画を推進してきた。さらに、同時に定量したmiRNA

分子の中で明らかに発現レベルが亢進するものが認められた。

これより、前がん状態を誘導する(イニシエーション)過程における遺伝子発現および酸化ストレスの原因分子として oncomiR の関与と治療応用の可能性を検討する本研究の着想に至った。

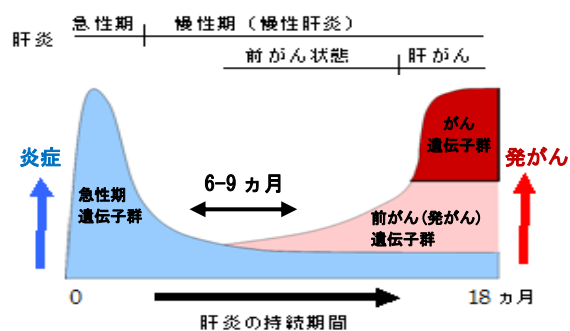
2. 研究の目的

肝臓における前がん状態の遺伝子変化を構築する oncomiR の同定と発がん予防への応用性を検討する研究計画を立案した。慢性肝炎から肝がんに至るマウスモデルの経時的な発現遺伝子プロファイル、酸化的DNA障害の検討から、炎症性発がん過程の初期段階を推定して、この時期に増加するmiRNA分子をスクリーニングした。得られたmiRNAの機能評価、治療法への基礎検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 慢性肝炎モデルの作成

系統107-5D(遺伝学的背景H-2^d)を用いて既報(Nakamoto et al.: J. Exp. Med. 188:341,1998)のごとく行った。慢性肝炎→前がん状態→肝がんと炎症性発がんのプロセスを進展した(下図)。



(2) 発現遺伝子プロファイル解析

(1)の肝組織よりRNAを抽出して、以下の方法により解析した。

- DNAチップ(オリゴヌクレオシド・マイクロアレイ; Agilent社)
- Real-time 定量的RT-PCR法(Applied Biosystems社 7700)

(3) 酸化的DNA障害の定量

(1)で得られた肝組織を用いて(2)と同時に以下の検討を行った。

- 蛍光免疫組織染色; 8-ニトログアニンおよび8-OHdGの生成、NFκBの活性化。

b. 電気化学検出器(ECD)付き HPLC ; 8-ニトログアニン、8-OHdG の定量。

(4) miRNA 分子の分離、検出

(2) で用いた同一の組織から miRNA を回収した。

A) miRNA 分子の分離、精製：全 RNA から miRNA の画分を精製して解析に用いた (Ambion 社)。

B) miRNA 分子の検出：精製された miRNA は、以下の方法を用いて定量した。

a. miRNA マイクロアレイ (*mirVana*TM miRNA Bioarrays V2 ; Ambion 社)

b. miRNA Real-time 定量的 R T - P C R 法 (TaqMan[®] MicroRNA Assays ; Applied Biosystems 社)

(5) miRNA 分子の in vitro 機能解析

a. 細胞への miRNA 導入 (pSilencerTM 4.1-CMV Expression Vectors)

b. 細胞内の miRNA 抑制 (Anti-miRTM miRNA Inhibitors ; ともに Ambion 社)

a., b. の操作を加えたときの DNA チップ解析、細胞の機能的解析を行った。

4. 研究成果

肝臓での炎症性発がんモデルを用いて、前がん状態で発現遺伝子プロファイルを制御している miRNA 分子を同定する実験計画において、以下の成果を得た。

(1) 発現遺伝子プロファイル解析：

炎症性発がん過程の初期段階に相当する時期 (肝炎 6 ~ 9 ヶ月目) の発現プロファイルを明らかにした。この時期に特異的に変動する 157 個の遺伝子 (シグナル伝達 26 個、細胞増殖 23 個、代謝 23 個、転写・分化 15 個、その他) を明らかにした。これらは肝炎の急性期や肝臓組織にみられる遺伝子群とはほとんど重複を認めない特徴的なものであった。また、組織学的に前がん結節 (preneoplastic foci) と呼ばれるがん化に向かう細胞集団が出現する時期 (前がん状態) に先行していることが分かった。

(2) 酸化的 DNA 障害：

(1) と同時期の肝細胞には、慢性炎症の結果として誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の活性化が起こり、酸化 (8-OHdG) およびニトロ化 DNA 損傷塩基 (8-ニトログアニン) の蓄積が認められた。

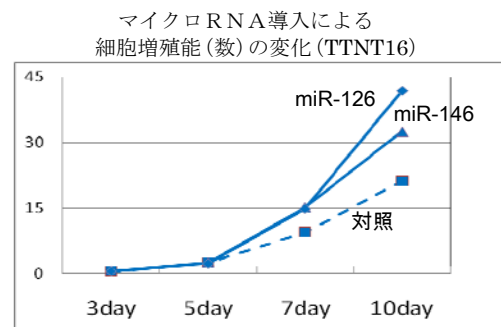
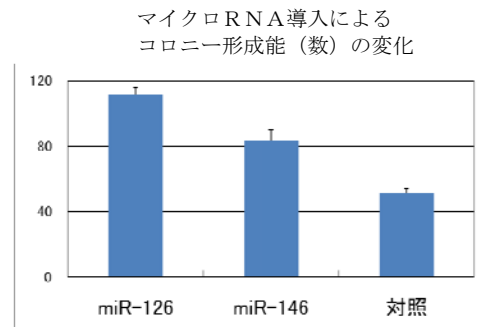
(3) miRNA 分子の分離、検出：

マイクロアレイ法を用いて、がん組織において特異的に変動している遺伝子について

網羅的にスクリーニングしたところ、発現の亢進を示す 8 個の miRNA 遺伝子が明らかとなった。このうち 6 つは既報の患者肝臓での検討結果と一致しており発がん病態への関与が強く示唆された。

(4) miRNA 分子の機能解析：

8 個の miRNA について in vitro 機能解析を実施したところ、2 つの miRNA において肝がん細胞株での細胞増殖作用とコロニー形成能をともに亢進させることを見出した (下図)。



また、検出された miRNA について、既報に基づいて標的となる遺伝子候補を検索したところ、(1) での変動遺伝子のうち、各 miRNA 分子について 3 ~ 7 個の標的遺伝子が候補として該当することが明らかとなった。

これより、肝臓における前がん状態で悪性転化を制御する miRNA 分子 (oncomiR) の候補が同定された。今後これらの miRNA について生体内における作用を詳細に解析することによって、新規の標的創薬に発展することが展望された。

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 14 件)

1. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Enhancement

- of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 126: 2164-2174, 2010, 査読有
2. Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, Li YY, Baba T, Kaneko S, Fujii C, Mukaida N: Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in liver. *Oncogene* 2009 (in press), 査読有
 3. Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N: Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J. Immunol.* 183: 3053-3063, 2009, 査読有
 4. Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y and Kaneko S: Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res.* 68: 10267-10279, 2008, 査読有
 5. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Mukaida N and Kaneko S: Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. *Cancer Sci.* 99: 2075-2082, 2008, 査読有
 6. Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Kakinoki K, Li YY, Wu Y, Matsushima K, Kaneko S and Mukaida N: Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice. *J. Leukoc. Biol.* 84: 1001-1010, 2008, 査読有
 7. Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y and Kaneko S: Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 49: 946-954, 2008, 査読有
 8. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, Sakai Y, Kitahara M, Arai K, Yamashita T, Yokoyama K, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O and Kaneko S: Combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with intratumoral dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma: clinical safety. *Clin. Exp. Immunol.* 251: 36-42, 2007, 査読有
 9. Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N and Kaneko S: Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. *Cancer Lett.* 251: 36-42, 2007, 査読有
 10. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N and Kaneko S: Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J. Immunol.* 178: 574-583, 2007, 査読有
 11. Kaji K, Nakamoto Y and Kaneko S: Analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T-cells with HLA-A*24 tetramers during phlebotomy and interferon therapy for chronic hepatitis C. *Oncol. Rep.* 18: 993-998, 2007, 査読有
 12. Komura T, Mizukoshi E, Kita Y, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Ohta T, Shimizu K, Nakamoto Y, Honda M, Takamura T and Kaneko S: Impact of diabetes on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical treatment in patients with viral hepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 102: 1939-1946, 2007, 査読有
 13. Oishi N, Shilagardi K, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S and Murakami S: Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells. *Cancer Sci.* 98:1540-1548, 2007, 査読有
 14. Kita Y, Mizukoshi E, Takamura T, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Impact of diabetes mellitus on prognosis of patients infected with hepatitis C virus. *Metabolism* 56: 1682-1688, 2007, 査読有
- [学会発表] (計 6 件)
1. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: #1725; Immunological factors associated with prolonged recurrence-free survival following transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; 第 60 回 American Association for the Study of

- Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 50 (4, Suppl.) 1103A; 一般; poster: Nov. 3, 2009
2. Shugo H, Ohmura M, Naka K, Nakamoto Y, Kaneko S, Hirao A: #1280; Identification of hepatic stem cells by monitoring of nucleostemin promoter activity. ; **第60回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 50 (4, Suppl.) 896A; 一般; poster: Nov. 1, 2009
 3. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: #125; Prolonged recurrence-free survival following combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; **第59回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California):** Hepatology 48 (4, Suppl.) 361A; 一般(parallel); oral: Nov. 2, 2008
 4. Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: #82; Cellular immune responses to multidrug resistance-associated protein 3 in the patients with hepatocellular carcinoma.; ; **第25回 Internal Association for the Study of the Liver (IASL) Biennial Meeting (San Francisco, California):** Hepatology 48 (4, Suppl.) 343A; 一般(parallel); oral: Nov. 2, 2008
 5. 中本安成, 金子周一: S-1; B型肝炎と獲得免疫; **第44回日本消化器免疫学会総会** (東京); シンポ; 口演; 平成19年7月8日
 6. 中本安成, 金子周一: S1-2; B型慢性肝炎を構築する獲得免疫と病態進展の分子機構; **第43回日本肝臓学会総会** (東京); シンポ; 口演; 平成19年5月31日; 肝臓 48巻Suppl.1 PageA6(2007.04)
- Liver Forum in Kyoto (第10回学術集会記録集編). B型慢性肝炎モデルを用いた肝癌細胞の起源と分子機構の研究. pp.7-11. 2008. 12
3. Nakamoto Y and Kaneko S: Transworld Research Network. Recent Development in Gene Therapy (Xiang J, ed.). Enhanced antitumor effects of suicide gene therapy combined with adenovirally delivered monocyte chemoattractant protein-1. pp.265-281. 2007. 7
 4. 中本安成, 金子周一: アークメディア社. 消化器発癌における炎症・再生・細胞応答の役割 (小俣政男編). 炎症性発癌モデルの肝細胞癌化プロセスを構築する分子病態の解析. pp.28-31. 2007. 4

6. 研究組織

(1)研究代表者

中本 安成 (NAKAMOTO YASUNARI)
 金沢大学・附属病院・講師
 研究者番号: 40293352

(2)研究分担者

平工 雄介 (HIRAKU YUSUKE)
 三重大学・医学系研究科・講師
 研究者番号: 30324510

[図書] (計4件)

1. 中本安成, 金子周一: 医歯薬出版. 別冊「医学のあゆみ」; 感染症と発癌の分子メカニズム (千葉勉編). 【感染症と発癌 UPDATE】HBVによる発癌病態. pp.31-35. 2009. 2
2. 中本安成: メディカルトリビューン社.