

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590770

研究課題名（和文）

肝細胞癌におけるマイクロRNAの網羅的解析及び癌特異的マイクロRNAの機能解析

研究課題名（英文）

Comprehensive analysis of microRNA and functional study of cancer-specific microRNA

研究代表者

正木 勉 (MASAKI TSUTOMU)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：30335848

研究成果の概要：

マイクロRNA網羅的解析において、そのクラスター解析において、肝硬変と肝臓は異なるプロファイリングを形成していた。また、最も差異が認められた、マイクロRNAは、マイクロRNA-527であり、肝臓において、極めて減弱していた。さらに、コンピューター予測により、glypican-3が、マイクロRNA-527の標的遺伝子の可能性を見出した。また、肝臓において減弱するマイクロRNA-527のターゲット分子がglypican-3遺伝子であることを実験的に確かめた。マイクロRNA-527の機能として、MAPキナーゼカスケードを亢進させる役割があった。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,900,000 | 870,000   | 3,770,000 |
| 2008年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：肝臓の診断、治療、癌進展機構のメカニズム

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、マイクロRNA、肝硬変

## 1. 研究開始当初の背景

90年代の急速な勢いでヒトゲノムプロジェクトが進行した。その結果、予想に反してゲノムDNA30億からタンパクの翻訳に使用される遺伝子は、1.5%にすぎず、タンパク数にして2万2千を規定しているにすぎないということが判明した。さらに、意外な事に、ゲノムDNAの70%がRNAに転写されており、

細胞内には膨大な未知の

noncoding RNAが存在することが判明した。マイクロRNAは、このnoncoding RNAの範疇に属し、植物や動物のゲノムのイントロンにコードされる21～25塩基程度の小さな分子で、これらマイクロRNAの機能としては特異的なメッセンジャーRNA(mRNA)の3'非翻訳領域に部分相補的に結合し、そのmRNA

の翻訳、遺伝子発現を抑制している。最近、種々の癌において発現しているマイクロ RNA が、正常組織と比較し、著明に変化していることが報告されており、特定のマイクロ RNA が、細胞の癌化・進展に関与しているのではないかと推測されている。このことからある種のマイクロ RNA が、肝癌特異的に発現増強・減弱し、肝臓癌の発生、増殖、進展に関与している可能性がある。正常肝、慢性肝炎、肝硬変、肝癌においてマイクロ RNA の網羅的な発現プロファイリングを作成することは、発癌機序、予後予測、創薬などの新たな治療法開発の手がかりとなることが期待される。さらに、マイクロ RNA の研究は、将来的には、癌のみならず、さまざまな疾病の診断、治療、創薬開発を目指したバイオ産業の基盤技術となる可能性を秘めている。

## 2. 研究の目的

肝細胞癌におけるマイクロ RNA の網羅的解析及び癌特異的マイクロ RNA の機能解析を行なう。

## 3. 研究の方法

マイクロ RNA の網羅的解析は、アレイチップを用いて、検討しコンピューター解析を用いて、標的遺伝子を予測した。マイクロ RNA-527 の結合部位を含む cDNA が入ったグリピカン 3 の発現ベクターに、一過性発現に適した細胞株である COS7 にリボソーム法で遺伝子導入し、導入後、12 時間後にマイクロ RNA-527 を導入し、その 12 時間後の glypican-3 の発現を Western blot で調べる。

## 4. 研究成果

マイクロ RNA 網羅的解析において、そのクラスター解析において、肝硬変と肝癌は異なるプロファイリングを形成していた。また、最も差異が認められた、マイクロ RNA は、マ

イクロ RNA-527 であり、肝癌において、極めて減弱していた。次に、マイクロ RNA-527 が、どのメッセンジャー RNA 分子を制御するかを予測した。予測により、glypican-3 が、マイクロ RNA-527 の標的遺伝子の可能性を見出した。確かに、マイクロ RNA-527 が減弱していた肝癌においては、グリピカン-3 の発現は亢進していた。まず、肝癌において減弱するマイクロ RNA-527 のターゲット分子が glypican-3 遺伝子であることを次の方法で実験的に確認した。マイクロ RNA-527 の結合部位を含む cDNA が入ったグリピカン 3 の発現ベクターを、一過性発現に適した細胞株である COS7 にリボソーム法で遺伝子導入し、導入後、12 時間後にマイクロ RNA-527 を導入し、その 12 時間後の glypican-3 の発現を Western blot で調べた。さらに、COS7 に glypican-3 発現ベクターを導入 12 時間後、コントロールマイクロ RNA を導入し、その 12 時間後の glypican-3 の発現を Western blot で解析した。COS7 の glypican-3 の発現は、コントロールマイクロ RNA 導入群と比較し、マイクロ RNA-527 導入群は、glypican-3 のタンパクレベルは減弱した。また、肝癌においてマイクロ RNA-527 の機能解析をする上で、リボソーム法によりマイクロ RNA 活性を上げる合成マイクロ RNA-527 を癌細胞内に導入すると、MAP キナーゼカスケード亢進させていた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yoshida S, Kurokohchi K, Ueno T, Yoshino M, Shimada M, Masaki T Hepatic Von Meyenburg complex: A trigger of severe portal hypertension. *Liver International*, 29(4), 614-6145, 2009, (査読有)

- ② Mohammad HS, Kurokohchi K, Iwama H, Masaki T, and 21 others (last author), Annexin A2 expression and phosphorylation are up-regulated in hepatocellular carcinoma, *Int J Oncol*,33(6) 33: 1157-1163,2008,(査読有)
- ③ Kurokohchi K, Masaki T, and 9 others (5<sup>th</sup>), A combination therapy of ethanol injection and radiofrequency ablation under general anesthesia for the treatment of hepatocellular carcinoma, *World J Gastroenterol*, 14, 2037-2043, 2008. (査読有)
- ④ Kurokohchi K, Deguchi A, Masaki T, and 9 others (2<sup>nd</sup>), Successful treatment of hypovascular advanced hepatocellular carcinoma with lipiodol-targetting intervention radiology, *World J Gastroenterol*, 13, 4398-4400, 2007. (査読有).
- ⑤ Ogawa M, Masaki T, and 6 others (5<sup>th</sup>), Vitamins K2, K3 and K5 exert antitumor effects on established colorectal cancer in mice by inducing apoptotic death of tumor cells, *Int J Oncol*, 31, 323-331, 2007. (査読有)
- ⑥ Iwama H, Masaki T, Kuriyama S, Abundance of microRNA target motifs in the 3'-UTRs of 20 527 human genes. *FEBS Lett*, 581,1805-1810,2007(査読有)
- ⑦ Nonomura T, Masaki T, Iwama H, Kurokohchi K,and 8 others (2<sup>nd</sup>),

Identification of c-Yes expression in the nuclei of hepatocellular carcinoma cells: Involvement in the early stages of hepatocarcinogenesis, *Int J Oncol*、30,105-111, 2007. (査読有)

- ⑧ Kurokohchi K, Masaki T, and 7 others (3<sup>rd</sup>), Comparative study of the effects of percutaneous ethanol injection and radiofrequency ablation in cases treated with a straight or expandable electrode, *Oncol Rep*, 18, 1275-1279, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 谷 丈二、岩間久和、正木 勉、ワークショップ13「消化器疾患の分子遺伝学的病態」肝臓にて特異的に現弱する microRNA-527 の機能解析, 第 50 回日本消化器病学会大会, 2008. 10. 3, 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

正木 勉 (MASAKI TSUTOMU)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号 : 30335848

### (3) 連携研究者

石丸 伊知郎 (ISHIMARU ICHIRO)  
香川大学・工学部・教授  
研究者番号 : 70325322

岩間 久和 (IWAMA HISAKAZU)  
香川大学・総合生命科学研究センター・准教授  
研究者番号 : 20398035

黒河内 和貴 (KUROKOCHI KAZUTAKA)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10294735