

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590482

研究課題名(和文)肝細胞特異的Dicer欠損マウスを用いたmiRNAの腫瘍抑制能の解析

研究課題名(英文)Analysis of tumor suppressive effects of miRNA using Dicer-deficient mice

研究代表者

関根 茂樹(Sekine, Shigeki)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：10321879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞特異的Dicer欠損マウスに発生した肝細胞がんの解析から、これらの腫瘍では、腫瘍により多様ながん関連遺伝子の発現異常が起きており、多数の腫瘍に共通して認められる発現異常や遺伝子変異は同定できなかった。Dicerの欠損に伴う発現機構を、より均質な背景を有する腫瘍を発生するモデルを用いて解析するために、マウス肝細胞に特定のがん遺伝子を導入し、発がんを可能とするモデルを確立した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed hepatocellular carcinomas arising in hepatocyte-specific Dicer-deficient mice and found that the altered expression of a number of cancer-related genes. However, we could not identify genes that are commonly dysregulated or mutated in multiple tumors. To analyze the role of Dicer in hepatocarcinogenesis, we established a mouse model that allows the induction of liver tumorigenesis by gene transfer in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：肝発がん Dicer

1. 研究開始当初の背景

microRNA は mRNA の安定性や翻訳の調節を介して蛋白発現の調節に重要な役割を果たしている non-coding RNA である。microRNA は配列依存性に特定の mRNA の分解や蛋白への翻訳を制御しており、個々の microRNA の機能については、そのターゲットとなる分子や生理機能について解析が進められている。これまでに、いくつかの microRNA のがん関連遺伝子制御への関与と、その発現異常の腫瘍発生との関連が報告されている。

一方、多くのヒト腫瘍において、microRNA 全体の発現が低下している事が知られている。腫瘍における microRNA 生成に関わる異常として、Dicer とともに microRNA の前駆体切断に関わる TRBP2 や miRNA 前駆体の核外輸送に関わる Exportin-5 などの microRNA の生成に関わる因子の遺伝子変異 (Melo, *Nat Genet* 2009; Melo, *Cancer Cell* 2010)、そして Dicer の 1 アレルの欠失が示されている (Kumar, *Genes Dev* 2009)。これらの所見は、microRNA 全体の発現低下が腫瘍発生に促進的に働く事を示すものである。

申請者はこれまで肝臓における microRNA の働きを明らかにする目的で、肝細胞特異的 Dicer 欠損マウス (*Alb-Cre;Dicer^{flx/flx}* mouse) を作成し、この解析を行ってきた (Sekine, *Gastroenterology* 2009; Sekine, *J Pathol* 2009)。Dicer は microRNA の生成に必要な酵素であるため、このマウスは肝細胞において microRNA の発現を欠失している。このマウスは肝細胞の脂肪化、グリコーゲンの減少等の代謝異常とともに、胎児期に特異的な遺伝子の再発現をきたす。また、Dicer を欠失した肝細胞は著明なアポトーシスの増加を示す。この所見は microRNA の欠失が肝細胞の生存に重要な役割を果たしている事を示す所見である。しかしながら、このマウスを長期間飼育すると、microRNA の発現を欠いた肝細胞がんが高頻度に発生する。申請者はこれまでの解析から、この現象は Dicer 欠失肝細胞に 2 次的な遺伝子異常が加わった結果であることを示唆する所見を得ている (Sekine, *Gastroenterology* 2009, 下図)。

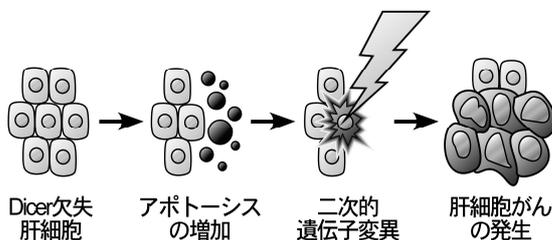


図: 肝細胞特異的 Dicer 欠失マウスにおける肝発癌モデル

2. 研究の目的

microRNA は 20-25 塩基の non-coding RNA で、mRNA の分解や翻訳の抑制を通じてタンパク質の発現を制御する。これまで、個々の microRNA の発現異常が腫瘍発生に関わる事が示されてきたが、多くのヒト腫瘍において、しばしば microRNA 全体の発現低下が見られる事が報告されている。近年、肝細胞がんにおいても、microRNA 生成に関わる分子の発現低下と、その予後因子としての可能性が報告されている (Kitagawa, *Cancer Sci* 2013)。

本研究では microRNA の発現を欠損する肝細胞特異的 Dicer 欠損マウスに発生する肝細胞がんをモデルとして、microRNA の欠失、発現抑制が腫瘍発生を促進する機構を解析する。また、Dicer の欠損自体はむしろ細胞のアポトーシス等を誘導するため、Dicer の欠損と協調して腫瘍生成に関わる因子が肝発がんに必要なと思われる。これらの因子の働きを検索する。

3. 研究の方法

肝細胞特異的 Dicer 欠損マウスに形成された肝細胞がん組織を用いて、この腫瘍におけるがん関連遺伝子の発現異常、遺伝子変異およびメチル化異常を、定量 PCR、シーケンシング、バイサルファイトシーケンシングなどを用いて検索した。

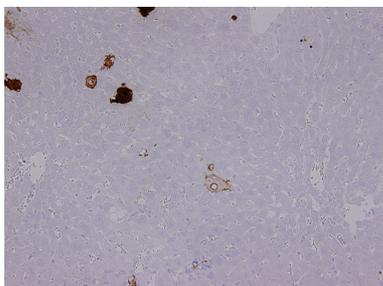
特定のがん関連遺伝子の導入によって Dicer の欠損と協調的に肝発癌を誘導する事が可能なモデルの確立を目的として、肝細胞特異的に Dicer の両アレルまたは片アレルを欠損したマウス (*Alb-Cre;Dicer^{flx/flx}* mouse, *Alb-Cre;Dicer^{flx/WT}* mouse) に外来遺伝子を導入するモデルの導入を行った。この系の導入により比較的均質な分子病理学的背景を持ち、再現性のある肝発がんの誘導が可能となる事が期待される。遺伝子導入にはトランスポゾンプラスミドベクターをもちいて、尾静脈注射による導入を行った。トランスポゾンには Sleeping beauty (Bell, *Nat Protoc* 2007), piggyback (Saridey, *Mol Ther* 2009) を用いた。

4. 研究成果

肝細胞特異的 Dicer 欠損マウスに自然発生する肝細胞癌においてがん関連遺伝子の発現を定量 PCR を用いて検索した。肝腫瘍においては *Myc*, *Mdm2* などの発現上昇が見られたが、多くの腫瘍に共通して認められる発現異常は認められなかった (結果の一部は Sekine, *Gastroenterol* 2009 に報告)。また、マウス化学発がんを高頻度に肝細胞がんに変異が知られている *Hras*, *Braf* をはじめとするがん遺伝子の変異についても検索を行ったが、明らかな変異は認められなかった。

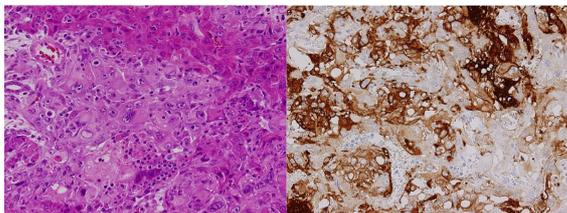
これらの所見などから、Dicer の欠損はマウス肝細胞において多様な腫瘍関連遺伝子の変化と協調することで腫瘍発生に關与する事が示唆された。一方、Dicer の欠損による腫瘍発生過程の解析のためのモデルとしては、さまざまな分子病理学的背景を有するこれらの腫瘍は複雑すぎるものと考えられた。

以上の結果から、Dicer 欠損の腫瘍発生における機能について機能的な検索を行うためには、Dicer を欠損した生体肝細胞への既知の腫瘍関連遺伝子の導入などにより、腫瘍発生を誘導可能なモデルの確立が望ましいと考えた。このため、トランスポゾンを用いてがん関連遺伝子を発現するベクターを作成した。作成したベクターはマウス尾静脈からハイドロダイナミックインジェクションにより肝細胞への導入を行った。異なるトランスポゾンとプロモーターなどを用いた複数のベクターを用いて条件設定を行い、比較的高い効率で再現性を持って遺伝子の導入と安定的な発現を得る事が出来た(下図)。



図：マウス肝細胞に導入されたがん関連遺伝子産物の発現 (Tag に対する免疫染色)

次に、Dicer 欠損マウスに形成した肝細胞がんの解析から、Dicer と協調して肝臓がんを促進する事が期待される遺伝子を組み込んだベクターを作成した。このベクターを用いて、マウス肝細胞にがん関連遺伝子をの導入を行った。この結果、Dicer 変異マウス、および非変異マウスのそれぞれにおいて、肝細胞がんの発生を誘導できる遺伝子が複数得られた(下図)。



図：外来遺伝子導入によって形成された肝細胞がん(左)および導入されたがん関連遺伝子産物の発現(右: Tag に対する免疫染色)

この過程で得られた結果のうち、過去の論文などに類似の結果が報告されているものの多くは矛盾しない所見が得られたが、一部

のものは明らかに一致しない結果であった。これらの所見については、現在、その原因などについて詳細に検討を行っている。また、今後、この手法を用いて、野生型および肝細胞特異的 Dicer 欠損マウスに形成された腫瘍の解析を通じて、Dicer および microRNA の抑制が肝細胞発がんに与える影響について検索を進めていく。

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 5 件)

1. Matsuzaki J, Suzuki H, Tsugawa H, Watanabe M, Hossain S, Arai E, Saito Y, Sekine S, Akaike T, Kanai Y, Mukai K, Auwerx J, Hibi T.

Bile acids increase levels of microRNAs 221 and 222, leading to degradation of CDX2 during esophageal carcinogenesis.

Gastroenterology. 2013;145(6):1300-11. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.008. 査読あり

2. Makuuchi Y, Honda K, Osaka Y, Kato K, Kojima T, Daiko H, Igaki H, Ito Y, Hoshino S, Tachibana S, Watanabe T, Furuta K, Sekine S, Umaki T, Watabe Y, Miura N, Ono M, Tsuchida A, Yamada T.

Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy. Cancer Sci. 2013;104(8):1045-51. doi: 10.1111/cas.12187. 査読あり

3. Sekine S, Ogawa R, Ojima H, Kanai Y. Overexpression of -methylacyl-CoA racemase is associated with CTNNB1 mutations in hepatocellular carcinomas. Histopathology. 2011;58(5):712-9. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03798.x. 査読あり

4. Sekine S, Ogawa R, Ojima H, Kanai Y. Expression of SLC01B3 is associated with intratumoral cholestasis and CTNNB1 mutations in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci. 2011;102(9):1742-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01990.x. 査読あり

5. Sekine S, Ogawa R, Kanai Y. Hepatomas with activating Ctnnb1 mutations in 'Ctnnb1-deficient' livers: a tricky aspect of a conditional knockout mouse model. Carcinogenesis. 2011;32(4):622-8. doi:

10.1093/carcin/bgr002. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根茂樹 (Shigeki Sekine)

独立行政法人国立がん研究センター・中央
病院・医長

研究者番号： 10321879

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし