

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19848

研究課題名(和文) HCC再発のリスク因子(腫瘍および背景肝)となるlncRNAの同定とその臨床応用

研究課題名(英文) Discovery of long non-coding RNA biomarkers for predicting the prognosis of HCC

研究代表者

園原 史訓 (SONOHARA, Fuminori)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30745534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質に翻訳されないnon-coding RNAの一種であるLong non-coding RNA (lncRNA)は癌を含む様々な疾病の発生や調節に関わっている。本研究では肝細胞癌(HCC)の予後に関わるリスク因子としてのlncRNAを調査した。HCCの背景肝と転移性肝癌の背景肝をマイクロアレイを用いて比較した際にHULCおよびMALAT1の発現がHCC背景肝で有意に高値であった。また、HCC腫瘍部におけるHULCとMALAT1の発現がHCCの予後と有意に関係していた。HULCとMALAT1が切除されたHCCの予後に対するバイオマーカーとなりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNAs (lncRNAs) were shown to be the crucial regulators of the development of many diseases, including malignant neoplasms. In this study, we evaluated the effects of lncRNA expression levels in hepatocellular carcinoma (HCC) on postsurgical HCC prognosis. The candidate lncRNAs were identified by using the microarray assay. The expression levels of HULC and MALAT1 were shown to be significantly higher in the normal background tissue of HCC than those in the normal liver tissue of metastatic liver tumor without hepatitis. The increase in the expression levels of HULC and MALAT1 in HCC was significantly correlated with better overall survival of the patients. Expression levels of HULC and MALAT1 in HCC were shown to be significantly associated with the prognosis of curably resected HCC. The expression of these lncRNAs in HCC may correlate with the HCC malignancy. HULC and MALAT1 may represent potential prognostic biomarkers of the surgically resected HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：lncRNA 肝細胞癌 リスク因子 背景肝

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノム解析の結果により、ヒトゲノムの約 80%は RNA に転写されていることが分かった。しかし、そのうち約 2%しかタンパク質には翻訳されておらず、細胞内にはタンパク質に転写されない RNA が多数存在することが明らかになった。このタンパク質に翻訳されない (non-coding) RNA のうち、200 塩基以上のものが long non-coding RNA (lncRNA) と呼ばれる。

これまでジャンクだと考えられてきた lncRNA だが、近年その分子機能が明らかにされつつある。例えば、lncRNA の一つである HOTAIR は H3K27 メチル化酵素複体のサブユニットと相互作用しメチル化を誘導し、転写抑制に関わる。さらに HOTAIR の発現は原発性乳がん患者の転移巣で正常組織および原発巣よりも高発現であるという報告もある。このような報告は主に腫瘍組織における発現レベルの差や予後への影響を論じている。また、lncRNA は細胞内でのコピー数が多量であるため、発現の多いものは血液、尿など肝組織よりも採取しやすい体液で検出できる可能性があり、より非侵襲的なマーカーになりうる点でも魅力的である。

(2) 肝細胞癌 (HCC) は肝内転移 (IM)、多中心性発生 (MO) という特徴的な 2 つの再発様式をもつ。当教室ではこれまでに行った肝切除例のうち、同時性、異時性に多発した HCC のゲノムパターンを調べ、多発した病変はそれぞれのゲノム型が異なる多中心性発生が、原発巣の転移であることよりもはるかに多く認められることを明らかにした。さらに当科における手術症例の臨床病理学的因子の統計解析でも再発のリスク因子は早期再発には腫瘍因子、晚期再発 (多中心性発生が中心) では背景肝因子が独立したリスク因子であることを明らかにした。また、これまでに腫瘍の解析から予後関連因子を抽出するとともに、背景肝の検討から予後関連因子の抽出も行ってきた。

HCC の発症や進展に細胞内に多量に存在する lncRNA の影響は重要であると考えられる。さらに、少数の既報に見られる HCC 腫瘍における lncRNA の変化を検討するだけでは不十分であり、背景肝における lncRNA の影響も明らかにすることが重要であるという考えに至った。

## 2. 研究の目的

(1) Non-coding RNA が細胞内に多量に存在することはヒトゲノム解析により解明されてきた。これまでは 20 塩基ほどのマイクロ RNA の解析が主流であり lncRNA についても注目されつつあるが、まだまだ十分な

検討がなされていない。この lncRNA に着目した点が本研究の特色である。HCC は腫瘍切除後に約 70%と高頻度に残肝再発を来し、さらに再発様式は肝内転移と多中心性発生と 2 つの様式をもつ。これらの点でその他の消化器がんとは腫瘍学的に異なる特徴をもつ疾患である。我々は肝内再発に関して多中心性発生が大半であることに注目し、その結果から、lncRNA の解析についても腫瘍因子の検討とむしろそれよりも背景肝因子の検討を行うことが重要であると考えた。

(2) 背景肝因子の検討から再発に関連する lncRNA を同定することは、さらに慢性肝炎や肝硬変などの障害肝をもつ HCC 発症予備軍の患者に易発症性マーカーとして応用できる可能性が考えられる。これは「肝炎患者の中で HCC 発症危険群を予知する」という、現在の臨床における喫緊の問題点を解決しうる一助となる。また、lncRNA は細胞内のコピー数が多いことから採取が容易な検体である血液や尿といった体液での lncRNA いわば cell free lncRNA の応用の可能性が示唆され、検査が容易な腫瘍マーカーや予後予測マーカーとなる可能性がある。

(3) 我々は lncRNA に以前より注目し、HCC 切除検体を用いた発現アレイ解析により lncRNA の発現を非癌部と比較し、変化のあるものを抽出して検討してきた。HCC 腫瘍および HCC 背景肝因子から、予後予測や HCC 発症危険群の予知に応用できるバイオマーカーを抽出することが本研究の主たる目的である。

## 3. 研究の方法

(1) HCC の背景肝および腫瘍において発現に変化のある lncRNA を抽出するため、マイクロアレイによる抽出を試みた。HCC の背景肝と正常に近い肝組織を比較する目的で、対照として転移性肝癌切除標本に含まれる正常肝組織部分 (super normal: SN) を用いた。SN、HCV 肝炎の HCC 背景肝 (corresponding normal: CN) および HCC (腫瘍部) を比較したマイクロアレイを行った。これにより、背景肝因子の候補となりうる lncRNA の抽出を試みた。

(2) SN 及びそれぞれ 24 例の A: 予後不良 HCC 患者群、B: 予後良好 HCC 患者群の手術検体の CN および腫瘍組織における lncRNA の発現状況を定量 RT-PCR 法を用いて調査した。lncRNA のうち、SN と CN の比較などにより、背景肝因子として特に予後因子との関連が強いと予想されるもの、腫瘍組織において変化があり、特異的マーカーとしての可能性を持つものを絞り込んだ。

(3) 名古屋大学医学部附属病院第二外科で1998年から2011年の間に行われた158例のHCC根治切除例を対象とした。患者の観察期間中央値は48.5か月(範囲、0.3から193.8か月)であった。年齢中央値65歳(範囲、37から84歳)背景肝はHBV肝炎41例、HCV肝炎92例、非BC肝炎28例であった。

(4) RT-PCR法：158例の各サンプルから抽出されたRNAを用いて逆転写反応を行い、相補的DNAを合成した。これを鋳型とし、各サンプルにおける発現を測定するために定量RT-PCR法を用いて発現状況を調査した。

(5) 各IncRNAのHCC・CNにおける発現状況と各臨床病理学的因子および予後(全生存期間・無再発生存期間)との関連を統計学的に解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 新規HCCのバイオマーカーとなるIncRNA抽出のため、発現アレイによるCNとSNの比較を行った。SNと比較してCNで発現が高い候補IncRNAとしてUCA(Urothelial Cancer Associated 1)、HULC(Hepatocellular Carcinoma Up-Regulated Long Non-Coding RNA)、MALAT1(Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1)、GAS5(Growth Arrest Specific 5)、およびTUG1(Taurine Up-Regulated 1)が抽出された。

(2) 11例のSNと48例のCN・HCCにおいて、(1)で抽出されたIncRNAの発現を調査した。この結果、HULCおよびMALAT1の発現がCNでSNよりも有意に高かった。HULCの発現はCNとHCC間で有意差を認めなかったがMALAT1はCNよりHCCの発現が有意に低かった(Fig.1)

(3) 158例の根治切除後HCCのCN・腫瘍部におけるHULC・MALAT1の発現を調査した。HULCの発現はCNより腫瘍部で有意に高値であった。一方MALAT1の発現はCNとHCCの間で有意差を認めなかった(Fig.2)

(4) HCCの各臨床病理学的因子とHULC・MALAT1発現の関係について検討を行った。CNにおける各IncRNA発現については臨床病理学的因子と有意な関連を認めなかった。一方、腫瘍部におけるHULCの発現は被膜形成を認めるHCCで有意に高かった。また、腫瘍部でのMALAT1の発現は2cm以上のHCCで有意に低かった。また、HULCとMALAT1の発現は血清フェトプロテイン20ng/ml以上のHCCでそれ未満のHCCよりも有意に低値であった(Fig.3)

Fig.1 SN, CNおよびHCCにおける各IncRNAの発現

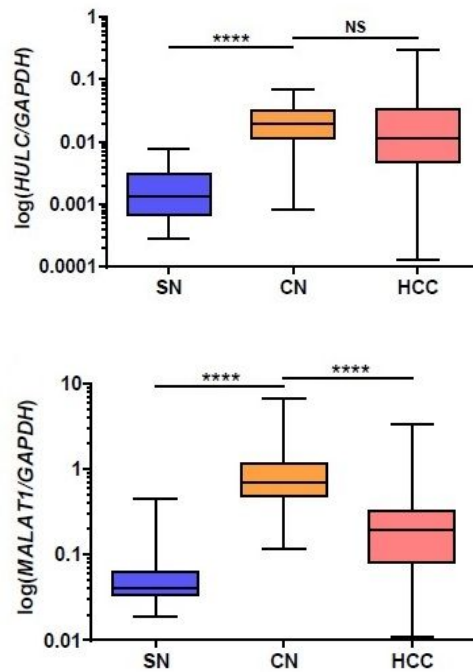


Fig.2 158例のCN・HCCにおける各IncRNAの発現

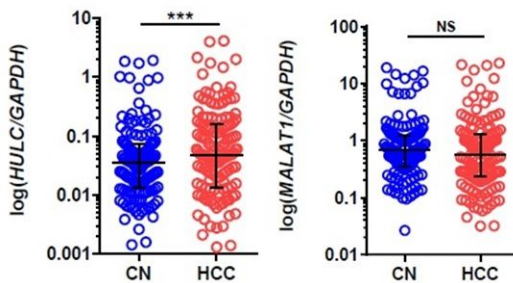
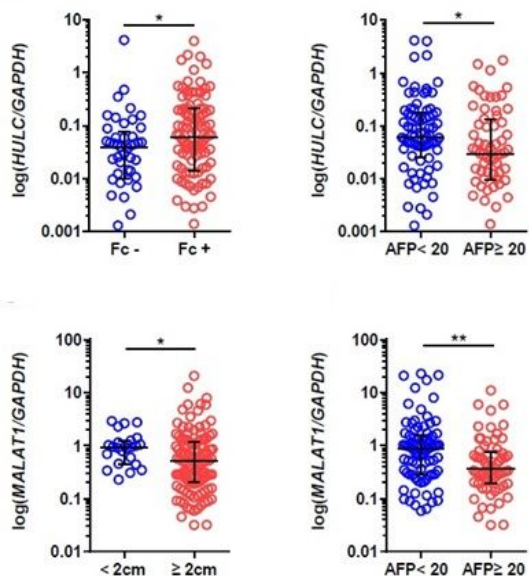
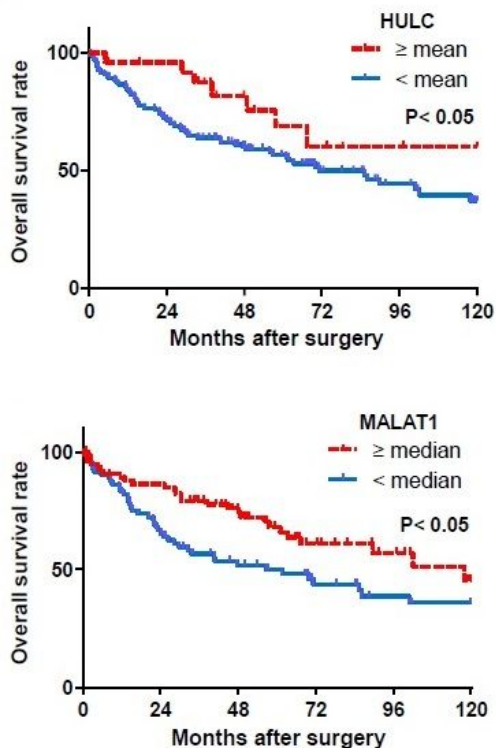


Fig.3 臨床病理学的因子と各IncRNA発現



(5) HULC・MALAT1 の HCC 腫瘍部における発現に従い、158 例を二群に分けると全生存期間でそれぞれの発現高値群は低値群よりも有意に予後が良好であった。無再発生存に関しては二群間の予後に有意な差を認めなかった (Fig.4)

Fig.4 各 lncRNA 発現と全生存期間



(6) 本研究では HCC の背景肝に着目して予後予測バイオマーカーの候補となる lncRNA の抽出を試みた。CN と SN を比較したマイクロアレイ結果に基づき、HULC・MALAT1 を候補として抽出したが、多数例の HCC 検体では CN における発現変化ではなく、腫瘍部における発現高低が臨床病理学的因子や予後と関係していた。マイクロアレイによる候補 lncRNA の抽出には単一の HCV 肝炎の CN を用いているが、多数例の検討では HCV 肝炎以外の CN も含まれているため今後の検討において注意が必要と考えられた。また、乳癌では MALAT1 の変異型によって発現パターンが異なるとも言われており、MALAT1 の発現を検討する際に変異型の有無を考慮する必要があると考えられた。

本研究の検討では、HCC 腫瘍における HULC・MALAT1 の発現と HCC 腫瘍因子との間に有意な関連を認め、腫瘍因子のより悪性度の高いと考えられるグループで各 lncRNA の発現は低い傾向にあった。また、腫瘍部における各 lncRNA の発現低値群がより不良な全生存期間を示したことから、HCC において HULC・MALAT1 の発現が低下す

る現象が、腫瘍としての悪性度と関係している可能性が示唆された。我々の知る限り HCC の予後に対する HULC・MALAT1 の関係について臨床検体を用いた報告はいまだない。今後のさらなる検討により、この二つの lncRNA が HCC 予後予測の有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

本研究成果は 2017 年 4 月時点で学会発表準備中かつ論文として国際雑誌に投稿中である。

<参考文献>

Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(3):155-159.

Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010;464(7291):1071-1076.

Nomoto S, Yamashita K, Koshikawa K, Nakao A, Sidransky D. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(2):481-487.

Sonohara F, Nomoto S, Inokawa Y, et al. High expression of Janus kinase 2 in background normal liver tissue of resected hepatocellular carcinoma is associated with worse prognosis. *Oncology reports*. 2015;33(2):767-773.

Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003;22(39):8031-41.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

稲岡健一, 猪川祥邦, 園原史訓, 野本周嗣. 発現アレイにより抽出した胃癌における lncRNA MALAT1 の検討. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016 年 4 月 14 日. 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市北区)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

園原 史訓 (SONOHARA, Fuminori)  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：3 0 7 4 5 5 3 4