

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09357

研究課題名(和文) RNAiスクリーニング法にて同定された肝癌における新規癌関連遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of novel cancer-related gene of HCC identified by RNAi screening method

研究代表者

高井 淳 (Takai, Atsushi)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80760587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリアプロセシングタンパクであるPMPCBの機能解析を行い、EpCAM陽性肝癌細胞におけるPMPCBの役割を解明した。PMPCB-shRNAによるミトコンドリア機能低下が活性酸素の増加を引き起こし、FOXOのリン酸化を促進することでbeta-cateninの転写活性を阻害し、EpCAM陽性肝癌細胞におけるEpCAM発現低下と細胞増殖の抑制・アポトーシスの亢進に寄与することが明らかとなった。肝癌幹細胞を標的とした新たな肝癌治療の開発に当たり、PMPCBが重要な標的分子となりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肝癌の幹/前駆細胞を標的とした治療の開発に当たり、肝癌幹/前駆細胞のマーカーであるEpCAMと、global RNAiスクリーニングでEpCAMとsynthetic lethalな関係性を持つ候補分子としてミトコンドリアプロセシングタンパクであるPMPCBに着目し、機能解析を行った。その結果、PMPCBの機能を阻害することで、beta-catenin pathwayの活性を低下させ、EpCAM陽性肝癌細胞のみを選択的にアポトーシスに誘導できることが分かった。本研究成果は、癌幹/前駆細胞を標的とした新しい治療法の開発につながり、今後の肝癌診療の発展に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We characterized PMPCB gene, which plays a role in mitochondrial protein processing, as a bona fide target for Epcam positive HCC. PMPCB blocking suppressed EpCAM expression and induced apoptosis specifically in EpCAM positive liver cancer cells in vitro and in vivo. PMPCB inhibition decreased the activity of Wnt/beta-catenin signaling via mitochondria-related reactive oxygen species production and FOXO activities, resulting in apoptosis and tumor suppression. These results indicate that a synthetic lethality screen is a viable strategy to identify actionable drivers of HCC and identify PMPCB as a therapeutically vulnerable gene in EpCAM positive HCC subpopulations.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝癌 癌幹細胞 EpCAM PMPCB

## 1. 研究開始当初の背景

従来、癌はモノクローナルな細胞集団により構成されると考えられていたが、近年の分子生物学手技の進歩により、癌の中には **cancer initiating cell** または **cancer stem cell** と呼ばれる幹細胞様の分子生物学的特徴をもった細胞群が存在し、これらの細胞が癌の増殖や進展に強く関与することが分かってきた。申請者らが留学中に所属していた研究グループは、肝前駆細胞のマーカーである **EpCAM** を強く発現する肝癌細胞が幹細胞様の分子生物学的特徴を呈しており、**EpCAM** 陽性肝癌細胞が癌の進展過程において中心的な役割を果たしていることを明らかにした(Yamashita et al. *Cancer Res* 2007; Yamashita et al. *Gastroenterology* 2009)。この結果を受け、**EpCAM** をターゲットとした分子標的療法の開発が試みられているが、有効な治療薬については報告がなく、臨床応用は難しい状態にあった。

近年、レンチウイルス **shRNA** ライブラリーを細胞に感染させ、導入された **shRNA** の **intensity** をマイクロアレイを用いて網羅的に解析する方法が開発された。この手技は **global RNAi** スクリーニング法と呼ばれ、複数の細胞群間における機能的な遺伝子発現の違いを同定するのに有用な方法である(Schlabach et al. *Science* 2008; Silva et al. *Science* 2008)。さらに、このスクリーニング方法は、ある特定の細胞を選択的に死に至らせる **shRNA** を同定する目的にも応用できることが分かっている(Luo et al. *Cell* 2009)。申請者らは、この **global RNAi** スクリーニング法を用いて **EpCAM** 陽性肝癌細胞を選択的に細胞死に誘導する候補 **shRNA** の同定を試みた。**EpCAM** 陽性群・陰性群が混在する細胞株に **47,000** 種類の遺伝子を標的とした **200,000** 種類のレンチウイルス **shRNA** ライブラリーを感染させ、**3** 日間または **5** 日間培養した後に **RNA** を抽出し、各種 **shRNA** に組み込まれた固有の塩基配列を増幅させたものを **shRNA** 特異的なプローブとハイブリダイズさせ、マイクロアレイを行った。得られたデータより、**EpCAM** 陽性細胞を選択的に排除する候補として **26** 種類、**EpCAM** 陰性細胞を排除する候補として **50** 種類の遺伝子に対する **shRNA** が選出された。その中でも **PMPCB shRNA** は、**EpCAM** 陰性群に比較し陽性群で最も低い信号強度を呈しており、**EpCAM** 陽性肝癌細胞を特異的に細胞死に導く有力な候補と考えられた。申請者らは、**PMPCB** 遺伝子の機能解析が **EpCAM** 陽性肝癌細胞の維持される分子機構の解明に重要であると考え、今回の研究計画を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリアタンパク質のプロセッシングに重要な役割を果たす **PMPCB** 遺伝子に着目し、**PMPCB** 遺伝子の機能解析を行うことにより、幹細胞様の形質を持った肝癌細胞が維持されるメカニズムについて解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1. **PMPCB shRNA** が **EpCAM** 発現に与える影響について検証する。
2. **PMPCB shRNA** によって **EpCAM** 陽性細胞に選択的に細胞死が誘導されるかを検討する。
3. **PMPCB shRNA** による肝癌の縮小効果について肝癌マウスモデルを用いて評価する。
4. **EpCAM** 陽性細胞における **PMPCB** の機能的役割について検討し、**EpCAM** 陽性細胞の **viability** が維持される分子機構について明らかにする。

## 4. 研究成果

### 1. PMPCB shRNA は EpCAM 発現を低下させる

5 種類の PMPCB shRNA をレンチウイルスベクターを用いて EpCAM 陽性の Huh-1 細胞および Huh-7 細胞に感染させたところ、いずれの shRNA を導入した群においても、qRT-PCR および flow cytometry にて EpCAM 発現の有意な低下を認めた。

### 2. PMPCB shRNA によって、EpCAM 陽性細胞に細胞死が誘導され、細胞増殖活性が低下する

1. で使用した細胞株に PMPCB shRNA を導入し、colony formation assay, spheroid formation assay および cell titration assay を施行したところ、PMPCB shRNA が細胞コロニー形成の抑制、スフェロイド形成抑制、細胞増殖の抑制に強く関与していることが判明した。

また、PMPCB shRNA を導入による細胞死の有無について、7-AAD 染色を用いた flow cytometry による解析を行ったところ、EpCAM 陽性の Huh-1, Huh-7 細胞では細胞死が認められたが、EpCAM 陰性細胞である SK-Hep-1 細胞や MHCC97 細胞では細胞死が認められず、PMPCB shRNA は EpCAM 陽性細胞選択的にアポトーシスを誘導していることが示唆された。

### 3. PMPCB shRNA により、in vivo でも肝癌は縮小する

Luciferase 遺伝子を組み込んだ Huh-1-ffluc2 細胞に PMPCB shRNA を導入し、ヌードマウスの皮下に移植して経過観察したところ、コントロール群と比較して Luciferase のシグナルが PMPCB shRNA 導入群で有意に低下していることが in vivo imaging の実験で明らかとなった。また、皮下移植して 8 週後にマウスを sacrifice して腫瘍を解析したところ、PMPCB shRNA 導入群の腫瘍はコントロール群と比較して有意に小さく、TUNEL 染色にて陽性細胞が多いことが判明した。以上より、PMPCB shRNA は EpCAM 陽性肝癌細胞にアポトーシスを誘導し、細胞増殖を抑えることが in vivo の解析でも明らかとなった。

### 4. PMPCB 阻害により引き起こされるミトコンドリア機能低下は活性酸素種の産生を増加させ、FOXO family 分子の活性化を介して beta-catenin の転写活性を阻害する

PMPCB はミトコンドリアプロセシングタンパクであり、PMPCB shRNA によってミトコンドリア機能は低下し、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の過剰産生を引き起こすことを示した。一方、EpCAM は beta-catenin pathway の下流分子であるため、PMPCB shRNA と同分子経路との関連を解析したところ、PMPCB shRNA により beta-catenin 転写活性が阻害されることが分かった。そこで、ROS の増加に伴って活性化する分子である FOXO に着目した。PMPCB shRNA を EpCAM 陽性肝癌細胞に導入すると、リン酸化された活性化した FOXO が核内に移動し、beta-catenin と結合してその転写活性を阻害することが明らかとなった。以上より、PMPCB-shRNA によるミトコンドリア機能低下が ROS の増加を引き起こし、FOXO のリン酸化を促進することで beta-catenin の転写活性を阻害し、EpCAM 陽性細胞における EpCAM 発現低下と細胞増殖の抑制・アポトーシスの亢進に寄与することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Eso Yuji, Takai Atsushi, Taura Kojiro, Takahashi Ken, Ueda Yoshihide, Marusawa Hiroyuki, Seno Hiroshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Association of Mac-2-binding protein glycosylation isomer level with nutritional status in chronic liver disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1649 ~ 1658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuguchi Aya, Takai Atsushi, Shimizu Takahiro, Matsumoto Tomonori, Kumagai Ken, Miyamoto Shin'ichi, Seno Hiroshi, Marusawa Hiroyuki	4. 巻 143
2. 論文標題 Genetic features of multicentric/multifocal intramucosal gastric carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1923 ~ 1934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eso Yuji, Furuta Akihiro, Takai Atsushi, Takahashi Ken, Ueda Yoshihide, Marusawa Hiroyuki, Seno Hiroshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Ultrasound-guided microfoam sclerotherapy with polidocanol for symptomatic giant hepatic cyst: Initial experience	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1055 ~ 1063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eso Yuji, Kou Tadayuki, Nagai Hiroki, Kim Young Hak, Kanai Masashi, Matsumoto Shigemi, Mishima Masako, Arasawa Soichi, Iguchi Eriko, Nakamura Fumiyasu, Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Takahashi Ken, Ueda Yoshihide, Muto Manabu, Seno Hiroshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Utility of ultrasound guided liver tumor biopsy for next generation sequencing based clinical sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 579 ~ 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim Soo Ki, Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Matsumoto Tomonori, Kakiuchi Nobuyuki, Yokoyama Akira, Yoshida Kenichi, Kaido Toshimi, Uemoto Shinji, Minamiguchi Sachiko, Haga Hironori, Shiraishi Yuichi, Miyano Satoru, Seno Hiroshi, Ogawa Seishi, Marusawa Hiroyuki	4. 巻 54
2. 論文標題 Comprehensive analysis of genetic aberrations linked to tumorigenesis in regenerative nodules of liver cirrhosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 628 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01555-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eso Yuji, Takai Atsushi, Takahashi Ken, Ueda Yoshihide, Taura Kojiro, Marusawa Hiroyuki, Seno Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Combination of Mac-2 Binding Protein Glycosylation Isomer and Up-To-Seven Criteria as a Useful Predictor for Child-Pugh Grade Deterioration after Transarterial Chemoembolization for Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 405 ~ 405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11030405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dang Hien, Takai Atsushi, Forgues Marshonna, Pomyen Yotsawat, Mou Haiwei, Xue Wen, Ray Debashish, Ha Kevin C.H., Morris Quaid D., Hughes Timothy R., Wang Xin Wei	4. 巻 32
2. 論文標題 Oncogenic Activation of the RNA Binding Protein NELFE and MYC Signaling in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 101 ~ 114.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccell.2017.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumoto Tomonori, Takai Atsushi, Eso Yuji, Kinoshita Kazuo, Manabe Toshiaki, Seno Hiroshi, Chiba Tsutomu, Marusawa Hiroyuki	4. 巻 77
2. 論文標題 Proliferating EpCAM-Positive Ductal Cells in the Inflamed Liver Give Rise to Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6131 ~ 6143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-1800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eso, Y., Takai, A., Matsumoto, T., Inuzuka, T., Horie, T., Ono, K., Uemoto, S., Lee, K., Edelmann, W., Chiba, T. and Marusawa, H.	4. 巻 76
2. 論文標題 MSH2 dysregulation is triggered by proinflammatory cytokine stimulation and is associated with liver cancer development.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4383-4393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep45605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeda, H., Takai, A., Inuzuka, T. and Marusawa, H.	4. 巻 52
2. 論文標題 Genetic basis of hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma: linkage between infection, inflammation, and tumorigenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 26-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-016-1273-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takai Atsushi, Dang Hien, Oishi Naoki, Khatib Subreen, Martin Sean P., Dominguez Dana A., Luo Ji, Bagni Rachel, Wu Xiaolin, Powell Katie, Ye Qing-Hai, Jia Hu-Liang, Qin Lun-Xiu, Chen Jinqui, Mitchell Gary A., Luo Xiaoling, Thorgeirsson Snorri S., Wang Xin Wei	4. 巻 79
2. 論文標題 Genome-Wide RNAi Screen Identifies PMPCB as a Therapeutic Vulnerability in EpCAM+ Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2379 ~ 2391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-3015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Eso Yuji, Nakano Shigeharu, Mishima Masako, Arasawa Soichi, Iguchi Eriko, Nakamura Fumiyasu, Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Takahashi Ken, Taura Kojiro, Seno Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Dose Intensity/Body Surface Area Ratio is a Novel Marker Useful for Predicting Response to Lenvatinib against Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 49 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12010049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eso Yuji, Shimizu Takahiro, Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Marusawa Hiroyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Microsatellite instability and immune checkpoint inhibitors: toward precision medicine against gastrointestinal and hepatobiliary cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 15 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01620-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Shigeharu, Eso Yuji, Okada Hirokazu, Takai Atsushi, Takahashi Ken, Seno Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Recent Advances in Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 775 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12040775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 竹田治彦、高井淳、金秀基、井口恵里子、荒澤荘一、熊谷健、恵荘裕嗣、清水孝洋、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析を用いた肝硬変再生結節の発癌ポテンシャルの評価
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 井口恵里子、高井淳、上田佳秀、妹尾浩
2. 発表標題 Sulfatase 2-TGFb1-SMADシグナル伝達によるPeriostinの誘導が肝細胞癌において血管新生に寄与する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Takai Atsushi, Dang Hien, Oishi Naoki, Wang Xin Wei
2. 発表標題 Identification of novel cancer driver genes in hepatocellular carcinoma cells by RNAi screening method
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takai Atsushi, Matsumoto Tomonori, Eso Yuji, Kinoshita Kazuo, Chiba Tsutomu, Seno Hiroshi, Marusawa Hiroyuki
2. 発表標題 Characterization of hepatocellular carcinoma based on cellular origins
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Kim Soo Ki, Kakiuchi Nobuyuki, Seno Hiroshi, Ogawa Seishi, Marusawa Hiroyuki
2. 発表標題 Genetic features of hepatocellular carcinoma arising after eradication of hepatitis C virus
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Seno Hiroshi
2. 発表標題 Integrative multi-omics approach to explore novel biomarkers for hepatocarcinogenesis after eradication of hepatitis C virus
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 竹田治彦、高井淳、妹尾浩
2. 発表標題 全ゲノムシーケンス解析を用いた結節内結節型肝癌の病理像とゲノム異常の比較解析
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田治彦、高井淳、荒澤壮一、熊谷健、清水孝洋、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、藤本明洋、妹尾浩
2. 発表標題 結節内結節型肝細胞癌の全ゲノムシーケンス解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井口恵里子、高井淳、熊谷健、荒澤壮一、竹田治彦、恵荘裕嗣、清水孝洋、高橋健、上田佳秀、妹尾浩
2. 発表標題 炎症性肝発癌過程におけるDNAメチル化酵素DNMT3Bの役割
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高井淳、恵荘裕嗣、丸澤宏之
2. 発表標題 肝幹/前駆細胞を起源とした肝発癌メカニズムの解明
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田治彦、高井淳、丸澤宏之
2. 発表標題 肝硬変再生結節に潜在する遺伝子異常が裏付ける肝発癌ポテンシャル
3. 学会等名 第105回日本消化器病学総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takai Atsushi, Marusawa Hiroyuki, Seno Hiroshi, Wang Xin Wei
2. 発表標題 Identification of novel cancer driver genes in Hepatocellular Carcinoma Cells by RNAi screening method
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference on HCC 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----