

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16543

研究課題名(和文) 転移臓器別統合プロファイリングに基づく肝細胞癌転移メカニズムの解明

研究課題名(英文) Establishment of Highly Intrahepatic Metastatic Cell Line of HCC by In Vivo Selection and Investigation of Mechanism by Integrated Microarray Analysis

研究代表者

奥村 雄一郎 (OKUMURA, Yuichiro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20768949

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)：ヒト肝細胞癌細胞株HuH-7-Lucをマウスの脾臓内に注入することで、経門脈的に肝内病巣を形成した。得られた肝腫瘍から癌細胞を分離培養し、脾臓内に再投与する操作を4回繰り返すことにより、高転移能株を樹立した。高肝内転移能株は腫瘍形成率の有意な上昇を認め、細胞増殖能の上昇およびアポトーシス能(13.4% vs 3.4%)、アノキス能の抑制を認めた。親株と高肝内転移能株におけるmRNAおよびmicroRNAの発現変化を遺伝子統合プロファイリングの手法で比較検討し、転移に関わる遺伝子群としてmiR23a-3pおよびVCAN, CXCL12を有効なバイオマーカーとして同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌に対する主な治療法は外科的手術であるが、5年生存率は約40%とその治療成績は極めて不良である。肝細胞癌が予後不良である原因の一つとして、根治的切除しえたとしても術後の肝内転移が高率で起こることが挙げられる。本研究はマウスを用いて人為的に高肝内転移能株を作成し、親株と併せて網羅的遺伝子解析を行うことで治療ターゲットの同定を試み、その結果有望なmRNAおよびmiRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the mechanism of intrahepatic metastasis in HCC. Highly intrahepatic metastatic HCC cell line (HuH-7) was established by in vivo selection using trans-portal vein metastatic model. After tumor dissociation and expansion in culture, the resulting cell populations were subjected to the next cycle. After 4 cycles, highly intrahepatic metastatic cell and parent cell were compared in vitro and in vivo. Proliferative potential was increased and apoptosis was suppressed (13.4% vs 3.4%). In addition, tumorigenesis was exacerbated. Subsequently, integrated microarray analysis was performed to identify the target molecules. Integrated expression profiling of miRNA and mRNA was analysed. As a result, miR23a-3p was selected as a target miRNA; VCAN and CXCL12 were selected as target mRNAs.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 肝内転移 転移メカニズム In vivo selection 統合プロファイリング 網羅的遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌に対する主な治療法は外科的手術であるが、5年生存率は約40%とその治療成績は極めて不良である。肝細胞癌が予後不良である原因の一つとして、根治的切除しえたとしても術後の肝内転移が高率で起こることが挙げられる。以前、われわれは患者検体を用いた網羅的遺伝子発現解析によって肝細胞癌肝内転移に関する遺伝子セットを同定した (Yoshioka S, et al. *Eur J Cancer* 2009)。しかし肝細胞癌の肝内転移に関しては分子生物学的な制御機序ならびに治療標的化を含めていまだ不明な点が多い。具体的な治療ターゲットを同定するために今回は *In vivo selection* の手法に着目した。これは癌細胞株を特定の臓器を対象として人為的に高転移能化することによってその臓器への転移に関わる特有の遺伝子変化を惹起・同定する手法であり、転移メカニズムの解明に有用とされている (Tominaga N, et al. *Nat Commun* 2015)。さらに網羅的遺伝子発現解析を融合して解析を行う統合プロファイリングにより mRNA と microRNA の標的制御の逆相関関係から遺伝子の絞り込みを行い、転移機序の解明や治療標的の絞り込みがより確実になることが期待された。

2. 研究の目的

In vivo selection を用いて肝細胞癌高肝内転移能細胞株を樹立し、遺伝子統合プロファイリングによって肝細胞癌肝内転移に関する新規治療標的を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高肝内転移能株の樹立

初めに *In vivo selection* によって高肝内転移能株の樹立を行った。日本細胞バンクから購入したヒト肝細胞癌細胞株 HuH-7-Luc を用い、免疫不全マウスである SCID/Beige マウスの脾臓内に注入することで、経門脈的に肝内に転移病巣を形成した。*In vivo imaging system* を用いて腫瘍形成を経時的に評価した。得られた肝腫瘍から癌細胞を分離培養し脾臓内に再投与する操作を4サイクル繰り返して行うことにより、高肝内転移能株を樹立した。

(2) 高肝内転移能株の評価

高肝内転移能株の形態変化、増殖能、浸潤能、遊走能、腫瘍形成率などについて親株と比較検討を行った。アポトーシスについてもフローサイトメトリーによる Annexin V アッセイにより検討し、さらにアノキスについても検討した。

(3) 遺伝子統合プロファイリング

親株と高肝内転移能株における mRNA および microRNA の発現変化を網羅的遺伝子解析によって比較検討し、さらに公開データベースの情報を付加した上で実験系に関連する機能遺伝子の絞り込みを行うことで転移に関わる遺伝子群の同定・解析を行った。

4. 研究成果

(1) 高肝内転移能株の樹立

In vivo selection を繰り返すことによって高肝内転移能株の樹立を行った(図1)。4サイクルを繰り返すことで生着率は漸増し、33%、50%、67%、88%まで上昇した(図2.A)。多発性結節の数、大きさは増大し、組織学的評価では4サイクル後の腫瘍ではN/C比の上昇、分化度の低下を認めた。また、4サイクル後の腫瘍では正常組織内の門脈内に viable な腫瘍塊を認めた。臨床的な門脈内腫瘍栓と類似した像であり経門脈的な腫瘍浸潤の亢進を示唆する所見であると考えられた(図2.B)。

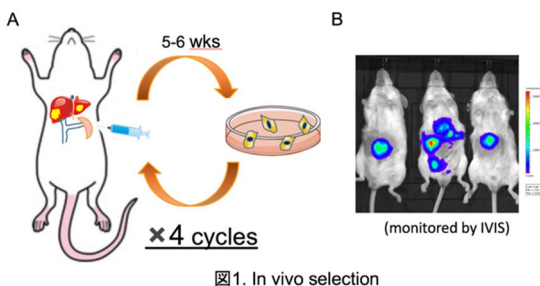


図1. *In vivo selection*

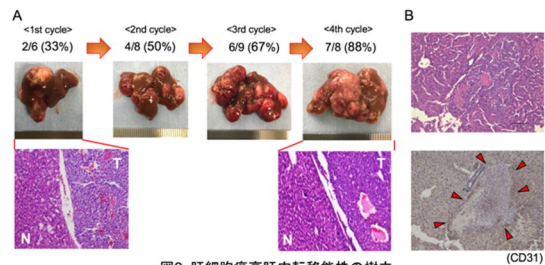


図2. 肝細胞癌高肝内転移能株の樹立

(2) 高肝内転移能株の評価

親株と、樹立した高肝内転移能株を用いて、*in vitro* および *in vivo* で転移能を比較検討した。高肝内転移能株として clone A, clone B の2系統を用いた。はじめに親株と比較して細胞

増殖能の有意な上昇を認めた(図 3). 一方で遊走能, 浸潤能については親株と樹立した高肝内転移能株細胞株間に有意な差を認めなかった(図 4). 血管内皮遊走能および上皮間葉移行マーカー(E-Cadherin, N-Cadherin, Snail, Vimentin), 癌幹細胞マーカー(CD13, CD133)の発現に関しても同様に, 親株と樹立した高肝内転移能株細胞株間に差を認めなかった.

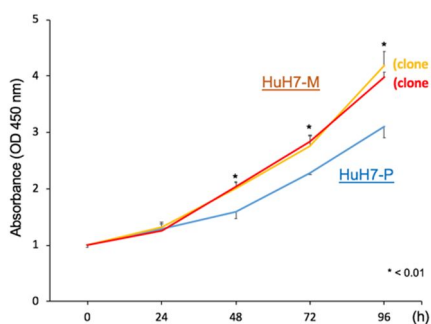


図3. 親株と高肝内転移能株における増殖能の比較

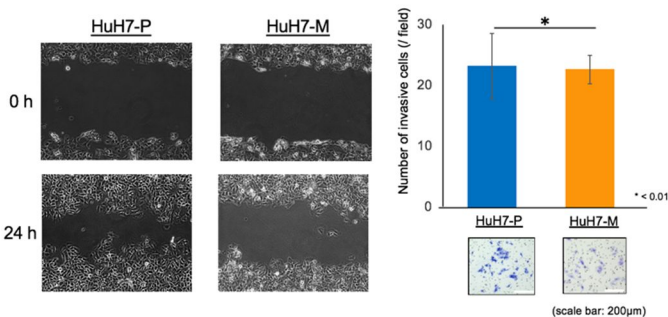


図4. 親株と高肝内転移能株における遊走能, 浸潤能の比較

一方で高肝内転移能細胞株においてアポトーシス能の抑制(13.4% vs 3.4%)(図 5) およびアノキス能の抑制(図 6)を認めた.

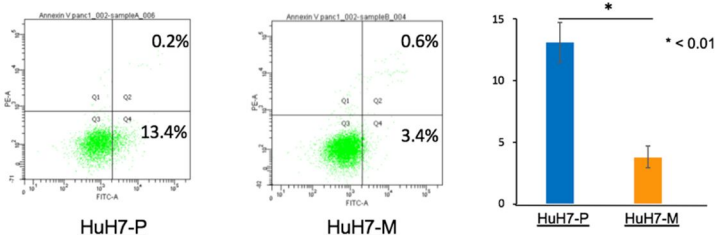


図5. 親株と高肝内転移能株におけるアポトーシス能の比較

In vivoにおける腫瘍形成能を同時並列投与で比較した. はじめに肝臓直接投与モデルでの検討を行なったが腫瘍の生着を認めなかった. 次に癌細胞株を脾臓内に注入する際に直後に脾臓を摘出するモデルを用いて腫瘍形成率を比較したところ, 親株では0% (0/9 匹)の腫瘍形成率であったのに対して, 樹立した高肝内転移能株においては67% (6/9 匹)と腫瘍形成率の有意な上昇を認めた.

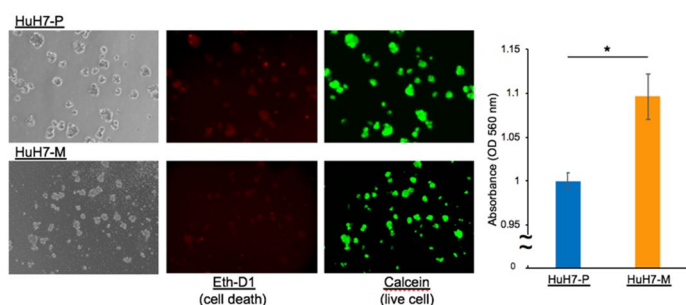


図6. 親株と高肝内転移能株におけるアノキス能の比較

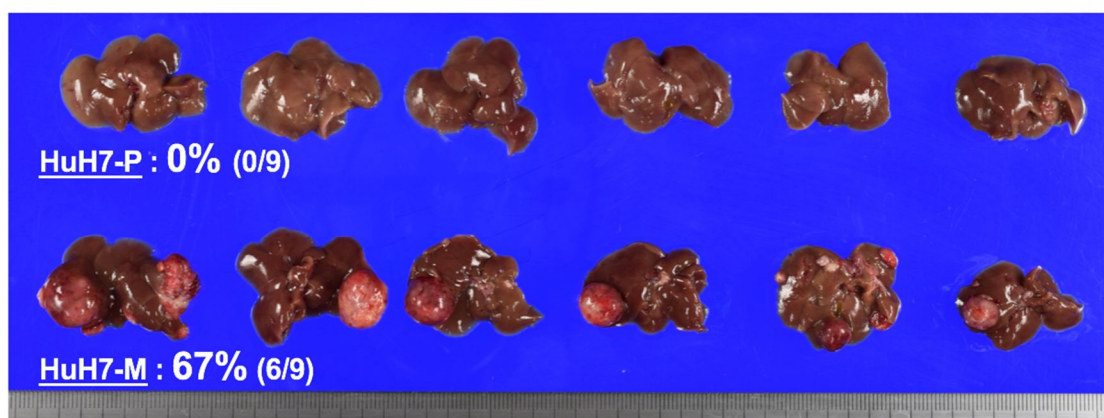


図7. 親株と高肝内転移能株における腫瘍形成能の比較

(3) 遺伝子統合プロファイリング

親株と高肝内転移能株における mRNA および microRNA の発現変化を遺伝子統合プロファイリングの手法で比較検討し, 肝内転移に関わる遺伝子群の同定および解析を行った. miRNA の発現比 1.5 倍以上もしくは 0.67 倍以下を cut off とし, かつ発現量絶対値が 100 を超えるものをターゲット候補の miRNA としてピックアップした. その結果, 親株と比較して高肝内転移能株で発現上昇していた miRNA を 3 個, 発現低下していた miRNA を 32 個抽出した. miRNA の発現変化と逆相関となっている mRNA 候補を同定し, さらに TargetScan, Pictar, miRDB などの公開データベースの情報を付加することで絞り込みを行った上で, 実験系に関連する機能遺伝子としてアポトーシス, アノキス関連の遺伝子を抽出した.

遺伝子統合プロファイリングの結果, miRNA の変動と逆相関関係にある mRNA の組み合わせと

して、miR23a-3p および VCAN, CXCL12 を有効なバイオマーカーとして同定した。miR23a-3p は胃癌, 大腸癌, 肝細胞癌などにおいて oncogenic miRNA として報告があり有望な候補であると考えられた。現在, 親株と高肝内転移能株細胞株間におけるエクソソーム中の遺伝子発現変化についても同様の解析を追加検討中である。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Okumura Y, Noda T, Eguchi H, Hanaki T, Iwagami Y, Akita H, Asaoka T, Gotoh K, Kobayashi S, Umeshita K, Mori M, Doki Y. Pure laparoscopic liver resection for giant liver hemangioma with extrahepatic growth based on preoperative 3-dimensional simulation: A case report. *Surgical Case Reports*. 2019.5:51 (査読あり)

2. Okumura Y, Noda T, Eguchi H, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Kawamoto K, Gotoh K, Kobayashi S, Umeshita K, Hashimoto Y, Takeda Y, Tanemura M, Shigekawa M, Morii E, Takehara T, Mori M, Doki Y. Middle segment pancreatectomy for a solid serous cystadenoma diagnosed by MRCP and review of the literature: A case report. *Molecular and Clinical Oncology*. 2018.(8):675-682 (査読あり)

3. Okumura Y, Noda T, Eguchi H, Sakamoto T, Iwagami Y, Yamada D, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Kobayashi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Hypoxia-Induced PLOD2 is a Key Regulator in Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Biliary Tract Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2018.25(12):3728-3737 (査読あり)

4. Okumura Y, Eguchi H. ASO Author Reflections: Hypoxia-Induced PLOD2 is a Key Regulator in Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Biliary Tract Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2018.25(12):3738-3739 (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 奥村雄一郎, 野田剛広, 江口英利, 岩上佳史, 山田大作, 浅岡忠史, 川本弘一, 後藤邦仁, 小林省吾, 土岐祐一郎, 森正樹 In vivo selectin を用いた肝細胞癌肝内転移に関する高転移能株の樹立と転移メカニズムの解明 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018

2. 奥村雄一郎, 野田剛広, 江口英利, 岩上佳史, 山田大作, 浅岡忠史, 川本弘一, 後藤邦仁, 小林省吾, 土岐祐一郎, 森正樹 Establishment of highly intrahepatic metastatic cell line of HCC by in vivo selection, investigation of metastatic mechanism, and identification 第 30 回日本肝胆膵外科学会学術集会 2018

3. 奥村雄一郎, 野田剛広, 江口英利, 岩上佳史, 山田大作, 秋田裕史, 浅岡忠史, 後藤邦仁, 小林省吾, 土岐祐一郎, 森正樹 In vivo selection を用いた肝細胞癌高肝内転移能株の樹立, および転移メカニズムの解明 第 54 回日本肝臓学会総会 2018

4. 奥村雄一郎, 野田剛広, 江口英利, 岩上佳史, 秋田裕史, 浅岡忠史, 後藤邦仁, 小林省吾, 土岐祐一郎, 森正樹 In vivo selection を用いた肝細胞癌高肝内転移能株の樹立および統合アレイによる転移メカニズムの解明 第 77 回日本癌学会学術総会 2018

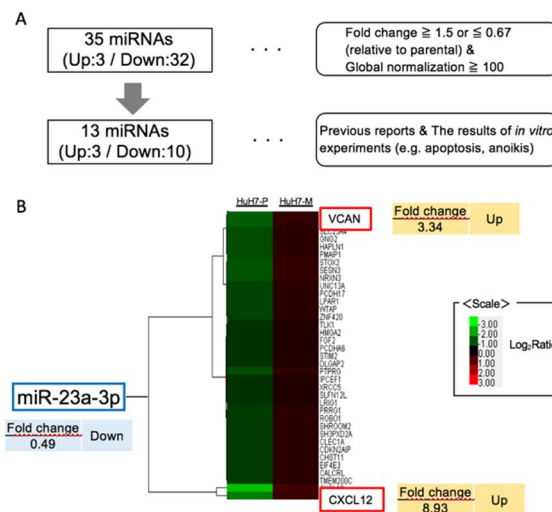


図8. 遺伝子統合プロファイリングによるターゲットの同定

図8. 遺伝子統合プロファイリングによるターゲットの同定 (査読あり)

5. Okumura Y., Noda T., Eguchi H., Iwagami Y., Akita H., Asaoka T., Wada H., Kawamoto K., Gotoh K., Kobayashi S., Doki Y., Mori M. Establishment of Highly Intrahepatic Metastatic Cell Line of HCC by In Vivo Selection and Investigation of Mechanism by Integrated Microarray Analysis American College of Gastroenterology Premier GI Clinical Meeting 2018

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：なし

所属研究機関名：なし

部局名：なし

職名：なし

研究者番号(8桁)：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：野田剛広，江口英利，岩上佳史，山田大作，秋田裕史，浅岡忠史，川本弘一，後藤邦仁，小林省吾，森正樹，土岐祐一郎

ローマ字氏名：Takehiro Noda, Hidetoshi Eguchi, Yoshifumi Iwagami, Daisaku Yamada, Hirofumi Akita, Tadafumi Asaoka, Koichi Kawamoto, Kunihito Gotoh, Syogo Kobayashi, Masaki Mori, Yuichiro Doki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。