

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号： 13401  
 研究種目： 基盤研究（B）  
 研究期間： 2010～2012  
 課題番号： 22390149  
 研究課題名（和文） 肝微小環境において炎症性発がんを制御する antagomir の標的創薬と前臨床試験  
 研究課題名（英文） Research of innovative development of antagomirs regulating inflammation-associated carcinogenesis in hepatic microenvironment  
 研究代表者  
 中本 安成（NAKAMOTO YASUNARI）  
 福井大学・医学部・教授  
 研究者番号： 40293352

研究成果の概要（和文）： 慢性肝炎から肝細胞がん（肝がん）に至る微小環境において、マイクロ RNA に対して制御効果を発揮する核酸分子（antagomir）の標的創薬を目的とした。B 型慢性肝炎モデルで同定された 8 個のマイクロ RNA について、経時的肝組織における発現解析、形質転換作用の検討、宿主遺伝子の発現調節作用、がん化に関わる分子病態における評価を実施した。これより、本研究のマイクロ RNA が肝がんを制御する antagomir 創薬における標的となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： The current study was designed to develop antagomirs, anti-microRNA oligonucleotides, regulating inflammation-associated carcinogenesis in hepatic microenvironment. Eight of microRNAs identified in a unique mouse model of chronic hepatitis B were evaluated for the expression profiles in the serial samples of liver tissues, the transformation of cell lines, the effects on expression of host genes, the relation to gene expression profiles during hepatocarcinogenesis. Collectively, these microRNAs were suggested to be targets in the development of antagomirs for hepatocellular carcinoma.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野： 医歯薬学

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： 癌、遺伝子、核酸、動物、内科

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス肝炎に対して最先端の抗ウイルス治療が施されているにもかかわらず、我が国には慢性肝炎患者（B型、C型）が 200 万人以上存在し、毎年 3 万 5 千人が肝細胞がん（肝がん）により死亡している。肝がんの制

御が困難である最大の要因は、慢性肝炎における炎症反応が発がんポテンシャルを亢進しており（炎症性発がん）、この活性を特異的に低下させる治療法が確立していないことである。さらに発がん過程が多段階的で多因子が複雑に関与していることは、標的分子を絞り込んだ抗がん治療の開発を困難なも

のとしている。

**【標的分子としてのマイクロRNA】**2006年ノーベル医学生理学賞に輝いた発見として、遺伝子の読み枠 (ORF) 以外に存在する non-coding RNA 分子の存在が明らかとなった。そのうち2塩基程度の短い一本鎖のマイクロRNA (miRNA) 分子が600個ほど存在し、ヒト全遺伝子 (3万個以上) の1/3を制御するものと予想された (Cell 136:642,2009)。これより、個々の遺伝子 (メッセンジャーRNA) を標的とした従来法に比べて、有用なマイクロRNAを選択すれば多数の遺伝子 (群) を一元的に制御することが可能となり、新たな概念に基づく標的治療として期待されている (Nature Cell Biol. 11:228,2009)。さらに、マイクロRNAを生体内で抑制する核酸分子 (antagomir) を合成する技術の進歩によって、臨床応用に至るプロセスが急激に加速している (Nature Rev. Genet. 10:578,2009)。

**【がん微小環境を制御する標的創薬】** 応募者は平成19~21年度の基盤研究 (B) において慢性肝炎の病態に即したモデル系 (Nakamoto et al.: J. Exp. Med. 188:341, 1998) を用いて慢性肝炎から発がんに至る過程 (前がん状態) で特異的に変動する157個の遺伝子を明らかにした。これらは肝炎の急性期や肝がん組織にみられる遺伝子群とはほとんど重複を認めない特徴的なものであった。さらに、詳細な経時的解析から同時期に発現が変化する8個のマイクロRNAを同定した。このうち miR-21, miR-101, miR-126, miR-146, miR-148, miR-194 分子は、国内外で報告された患者肝組織での最新の検討結果と一致しており発がん病態への関与が強く示唆された (Cell 137:586,2009 他)。しかし、詳細な機序は不明のままであり創薬開発も未だごく初期の段階に止まっている。その原因について、従来のがん細胞 (株) を用いた機能解析では、正常細胞ががん化に至る微小環境の影響が考慮されなかったことが指摘される (Nature 454:436,2008; J. Clin. Oncol. 26:4497, 2008)。つまり、がんの微小環境においてはがん細胞を取り巻く種々の分子、細胞が複雑に関わっており、特に炎症性発がんでは免疫細胞との相互作用が深く関与している (Cell 136:26,2009)。

そこで、炎症性発がんの病態に基づいて構築した実験系 (Nakamoto et al.: J. Exp. Med. 196:1105,2002; Cancer Res. 64:3326,2004; J. Immunol. 178:574,2007; J. Immunol. 183:3053,2009 他) を駆使して、がんの微小環境において治療効果を示す antagomir を

創薬する本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

肝臓の炎症性発がんにおける8個のマイクロRNA (上記の他、miR-24, miR-31) の作用を、独自に開発した慢性肝炎モデルが構築する分子病態の中で評価し、がん化の微小環境における役割を *in vitro* 及び *in vivo* の実験系を組み合わせることで機能的に解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) マイクロRNAの発現解析

肝炎の発症から18ヵ月間の経過で肝がんを発生するB型肝炎ウイルス (HBV) トランスジェニックマウス慢性肝炎モデル

(Nakamoto et al.: Cancer Res. 64:3326, 2004) の発がん過程で検出された8個のマイクロRNA分子 (miR-21, 24, 31, 101, 126, 146, 148, 194) について、Real-time 定量的RT-PCR法 (7900HT Fast; ABI社) を用いて、肝組織における経時的な発現レベルの変化を定量した。

### (2) 形質転換作用の検討

培養細胞株 (ヒト肝由来; HepG2, TTNT16) において、マイクロRNA やそのインヒビター (ともにABI社) を用いた際の形質変化 (細胞増殖など) を観察した。

### (3) 宿主遺伝子の発現調節作用の検討

(2) で用いた細胞株において8個のマイクロRNAの発現と関連する宿主遺伝子の変動を検討した。対象とする宿主遺伝子は、炎症性発がん過程において特異的に変動することが示唆されている157個とした。

### (4) がん化に関わる分子病態における評価

慢性肝炎モデルでのマイクロRNAの発現レベルが亢進する前がん状態からがん化に至る時期 (肝炎発症後15ヵ月目以降) において、特異的に変動する肝組織の遺伝子 (群) の発現プロファイルをDNAチップ (Agilent社) およびReal-time 定量的RT-PCR法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

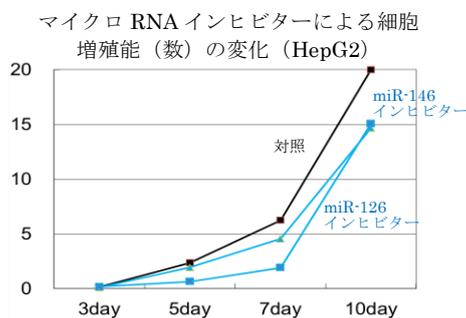
### (1) マイクロRNAの発現解析

慢性肝炎モデルにおける経時的な発現レベルの変化を定量すると、肝炎発症15ヵ月目から著明な発現の亢進を認めて18ヵ月目に肝がんを発症した。これより、発がん過

程においてマイクロ RNA の変化ががん化に先導しており、促進的に作用している可能性が示唆された。

### (2) 形質転換作用の検討

マイクロ RNA の機能的解析を行う目的で、培養細胞株のマイクロ RNA 発現量を検討したところ、肝組織に比較して著明な高発現をみた。これは当初に計画したマイクロ RNA の導入法による機能解析が困難であることを示唆した。そこで、インヒビターを用いることによる抑制実験を施行したところ、2つのマイクロ RNA の発現が抑制され細胞増殖が低下した。これより、マイクロ RNA が機能的に細胞増殖を促進していた可能性が示された。

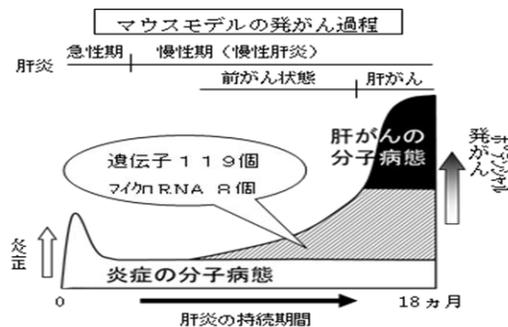


### (3) 宿主遺伝子の発現調節作用の検討

(1)(2) で顕著な変動を示した2つのマイクロ RNA 分子について、インヒビターを用いて培養細胞株での宿主遺伝子の発現レベルを定量した。その結果、2つの宿主遺伝子 (GSTA2, APOA4) に対する制御作用が明らかになった。マイクロ RNA はこれらの宿主遺伝子の発現レベルを調節することによって、がん化に作用したことが示唆された。

### (4) がん化に関わる分子病態における評価

慢性肝炎モデルのがん化過程における網羅的発現遺伝子研究との比較解析を行ったところ、119個の遺伝子(群)からなるがん化特異的な分子病態とマイクロ RNA との新たな関連性が示唆され、さらなる検討の必要性が示された。



これより、肝臓における炎症性発がんの分子病態を構築するマイクロ RNA が明らかになり、それらが機能的に宿主遺伝子への制御作用を發揮して肝細胞の悪性転化に関与する機構が示唆された。さらに、本研究のマイクロ RNA が antagomir の創薬における標的となる可能性が示された。

### 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 22 件)

1. Matsuda H, Ito Y, Suto H, Yamakawa A, Satomi S, Ohtani M, Yamazaki Y, Kusaka Y, Shimabukuro Y, Kikuchi K, Keida Y, Azuma T, Nakamoto Y: Clinical relevance and sequence analysis of the Helicobacter pylori dupA region from two areas in Japan with different gastric cancer risks. *Immuno-Gastroenterology* 1:2, 127-135, 2012 (査読有)  
<http://www.stmconnect.com/ig>
2. Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, Tsuchiyama T, Iida N, Kagaya T, Sakai Y, Naito M, Mukaida N, Kaneko S: Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 19: 312-319, 2012 (査読有)  
doi: 10.1038/cgt.2012.3.
3. Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A: Nucleostemin in Injury-Induced Liver Regeneration. *Stem Cells Dev.* 21: 3044-3054, 2012 (査読有)  
doi: 10.1089/scd.2011.0725.
4. Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y: Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol. Res.* 42: 523-542, 2012 (査読有)  
doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00981.x.
5. Matsunaga A, Ikawa M, Fujii A, Nakamoto Y, Kuriyama M, Yoneda M: Hashimoto's encephalopathy as a treatable adult-onset cerebellar ataxia mimicking spinocerebellar degeneration. *Eur. Neurol.* 69: 14-20 2013 (査読有)  
doi: 10.1159/000342217.

6. Ikawa M, Arakawa K, Hamano T, Nagata M, Nakamoto Y, Kuriyama M, Koga Y, Yoneda M: Evaluation of systemic redox states in patients carrying the MELAS A3243G mutation in mitochondrial DNA. **Eur. Neurol.** 67: 232-237, 2012 (査読有)  
doi: 10.1159/000336568.
7. Yamashita T, Kaneko S: Treatment strategies for hepatocellular carcinoma in Japan. **Hepatol. Res.** 43: 44-50. 2013 (査読有)  
doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01029.x.
8. Okada H, Honda M, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S: Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. **CANCER RES.** 72: 4459-4471, 2012 (査読有)  
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0028.
9. Oishi N, Kumar MR, Roessler S, Ji J, Forgues M, Budhu A, Zhao X, Andersen JB, Ye QH, Jia HL, Qin LX, Yamashita T, Goo Woo H, Jun Kim Y, Kaneko S, Tang ZY, Thorgeirsson SS, Wei Wang X: Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. **HEPATOLOGY** 56:1792-1803. 2012 (査読有)  
doi: 10.1002/hep.25890.
10. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. **Clin. Exp. Immunol.** 163: 165-177, 2011 (査読有)  
doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04246.x.
11. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S: Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. **HEPATOLOGY** 53: 1206-1216, 2011 (査読有)  
doi: 10.1002/hep.24149.
12. Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Arihara F, Kitahara M, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S: Frequency of CD45RO+ subset in CD4+CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett.** 307: 165-173, 2011 (査読有)  
doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.029.
13. Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group: Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. **GASTROENTEROLOGY** 141: 128-140, 2011 (査読有)  
doi: 10.1053/j.gastro.2011.03.051.
14. Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: Randomized, phase II study comparing interferon combined with hepatic arterial infusion of fluorouracil plus cisplatin and fluorouracil alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma. **Oncology** 81: 281-290, 2011 (査読有)  
doi: 10.1159/000334439.
15. Kakinoki K, Nakamoto Y, Kagaya T, Tsuchiyama T, Sakai Y, Nakahama T, Mukaida N, Kaneko S: Prevention of intrahepatic metastasis of liver cancer by suicide gene therapy and chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. **J. Gene Med.** 12: 1002-1013, 2010 (査読有)  
doi: 10.1002/jgm.1528.
16. Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Nakagawa H, Mizukoshi E, Naito M, Mukaida N and Kaneko S: Antitumor effect after radio-frequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of cc chemokine ligand 3/macrophage inflammatory protein-1alpha. **CANCER RES.** 70: 6556-6565, 2010 (査読有)  
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0096.
17. Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group: Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. **Biochem Biophys Res Commun.** 400: 7-15, 2010 (査読有)  
doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.123.
18. Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S: Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. **CANCER RES.**

- 70: 4687-4697, 2010 (査読有)  
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4210.
19. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group: Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. **GASTROENTEROLOGY** 139: 499-509, 2010 (査読有)  
doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.049.
  20. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. **Int. J. Cancer** 126: 2164-2174, 2010 (査読有)  
doi: 10.1002/ijc.24882.
  21. Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, Li YY, Baba T, Kaneko S, Fujii C, Mukaida N: Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in the liver. **Oncogene** 29: 2228-2237, 2010 (査読有)  
doi: 10.1038/onc.2009.504.
  22. Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S: A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. **CELL METAB.** 12: 483-495, 2010 (査読有)  
doi: 10.1016/j.cmet.2010.09.015.
- [学会発表] (計 6 件)
1. Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: MicroRNA Dynamics in Precancerous Lesions in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. **第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts, U.S.A.):** Hepatology 56 (4, Suppl.) 315A; 一般; oral: Nov. 13, 2012.
  2. Naito T, Nemoto T, Matsuda H, Ohtani M, Suto H Nakamoto Y: High Incidence of HBV Reactivation after R-CHOP and CHOP Regimens among Patients Treated with Six Immunosuppressive Chemotherapies. **第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts, U.S.A.):** Hepatology 56 (4, Suppl.) 643A; 一般; poster: Nov. 11, 2012.
  3. Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: Differential Dynamics of the NF-kappaB subunits RELA and RELB in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. **第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California, U.S.A.):** Hepatology 54 (4, Suppl.) 1300A; 一般; poster: Nov. 8, 2011.
  4. Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase of CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma and its impact for prognosis of patients. **第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California, U.S.A.):** Hepatology 54 (4, Suppl.) 1400A; 一般; poster: Nov. 8, 2011.
  5. Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: #1725; NFkB activation precedes dynamics of oxidative stress-related procarcinogenic signalings in a mouse model of chronic hepatitis B.; **第61回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts, U.S.A.):** Hepatology 52 (4, Suppl.) 935A; 一般; poster: Nov. 1, 2010.
  6. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Dendritic Cell Transfer during Locoregional Treatments Induces Prolonged Recurrence-Free Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma.; **International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa "Cancer and Host Response" (Satellite Symposium of 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology - Kanazawa, Japan):** Abstract p33-34; session; oral: Aug. 29, 2010.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
中本 安成 (NAKAMOTO YASUNARI)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号：40293352
  - (2) 研究分担者  
山下 太郎 (YAMASHITA TARO)  
金沢大学・大学病院・助教  
研究者番号：90377432