

## 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 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590718

研究課題名（和文）肝特異 microRNA の機能解析とその発現制御による効率的肝細胞分化誘導法の開発

研究課題名（英文）Analyses of liver-specific miRNA function and the development of the strategy about the efficient induction of differentiation into hepatocytes

研究代表者

近藤 祐嗣 (Kondo Yuuji)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00572231

研究成果の概要（和文）：

miR122 は肝細胞特異的に発現する microRNA であり、かつ肝臓でその発現が落ちているなどの背景から、肝細胞を正常な肝細胞として維持する機能をもつ。miR122 のノックダウンによって AFP の発現が増加し、肝細胞の脱分化が起きていた。miR122 の低下によって CUX1 という標的転写因子の発現が増すが、CUX1 は癌細胞の悪性化に関わっていることが報告されており、miR122 の発現低下が肝臓細胞の悪性度を増すとともに AFP の産生を増やしていることが示唆された。この所見は臨床的にしばしば観察される AFP 高発現の肝臓癌の予後が悪いことを分子生物学的に説明したものである。

研究成果の概要（英文）：

Liver specific miR122 is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma (HCC). Knockdown of miR122 induces AFP expression, indicating the de-differentiation of hepatocytes. Decreased miR122 expression leads to the increased expression of CUX1, a transcriptional factor, which is related with the aggressiveness of HCC. From these results, decreased miR122 results in the AFP expression and aggressiveness of HCC, which is a molecular explanation about the clinical poor prognosis of HCCs with high AFP expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
24 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：肝臓学, microRNA, 分化, 肝細胞

## 1. 研究開始当初の背景

本研究開始時は、microRNA 研究がようやく一般に広まりつつある時期であり、肝臓における microRNA の機能的意義を明らかにする必要があった。また iPS 細胞をはじめとす

る他の細胞からの肝細胞分化の方法を開発することも大きなニーズとなっていた。蛋白質をコードしていない non-coding RNA の一種である miR は、ゲノムから転写後、特異的な酵素によってヘアピン型の前駆体から短

い二重鎖に切断されたのち、そのうちの一本が配列の類似性に依存して標的遺伝子の3'非翻訳領域(3'-UTR)に作用し、標的 mRNA の分解や翻訳抑制によって、その標的遺伝子の発現を抑制する。miRNA は現在 2,000 種類ほど報告されているが、肝臓にほぼ特異的に発現している miR122 は、悪性度の高い肝臓がんで発現抑制されていることが多いと報告されていた。

## 2. 研究の目的

上記の背景のもとに、本研究では肝細胞に特異的に発現していると言われている microRNA122 に注目した。肝細胞内の全 microRNA の 80%以上を占めている miR122 は肝細胞特異的に発現する microRNA であり、かつ肝癌でその発現が落ちているなどの背景から、肝細胞を正常な肝細胞として維持する機能を有している可能性が考えられる。そこで、miR122 の肝細胞分化に与える生理機能を *in vitro* で miR122 過剰発現系・ノックダウン系と miR122 の機能的ノックアウトマウスにより *in vivo* で解明し、特に miR122 による細胞内情報伝達系への影響と肝機能維持と肝細胞分化に寄与する機構についての結果を効率的な肝再生療法確立の一助として演繹することを最終的な目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) レンチウイルスを用いた miR122 機能的ノックダウンおよび miR122 過剰発現細胞株の樹立: ① miR122 に対する anti-sense 配列 RNA を H1 promoter 下に発現するレンチウイルスを作製しこれを肝細胞株に感染させ miR122 の機能をノックダウンした stable cell line を樹立した。miR122 の機能については luciferase 遺伝子の下流 5'UTR に miR122 の標的配列を組み込んだレポーターコンストラクトを作製し transfection することで luciferase の発光を定量することにより確認した。② 反対に過剰発現系については、miR122 の precursor を CMV promoter 下に発現するコンストラクトを作製しレンチウイルスに組み込んで発現した。

(2) miR122 の機能的ノックアウトマウスの作製: 上記の miR122 の anti-sense を発現するコンストラクトを切り出し、マウスゲノムに組み込んで transgenic mouse を作製した。これにより機能的に miR122 をノックダウンした mouse を樹立し、*in vitro* で解明した miR122 の機能を *in vivo* で検証するためのモデルとした。

(3) miR122 の発現変化に伴う細胞内シグナル伝達系の変化と機構の解明: *In vitro*, *in vivo* の検討から miR122 が惹起するシグナル伝達系を検討した。

(4) iPS 細胞からの肝細胞分化: microRNA の強制発現・ノックダウンによる iPS 細胞からの肝細胞分化法の検証のための基礎データを蓄積した。

## 4. 研究成果

(1) miR122 を比較的高レベルに発現しているヒト肝臓がん細胞株 Huh7 に、ウイルスベクターでアンチセンスの miR122 を発現するコンストラクトを導入した。アンチセンスの miR122 は細胞内で成熟し、内在性の miR122 に相補的に結合し機能を抑制することで、miR122 の機能をノックダウンする。この系を用いて細胞の形態変化や増殖能を調べたところ、細胞増殖は変わらなかったが、多数の偽足を出して活発な移動能を示した。また細胞分化との関連を調べるため、肝細胞マーカーの発現を検討したところ、 $\alpha$ 1-アンチトリプシンや Hepatocyte Nuclear Factor-4 (HNF4) などの肝特異因子の発現量に変化は見られなかったが、コントロール細胞に比較して AFP の著明な発現増加が確認された。

AFP の発現と miR122 の発現と肝臓がんの悪性度との三つ巴の相関は、臨床検体でも認められた。すなわち肝臓がんのグレードが進むとともに miR122 の発現は減弱し、それと反比例して AFP 発現の著明な亢進が捉えられた。さらに、miR122 機能抑制肝がん細胞をヌードマウスの肝被膜下に移植する実験でも、コントロール細胞移植では少ない血管への細胞浸潤が見られた。

これらの結果から、miR122 の発現が低下した肝がん細胞では AFP の発現が亢進すること、またそうした細胞では移動能や侵襲性が増し、がんの悪性度が亢進することが示唆された。

miR122 機能を抑制した肝がん細胞では、培養上清中の AFP 濃度がコントロール細胞と比較して増加しており、細胞質内での AFP mRNA レベルは 10 倍にも達していた。これらの結果から通常考えられるのは、miR122 のターゲットが AFP mRNA の 3' UTR であり、何らかの原因で miR122 の機能が低下することによって miR122 による AFP mRNA の発現抑制が解除されて発現が亢進してくるのではないかと、いうことである。ところが AFP mRNA の 3' -UTR 内には miR122 が標的とする配列はコンピューターサーチ上 存在せず、miR122 が AFP mRNA を直接標的とする可能性は低いことが示唆された。

次に「miR122 の標的遺伝子は何か」ということが問題となった。AFP が miR122 の直接標的でないとする、miR122 が何らかの因子の発現を制御し、間接的に AFP の発現に関与していると考えられる。そこで、数ある miR122 標的因子のなかで特に遺伝子の発現制御に関わることが想定される「転写因子」

に注目して miR122 標的因子候補を再検索した。そこで浮かび上がってきたのが CUX1 という遺伝子であった。

CUX1 はもともとと腫瘍の悪性化に関わる因子と指摘されており、細胞移動や細胞侵襲に密接に関連する small GTPase の RhoA 活性化などを通じて、がんの転移を促進するとすでに報告されていた。しかもこの転写因子は、転写を正にも負にも制御することのある因子であった。さらにこの検索の最中に、別のグループから「CUX1 が miR122 の標的因子である」ということが報告され、miR122 が CUX1 を標的としていることが図らずも裏付けられる結果となった。

そこで実際にウイルスベクターで small hairpin RNA (shRNA) を導入して CUX1 を抑制すると、AFP を高発現している肝がん細胞で AFP の減少が確認された。したがって、miR122 の発現低下ないしは機能阻害によって、標的因子 CUX1 の発現が増えると、AFP の発現が増えると同時に、CUX1 による RhoA 活性化などを通じてがんの悪性度が増すことが示唆された。

CUX1 が AFP の promoter に作用して転写を直接負に制御するとすれば話は単純だったが、種々検討をしたものの CUX1 が AFP の promoter に作用する証拠が得られなかった。そこで、AFP の promoter に作用する転写因子の側からアプローチをすることにした。AFP の転写抑制因子としてはすでに p53 や  $\beta$ -カテニンが知られていたが、それらとともに、AFP の新たな転写抑制因子としてジンクフィンガー蛋白質 ZBTB20 が 2008 年に米国科学アカデミー紀要に報告されており、その研究グループに教えを頂きながら、miR122 抑制におけるこれらの転写因子の発現変化を検討した。その結果、miR122 発現抑制ヒト肝臓がん細胞でこれらの因子の発現動態を見ると p53 と  $\beta$ -カテニンの発現はコントロール細胞とほぼ同等で特筆すべき変化は見られなかったが、ZBTB20 の発現が著明に減少していることが判明した。

次に、CUX1 と ZBTB20 のリンケージを検討することとなった。CUX1 は転写因子なので、何らかの遺伝子配列のプロモーター部分への結合を通じて、その遺伝子の mRNA の増減に関わることが想定された。ところが、miR122 の機能を抑制した肝臓がん細胞では、ZBTB20 mRNA 量はコントロール細胞と同等であり、ZBTB20 蛋白質だけが著明に減少していた。そこでわれわれは、可能性として、ZBTB20 の 3' -UTR 内の配列を標的とし mRNA 量ではなく翻訳調節で発現量を変え得るもう 1 つの miR の存在を想定した。

コンピューターによる検索で、最終的に同定されたのが miR214 である。miR122 抑制細胞で miR214 が著明に増加していることが確

認され、また miR122 抑制細胞ではコントロール細胞と比較して約 50% も減少していた ZBTB20 が、miR214 の発現を抑制した細胞では 90% 以上発現が回復することも確認された。さらに、先述の shRNA による CUX1 ノックダウン細胞では、miR214 の発現レベルが減少していた。miR214 の転写因子結合サイトの検討を通じて、CUX1 は miR214 の転写プロモーター領域に結合することにより、その発現アクチベーターとして関与することが明らかになった。

しかしながら、なぜ miR122 の発現が低下することがあるのか、すなわち miR122 の発現制御機構については現時点では未解明である。ただし、miR122 は肝臓特異的な miR であるだけに肝細胞の正常な機能維持に必須であるらしく、最近二つのグループから、肝細胞で miR122 を欠損すると inflammatory steatosis を生じ、線維化を経て肝癌が発生することが miR122 ノックアウトマウスの解析から報告された。これらの miR122 ノックアウトマウスの肝細胞・肝癌細胞でも AFP 値は高いことが示されている。

(2) この所見は臨床的にしばしば観察される AFP 高発現の肝細胞癌の予後が悪いことを分子生物学的に説明したものであり今後の分子標的治療の応用が期待される。また論文として高いインパクトのジャーナルに掲載され、その質が高く評価された。

(3) 肝細胞の分化誘導法の開発のために iPS 細胞からの肝細胞分化を検討した。その結果、従来の FGF2, BMP4 を用いた分化誘導法を改変する事で より早く安価に肝細胞に分化誘導できることが判明した。この結果は今後の肝細胞分化誘導法の開発に重要なインパクトを与える結果となった。

## 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 5 件)

① Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. MicroRNA122 is a key regulator of alpha-fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun.* 2, 338, 2011. 査読あり

② Kondo Y, Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Goto E, Nakagawa H, Masuzaki R, Asaoka Y, Fujie H, Goto T, Omata M, Yoshida H, Koike K. Intrahepatic bile duct

dilatation after percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: impact on patient's prognosis. *Liver Int.* 31, 197-205, 2011. 査読あり

〔学会発表〕（計 1 件）

①近藤祐嗣, 経皮的ラジオ波焼灼術の安全性と合併症対策, 第 48 回日本肝臓学会総会, 2012 年 06 月 08 日, 石川県立音楽堂

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/225kenncrna/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 祐嗣 (コンドウ ユウジ)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00572231

### (2) 研究分担者

吉田 晴彦 (ヨシダ ハルヒコ)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60240305

大塚 基之 (オオツカ モトユキ)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90518945

### (3) 連携研究者

なし