

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591994

研究課題名(和文)肝細胞癌のマイクロRNA解析による発癌メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名(英文)Identification of mechanism of hepatocarcinogenesis by analysis of microRNA

研究代表者

久保 正二(Kubo, Shoji)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80221224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において肝細胞癌切除標本よりRNAを抽出しマイクロ(mi)RNA発現を検討し、その後、癌部および非癌部肝組織の臨床病理学的検討を進めた。その結果、種々のmiRNAのうち、miR-18bはtrinucleotide repeat containing 6B (TNRS6B)をtarget geneとし、miR-18bの過剰発現とTNRS6Bの低下は細胞増殖を促進し、細胞接着能を低下させることが判明した。また、miR-18bの発現が強い症例での術後生存率は、発現の弱い症例に比較し、低値であった。miR-18bは肝細胞癌の発癌や進展に関連しており、新たな予後因子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of hepatocarcinogenesis was investigated using microRNA obtained from patients with hepatocellular carcinoma. The expression of 12 miRNA, especially miR-18b expression, varied significantly correlated to degree of histological differentiation. miR-18b can control the expression of trinucleotide repeat containing 6B as a target gene. Over-expression of miR-18b or down-regulation of TNRS6B accelerated cell proliferation and loss of cell adhesion ability. HCC patients with high miR-18b expression had a significantly shorter relapse-free period than those with low expression. miR-18b is a diagnostic and prognostic marker for HCC progression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 がん遺伝子 マイクロRNA 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞癌(肝癌)の多くはB型肝炎ウイルス(HBV)やC型肝炎(HCV)による慢性肝疾患を母地として発生するため、肝炎ウイルスと発癌に関する研究が行われてきた。その結果、肝炎ウイルス関連肝癌においてはHBV 遺伝子のヒト遺伝子への組み込みおよびHBx 蛋白やHCV コア蛋白が発癌に大きな役割を果たすことや、慢性炎症がヒトDNAに継続的に損傷を与え、それが発癌に結びついていくことが明らかにされてきた。また、HCV 関連肝癌においてはインターフェロン治療や抗ウイルス在などによるHCVの駆除や肝炎鎮静化が肝癌発癌抑制作用や肝癌治療後再発抑制作用を有することが明らかにされてきた。しかし、インターフェロン有効例においても発癌がみられることなど、肝癌、特にHCV 関連肝癌においてはその確定的な発癌メカニズムは解明されていない。さらに、近年、肝炎ウイルスに起因しない、いわゆるnonBnonC型肝癌が急速に増加している。当科においても肝癌切除例におけるnonBnonC型肝癌症例の比率が上昇し、最近では切除例全体の約1/3を占めるまでに至っている。これらnonBnonC型肝炎の原因には慢性B型肝炎既往、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎やBudd-Chiari症候群、アルコール性肝障害に加えて、近年、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)が発癌要因として注目されている。なかでも、NASHが原因と考えられる症例が増加し、これらの多くが肥満、糖尿病、高血圧などのいわゆるメタボリックシンドロームを伴う症例が多くを占めることが明らかとなってきた。このようにnonBnonC肝癌の要因は様々ではなく、種々の要因が重なった結果、発癌に至った可能性も考えられる。このように、肝癌発癌メカニズムの解明に多くの努力が払われてきたものの、そのメカニズムは多岐にわたり、不明確である。

(2) 一方、発癌メカニズムの解明手段とし

て注目されてきているのが、マイクロRNA(miRNA)の発現異常の解析である。miRNAは内在性の20から25塩基程度の小さな一本鎖RNAであり、それ自身は蛋白質をコードしていないものの、塩基配列上相補的な標的部位をもつ様々な遺伝子(標的遺伝子)の発現を調節している。これらの遺伝子発現調節機能は発生や分化、アポトーシス、細胞増殖や癌化などに密接に関与していることが指摘されてきている。

2. 研究の目的

(1) 上記のようなB型肝炎やC型肝炎に起因する肝細胞癌に加えて、NASH、脂肪肝、糖尿病などを含むnonBnonC肝癌の発癌メカニズムや進展形式、治療成績を明らかにする。このような、種々の要因が関与している肝癌症例において、非癌部肝組織や癌部組織から抽出されたRNAを包括的microarrayを用いてmiRNAの発現を解析する。それによって肝発癌に関係するmiRNAや肝癌の悪性度に関係するmiRNAの同定し、それぞれの要因に応じたmiRNAから発癌リスクの検討や発癌メカニズムの解明を目指す。さらに、miRNAは複数の標的遺伝子の発現を調節していることから、診断や予後判定における単一で有用なマーカーとしてmiRNA発現解析の意義を検討する。

(2) このように肝炎ウイルス、アルコール性肝障害に加えて、特にnonBnonC肝癌の原因であるNASH、メタボリックシンドロームなどの種々の要因が関係する肝癌において、miRNA発現解析という新たな手段を用いて発癌リスクや発癌メカニズムを解明するとともに、診断や治療、予後判定のマーカーとしての臨床応用を目指す。また、それぞれの病態に応じた発癌リスクの同定結果を踏まえた対策により肝癌治療成績の向上を目指す。

3. 研究の方法

肝細胞癌症例において癌部および非癌部肝

組織から抽出された RNA を用いて miRNA の解析を行う。それら miRNA の発現を背景肝疾患の要因別、分化度と進行度別に比較検討し、発癌に關与する miRNA や分化や癌進展に關与する miRNA を解明する。さらに肝癌切除後成績の観点から miRNA 発現を比較検討し、miRNA と癌再発や予後との關係を検討する。それらの結果から、発癌リスクや癌進展のメカニズム解明と、診断や治療、予後判定のマーカーとしての miRNA の意義について検討する。

(1) 肝癌切除例の基礎疾患および臨床経過の検討

(2) 肝癌切除標本の癌部および非癌部肝組織の病理組織学的検討

(3) 肝癌切除標本の癌部および非癌部肝組織の miRNA 発現の解析

肝癌切除標本より抽出された RNA から small RNA を抽出し、microarray を用いて miRNA の発現を評価する。

(4) 肝細胞癌の要因別、分化度、進行度別 miRNA 発現の解析

に癌部および非癌部における miRNA の発現を検討し、肝細胞癌発癌に關与する miRNA を同定する。それらの結果を踏まえて、肝細胞癌症例の要因別、分化度別、進行度別に miRNA 発現プロファイルを比較検討し、肝癌発癌、進展に關与する miRNA を同定する。

(5) 臨床経過と miRNA 発現の解析

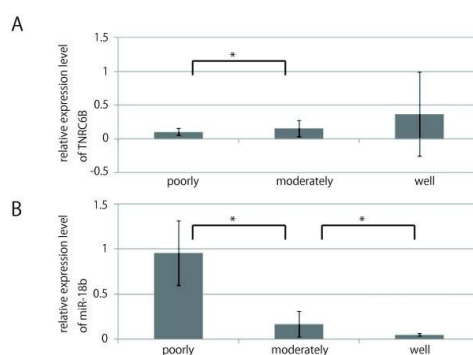
遠隔転移の有無、肝癌再発の有無などの臨床経過と miRNA 発現の關係を解析し、遠隔転移や再発の機構解明、臨床的マーカーとしての miRNA の意義について検討する。また、HCV 関連肝癌症例において、miRNA とインターフェロンの有効性や術後生存率との關係を検討する。

4 . 研究成果

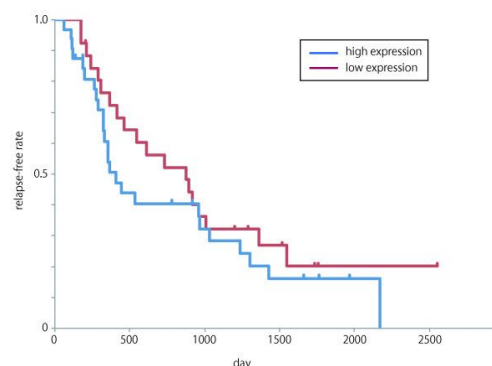
最近の肝細胞癌切除例を検討すると、HCV 関連肝細胞癌が減少し、いわゆる nonBnonC 肝細胞癌が増加していた。なかでも、脂肪肝、

NASH、糖尿病を併存する nonBnonC 肝細胞癌症例が増加していた。

肝細胞癌切除標本より抽出された small RNA をさらに抽出し、miRNA の発現を検討する方法によってマイクロ RNA のプロファイルを作成した。その後、肝細胞癌症例の RNA を集積するとともに、臨床病理学的所見や予後との關係を検討した。対象は 110 例で、20 例が高分化型肝細胞癌、60 例が中分化型肝細胞癌、30 例が低分化型肝細胞癌であった。これらの分化度に従って、12 個のマイクロ RNA が変化していた。特に高分化型肝細胞癌に比較して低分化型肝細胞癌における miR-18b の発現が高かった。



miRand、Targetscan および Argonaute 2 immunoprecipitation study によると、miR-18b は target gene として trinucleotide repeat containing 6B (TNRC6B) の発現を制御していた。さらに肝癌細胞株においても、miR-18b の過剰発現と TNRC6B の低下がみられ、これらが細胞増殖と細胞接着能の喪失に關与していた。さらに、肝切除後成績との關係をみると、miR-18b の低発現症例に比較して高発現症例では無再発期間が短かった。



したがって、miR-18b 発現は細胞増殖と細胞接着の重要なマーカーであると考えられた。また、miR-18b は診断や予後因子として臨床的に活用可能と考えられた。

一方、HCV 関連肝細胞癌症例において、multiplex RT quantitative PCR assay により、miR-26 の発現を検討した。その結果、miR-26 の発現が低い症例では、インターフェロンに反応し、肝切除後の生存率が向上することが判明した。すなわち miR-26 は HCV 関連肝細胞癌において、インターフェロンによる術後補助療法の適応決定に有用であると考えられた。

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 16 件)

Uenishi T, Kubo S, et al. (8 名、8 番目) The long-term outcomes after curative resection for mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma associated with hepatitis C viral infection: A multicenter analysis by Osaka Hepatic Surgery Study Group. Journal of Surgical Oncology 査読有, (in press)

Kaibori M, Kubo S, et al. (16 名、2 番目) Impact of simultaneous cholecystectomy and curative hepatic resection in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology 査読有, (in press)

久保正二、他 (9 名、1 番目) 最新の肝切除法. 外科、査読無、75:1158-1164, 2013

Kanazawa A, Kubo S, et al. (7 名、7 番目) Impact of laparoscopic liver resection for hepatocellular carcinoma with F4-liver cirrhosis Surgical

Endoscopy 査読有, 27:2592-2597, 2013
Murakami Y, Tamori S, Kubo S, et al. (14 名、13 番目) Development of a miR-26 companion diagnostic test for adjuvant interferon-alpha therapy in hepatocellular carcinoma. International Journal of Biological Sciences 査読有, 9:303-312, 2013

Kaibori M, Kubo S, et al. (17 名、2 番目) Clinicopathological features of recurrence in patients after 10-year disease-free survival following curative hepatic resection of hepatocellular carcinoma. World Journal of Surgery 査読有, 37:820-828, 2013

久保正二、他 (7 名、1 番目) 肝細胞癌破裂. 外科、査読無, 74:382-387, 2012

久保正二、他 (5 名、1 番目) 肝癌治療ガイドラインについて. 外科、査読無, 74:191-198, 2012

Urata Y, Kubo S, et al. (11 名、2 番目) Effects of antiviral therapy on the long-term outcome after liver resection for hepatitis B virus-related hepatocellular. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences 査読有, 19:685-696, 2012

Kubo S, et al. (12 名、1 番目) Effects of microwave tissue coagulation on postoperative complications in patients who underwent liver resection. Journal of Microwave Surgery 査読有, 30:159-162, 2012

Kaneda K, Kubo S, et al. (8 名、8 番目) The influence of postoperative glycemic control on recurrence after curative resection in diabetics with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Journal of

Surgical Oncology 査読有, 105:606-611, 2012

Kaneda K, Kubo S, et al. (12名、2番目) Features and outcome after liver resection for non-B non-C hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology 査読有, 59:1889-1892, 2012

Sakae M, Kubo S, et al. (13名、2番目) Effect of interferon therapy on first and second recurrence after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Hepatology Research 査読有, 42:564-573, 2012

上西崇弘、久保正二、他(5名、2番目) サイトケラチン 19 陽性肝細胞癌の臨床学的特徴. 肝胆膵、査読無, 63:671-675, 2011

竹村茂一、久保正二、他(14名、14番目) 肝細胞癌に対する肝切除術の周術期管理. 消化器外科、査読無, 34:1099-1107, 2011
久保正二、他(13名、1番目) 肝切除術におけるドレーン管理 - 肝切除術において腹腔ドレーンは必要か? -. 日本門脈圧亢進症学会雑誌、査読無、17:52-55, 2011

[学会発表](計18件)

上西崇弘、久保正二、他 インターフェロン SVR による C 型肝炎関連肝細胞癌切除例の再発抑制. 第 17 回日本肝臓学会大会 2103.10.9、東京

廣川文鋭、久保正二、他 5cm 以下単発肝細胞癌に対する系統的切除の有用性の検証-KASIOPEA (大阪府内 5 大学) からの報告 -. 第 25 回日本肝胆膵外学会 2013.6.12、宇都宮

Kubo S. The role of interferon therapy for the treatment of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. The 8th International

Meeting of Hepatocellular Carcinoma: Eastern and Western Experiences, 2013.2.2, Tokyo

海堀昌樹、久保正二、他 肝細胞癌術後 10 年間無再発のための術前および術後血小板数維持の意義. 第 16 回日本肝臓学会大会 2012.9.29、神戸

野沢彰紀、久保正二、他 超高齢者の肝細胞癌に対する切除成績の検討. 第 67 回日本消化器外科学会総会 2012.7.19、富山

浦田順久、久保正二、他 B 型関連単発肝癌根治治療後の核酸アナログ製剤による再発抑制効果と生命予後に関する検討. 第 48 回日本肝臓学会 2012.6.7、金沢
久保正二、他 多発肝細胞癌に対する肝切除の適応. 第 48 回日本肝臓学会 2012、金沢

金田和久、久保正二、他 非アルコール性脂肪性肝疾患に合併した肝細胞癌根治切除後の再発危険因子に関する検討. 第 48 回日本肝臓学会 2012.6.7、金沢

久保正二、他 肝細胞癌集学的治療の現況と再発予防-外科医の立場から. 第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4.20、東京

久保正二、他 背景因子を考慮した肝細胞癌に対する総合的治療戦略. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012.4.12、千葉

Uenishi T, Kubo S, et al. Response to interferon therapy affects risk factors for postoperative recurrence of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma 21st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASGO2011), 2011.11.10, Tokyo

Ohata K, Kubo S, et al. Features of

recurrence-free survival for more than 10 years after liver resection for hepatocellular carcinoma 21st World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (IASGO2011), 2011.11.10, Tokyo
Urata Y, Kubo S, et al. Efficacy of antiviral therapy after liver resection for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. International Surgical Week 2011.8.29, Yokohama
Kaneda K, Kubo S, et al. Risk factors for postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease. International Surgical Week 2011.8.29, Yokohama
Sakae M, Kubo S, et al. Impact of interferon therapy on first and second recurrence of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. International Surgical Week 2011.8.29, Yokohama
上西崇弘、久保正二、他 インターフェロン治療 SVR 後に発生した C 型肝炎関連肝細胞癌切除例の検討。第 47 回日本肝癌研究会 2011.7.28、静岡
金田和久、久保正二、他 自己免疫性肝炎を合併した肝細胞癌に対して肝切除術を施行した 7 例の検討。第 47 回日本肝癌研究会 2011.7.28、静岡
海堀昌樹、久保正二、他 肝細胞癌切除後 10 年無再発経過後の肝癌再発症例の検討。第 47 回日本肝癌研究会 2011.7.28、静岡

〔図書〕(計 3 件)

1 久保正二. 肝癌診療 Q&A : インターフェロンで肝癌の再発予防は可能ですか? 中外医

学社 担当部分 p.20-22, 2013

2 上西崇弘、久保正二. 診療ガイドラインに沿った肝がん治療の要点と盲点 : 術前治療 (2) 脾摘出・PSE 文光社 担当部分 p.154-155, 2013

3 久保正二、竹村茂一. 消化器外科学レビュー-2011 : 肝細胞癌 総合医学社 担当部分 p.81-86, 2011

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

久保 正二 (Kubo, Shoji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 : 80221224

(2) 研究分担者

田守 昭博 (Tamori, Akihiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 : 30291595

(3) 研究分担者

村上 善基 (Murakami, Yoshiki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 : 00397556