

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590559

研究課題名(和文)HBV由来低分子RNAの機能解析と肝癌発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文)Clarification of the mechanistic analysis of the small RNA derived from HBV genome and its association for hepatocarcinogenesis

研究代表者

水口 義昭 (Mizuguchi, Yoshiaki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70409217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞がん培養細胞HepB3に同定したHBV genomeから転写されていると考える26ntの塩基を発現するプラスミドベクターを作成し、遺伝子導入した。しかし、目的とするsmall RNAの発現を認めなかった。しかし、上記プラスミドベクターを安定発現する細胞株を作成したところ、間葉変形を起こす細胞が作成された。詳細なメカニズムは以前不明であるが、このsmall RNAによりEMTが惹起されていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We constructed a plasmid vector that was expressing 26nt RNA that might be derived from HBV genome, and we transfected the vector in to the HCC cell line HepB3 cells. Unfortunately, we did not detect the expression of the 26nt small RNA in the cell line. We also constructed stably expressing cell lines. Some of them did EMT by the transfection, which indicated that the small RNA had a potential for initiate EMT by undetermined mechanism.

研究分野：消化器外科

キーワード：microRNA HBV

1. 研究開始当初の背景

近年 20 数塩基ほどの RNA よりなる micorRNA (以下 miRNA) が注目を集めている。われわれは HBV 肝癌組織における MiRNA の Cloning において、全く予想外であったが、HBV ゲノム由来の 23 塩基の RNA を同定し、コンピューター解析による構造解析を行うと、miRNA の特徴を示していた。そこで、同定した 23 塩基長の HBV-small RNA の機能解析、つまりそのターゲットとなるメッセンジャーRNA を同定し、HBV-small RNA が発癌や癌の増殖進展へ及ぼす影響を分子生物学的に生体内外にて確認線と考えた。

2. 研究の目的

近年 20 数塩基ほどの RNA よりなる micorRNA (以下 miRNA) が注目を集めている。哺乳類 miRNA は次第に同定されてきており細胞機能(細胞周期、日内変動、発生、分化)のみならず癌の分子病態(発癌、癌の増殖・進展)への関与が示唆され、その他の多くの病態に重要な役割を担っている可能性が高いと考えられるようになった。さらに、2004年に初めて Epstein-Barr virus に miRNA がコードされていることが報告(Pfeffer S et al. Science 304:734, 2004)されたことを皮切りに多くのウイルスが miRNA をコードし、ホスト-ウイルス間の感染成立を含めた病態生理に関与していることが解明されつつある。

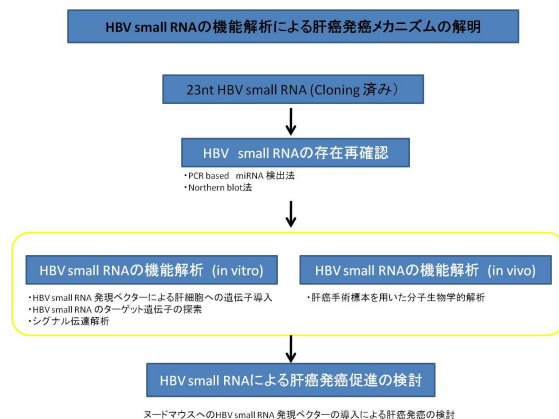
肝細胞癌(HCC)は世界規模でトップ10に入る罹患率と致死率を認める予後不良の疾患であり(Llovet et al. Lancet 362:1907, 2003)毎年、新たに約560000人の新規患者を生む。HCCの強力な発癌因子とされるHBV感染者は全世界にて約2億人存在し、350万人が慢性肝炎に罹患しているとされる(WHO)。肝細胞癌発癌に関する病態生理は次第に解明されつつあるが、今後さらなる研究が必須であり、肝炎、肝硬変、原発性肝癌の分子病態生理については messenger RNA, genome DNA, Protein を中心に、遺伝子、分子構造、機能解析等が盛んに行われている(Nature 18;436:953-60.2005, Gastroenterology 127 5 Suppl 1:S51-5. 2004)。しかし、miRNA をプロファイリングすることで疾患の特徴付

けを試みる論文は我々の発表(業績参照)以外に非常に少なく(Natl Acad Sci USA 101:9740-9744, Molec Cancer Res. 1:882-891)肝炎、肝硬変、原発性肝癌の臨床検体を用いて miRNA プロファイルを報告した例は未だない。さらに、HBV は ATL - HTLV1 と並び癌ウイルスと考えられており、強力な発癌促進因子であるにも関わらず、その直接的発癌メカニズムが存在すると予想されているものの、いまだに明らかとなっていない。また、ウイルスにコードされている遺伝子はウイルスの生態にとってどれもが不可欠であるものがほとんどであることを踏まえると、我々が同定した HBV 由来の small RNA がウイルスの病態生理、とくに肝細胞発癌に深く関与している可能性が高いと予想される。それによって得られる結果は、これまでの概念を覆す病態解明や診断・治療への応用が可能な基盤研究となると考えられる。

3. 研究の方法

1) 第1に HBV-small RNA の存在を再確認する。

1. HBV が感染している肝細胞の細胞株、既存の HBV 発現ベクターを細胞へ導入することで施行する。



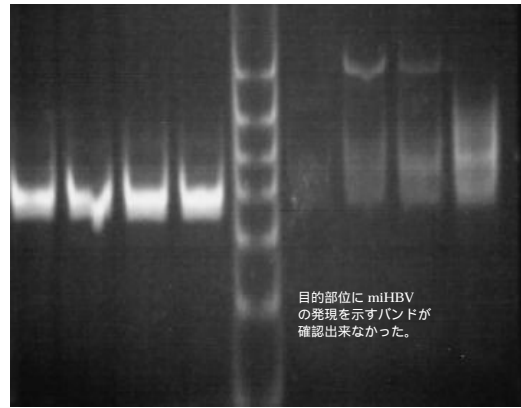
2. 確認方法は PCR based miRNA 検出法を用いる。

2) 第2に HBV-small RNA の導入による肝細胞への効果 (In vitro) を分子生物学的に検討する。

4. 研究成果

肝細胞がん培養細胞 HepB3 に同定した HBV genome から転写されていると考える 26nt の塩基を発現するプラスミドベクターを作成し、遺伝子導入した。作成したベクターは予想される miHBV26 塩基のみ発現する miHBVS とその Precursor 領域も発現する miHBVL, 何も発現しない miHBVNull とした。また、骨格となる plasmid は 2 社のものを用いて、それぞれ作成した。まず、lipofectamin2000 を用いて胆管細胞がん HuCCT1 膵癌 Panc1 などの Cell line に遺伝子導入を思考した。その後、細胞 RNA を回収し、逆転写の後、目的とする部位を増幅させる primer にて PCR を施行後、電気泳動を行った。しかし、目的とする small RNA の発現を認めなかった。遺伝子導入を様々な条件で施行したが、同様の結果であった。電気泳動にて出現したバンドを切り出し、シーケンス解析も施行したが、非特異的増幅のみ得られた。

一時的遺伝子導入では miHBV の発現量が少ないことが考えられたため、上記プラスミドベクターを安定発現する細胞株を作成した。これらの細胞の内 2 種が、明らかな、上皮間葉変形を起こす細胞が作成された。さらに上皮間葉変形のマーカーである miRN-200family の発現量を Realtime-PCR にて確認したところ、予想通りにその発現が対症に比較して優位に低下していることが確認され、この現象に miR-200family が関与していることが考えられた。詳細なメカニズムは以前不明であるが、この small RNA により EMT が惹起されていることが考えられた。



これらの細胞の変化を研究するため、上皮間葉変形を惹起するサイトカイン TGF-beta1 を HuCCT1 細胞株へ投与したところ、全く予想外であるが、miR-200family が一時的にその発現を上昇させることが観察された。そのため、どの段階で miR-200family の発現が上昇しているかを検討するため、primary miRNA, precursor miRNA に対する primer を作成し、Realtime PCR にて検討したところ、Primary miRNA の段階から発現が上昇している、つまり transcription の段階から発現が上昇していることが観察された。

さらにコンピューター解析にて miR-200 の内 miR-200b/a/429 の DNA 領域(プロモーター領域)に TGF-beta1 の細胞内シグナル伝達物質である smad の結合領域を認めたため、DNA pull-down アッセイを施行したところ、smad が上述の結合領域に実際に結合し得ることを見いだした。つまり、これらの結果は、TGF-beta1 が直接 miR-200 の転写をコントロールし得ることを示唆しており、これまでに全く報告のない予想外の知見であった。

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4件)

1) Breast Tumor Kinase/Protein Tyrosine Kinase 6 (Brk/PTK6) Activity in Normal and Neoplastic Biliary Epithelia. Mizuguchi Y, Specht S, Isse K, Sasatomi E, Lunz JG, Takizawa T, Demetris AJ. J Hepatol. 2015 Mar 11. pii: S0168-8278(15)00169-5.

2) Small proline rich protein 2a in benign and malignant liver disease. Mizuguchi Y, Isse K, Specht S, Lunz JG 3rd, Corbitt N, Takizawa T, Demetris AJ. Hepatology. 2014 Mar;59(3):1130-43.

3) MiR-376c down-regulation accelerates EGF-dependent migration by targeting GRB2 in the HuCCT1 human intrahepatic cholangiocarcinoma cell line. Iwaki J, Kikuchi K, Mizuguchi Y, Kawahigashi Y, Yoshida H, Uchida E, Takizawa T. PLoS One. 2013 Jul 26;8(7):e69496.

4) SnoN/SKIL modulates proliferation through control of hsa-miR-720 transcription in esophageal cancer cells.

Shinozuka E, Miyashita M, Mizuguchi Y, Akagi I, Kikuchi K, Makino H, Matsutani T, Hagiwara N, Nomura T, Uchida E, Takizawa T. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jan 4;430(1):101-6.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水口義昭 (MIZUGUCHI, Yoshiaki)

日本医科大学 医学部 助教

研究者番号 : 70409217

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

瀧澤俊広 (TAKIZAWA, Toshihiro)

日本医科大学 大学院医学研究科 教授

研究者番号 : 90271220

Anthony J Demetris

University of Pittsburgh Pathology

Professor