

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460979

研究課題名(和文) 肝特異的microRNAの発現低下に伴う細胞内代謝物量変化とその肝癌治療への応用

研究課題名(英文) Metabolomic analyses in microRNA-reduced HCC

研究代表者

近藤 祐嗣 (Kondo, Yuji)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00572231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：進行肝癌における有効な治療法が不十分である中、本研究では、肝癌におけるmiRNA122の低下に着目し検討した。その結果、miRNA122の発現が低下した肝組織ではアルギニンの量が増えていた。アルギニンは、miRNA122の標的因子であるCAT-1の発現量が増えることにより、取り込まれる量が増えていた。アルギニンは一酸化窒素(NO)合成酵素の基質であるが、実際 miRNA122低下肝癌では細胞内NOの量が増えており、それに伴って癌幹細胞マーカーの発現が増加した。これらから、miRNA122発現の低下した肝癌においては、アルギニン摂取の制限が癌幹細胞的な形質を減弱させる補助療法となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reduced expression of microRNA122 (miR122) is frequently observed in hepatocellular carcinoma (HCC) with aggressive phenotype. However, the molecular mechanisms underlying these observations are not well understood. Using comprehensive metabolomic analyses, we found that the intracellular levels of arginine were increased in miR122-silenced transgenic mouse liver tissues, through upregulation of cationic amino acid transporter member 1 (CAT1), a transporter of arginine. Arginine is the substrate for nitric oxide synthetase, and intracellular NO levels were indeed increased in miR122-silenced HCC cells, with increased expression levels of cancer-stem-cell markers and resistance to anti-cancer drug treatments. Conversely, maintenance of the miR122-silenced HCC cells in arginine-depleted culture media or the overexpression of miR122 reversed all of these features. These results suggest that arginine depletion may be a novel therapeutic approach to managing this disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝臓学 microRNA

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は消化器内科医として従来から肝がんに対する超音波ガイド下経皮的ラジオ波治療とそのより効果的な治療法の開発に従事 (*AJR Am J Roentgenol.* 2009; 193:964, *Br J Surg.* 2008; 95(8):996, *Br J Surg.* 2006; 93:1277) していたが、その臨床的な経験から、際限無く再発を繰り返す肝癌を根本的な治癒に持ち込むためには背景肝と肝臓癌の病態解明が必須と考え、研究分担者とともに、肝癌を中心とした肝疾患の病態生理の解明、特に肝内での miRNA の生理的機能の解明を試みていた。それまで、平成 22 年度から 24 年度にかけての基盤研究(C) (「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 (研究代表者: 近藤祐嗣)」) の補助を受けて、「正常な肝細胞に高発現する miR122 の発現は、肝細胞癌では低下していることが多く、逆に miR122 の発現が低下している肝細胞癌は肝癌の腫瘍マーカーである AFP が高発現するとともに生物学的悪性度の高いものが多くなる」ことを *in vitro* と *in vivo* の実験系で証明し報告した (*Nat Commun.* 2011; 2:338)。さらにその後の解析で、miR122 の発現が低下した肝癌細胞では、癌幹細胞のマーカーが強く発現してくることをみいだしていた。

そこで本研究においては、これまでに得られた知見をさらに発展させて、miR122 の発現低下と癌の悪性度獲得との関連についての機構解析をおこない、得られた分子機構に基づいた理論的な肝癌の新規治療法の開発につなげることを目的としようと考えた。

そもそも、肝臓(肝細胞)においては miR122 の発現が細胞内の全 miRNA の 80% を占めると言われている (Landgraf P. *Cell.* 2007; 129:1401)。逆に miR122 は肝細胞以外の組織では発現がほとんどなく、肝細胞特異的に高発現する miRNA と考えてよい。このように肝細胞特異的に発現する miR122 の機能を、マウスを用いた *in vivo* の系で antisense を改良したオリゴヌクレオチドによって一過性に落とすと、肝細胞内でのコレステロール合成能が落ち、血中コレステロールが低下すると報告されている (Krützfeldt J. *Nature.* 2005; 438:685)。したがって、miR122 は肝細胞が持つ代謝機能にも深くかかわっていることが想定されている。いっぽう、癌幹細胞の特徴として、細胞内代謝系が正常細胞と比べて、大きく異なっていることが報告されている (*Science.* 2010:1340)。そこで本研究では、miR122 の発現低下に伴う肝癌悪性化の機構として、網羅的な細胞内代謝系の攪乱に着目し、それと癌幹細胞形質の獲得との関連を検討することを目標とする。

従来の研究では、一般的に転写因子の活性

変化や DNA の epigenetic な変化に伴う mRNA・蛋白産生量の変化に基づく生理機能への影響が検討されることが多かったが、多彩な機能を持つ miRNA が、生体機能の調節因子として従来考えられていた転写調節を中心としたモデル以上に主要な役割を担っているということを我々も含めて証明してきた。とくに肝癌における miR122 の低下と悪性化に関わるこれまでの本申請者の研究成果をもとに、肝癌悪性化機構について、miRNA の発現変化と細胞内代謝物産生量の変化からの癌幹細胞性の獲得と維持に関わる分子機構が検証できれば、その知見に基づいた新しい治療方法の開発につながることを期待される。すなわち本研究で得られる結果によっては、

1) 肝癌における miR122 の発現低下による細胞内代謝物の量的な変化・癌幹細胞の形質獲得の機構の解明につながる可能性があること、
2) その結果に基づいて、代謝物量あるいは代謝経路を修飾する手法によって肝癌幹細胞を制御する方法の開発につながることを、さらには、

3) 肝癌・miRNA・メタボローム・癌幹細胞の各領域を橋渡しするような新しい科学的分野の構築につながる可能性を秘めていると考えられる。

これらの結果から miRNA、標的分子、結果としての代謝物に介入することによって、進行肝癌の新規の制御法を開発することを計画した。

2. 研究の目的

1) miR122 機能的ノックダウンマウスの肝組織・miR122 ノックダウン肝細胞株を主に用いて肝細胞内・肝組織内の代謝物産生量のメタボローム解析

2) 肝癌細胞株の miR122 機能的ノックダウンによる癌悪性形質獲得と癌幹細胞性との関連の解析

3) 1) および 2) の結果を制御する可能性のある miR122 の標的因子の探索

4) 上記標的因子の発現制御による代謝物産生量の変化と癌悪性形質のレスキューの検証

5) これらの結果に基づいた、miRNA 機能制御、あるいは変動している代謝経路代謝物の充足ないし除去による、臨床的に用いることのできる癌悪性形質獲得の阻止法の開発と検証。

同時に、本 miRNA の発現変化に伴う網羅的な細胞内代謝産物産生量の変化についての知見を得ることで、miRNA とメタボロームという当該研究分野の理解の増進に寄与することを目標に研究を進めていく。

3. 研究の方法

1) miR122 機能的ノックダウントランスジェ

ニックマウスの肝組織およびノックダウン細胞株を用いたメタボローム解析：

これまでの研究の過程で既に作製を終えて、現在も運用している anti-miR122 発現コンストラクトを組み込んで機能的に miR122 を阻害した肝癌細胞株と、同様のコンストラクトを組み込んで miR122 の機能をノックダウンしたトランスジェニックマウスの肝組織を用いて、200 種以上の代謝物含量の定量を網羅的に解析する。それによって、それぞれコントロールの細胞・組織との比較で、miR122 の機能阻害によって量的に変化している代謝物についてスクリーニングを行なった。

2) L-arginine 癌量の増加と細胞・組織内 NO 濃度の変化との関連についての解析：

L-arginine はもともと、NO synthetase (NOS) の作用によって NO と L-citrulline に変換される基質である。したがって、L-arginine の細胞内濃度上昇は、細胞内 NO 濃度の上昇につながる事が想定される。このことを anti-miR122 を発現する細胞株の細胞内および上清中の NO 濃度を測定し確認する。この際、培養液中の arginine を枯渇させた特殊な培養液を用いて、それに伴う、細胞内 arginine の濃度および NO 濃度の変化も検証した。

3) miR122 機能低下に伴う肝癌悪性度増加と癌幹細胞形質の獲得についての解析：

miR122 のノックダウン細胞および機能阻害トランスジェニックマウスの結果から、miR122 の機能阻害は肝癌の悪性度と密接に関連していることをこれまで報告してきた。いっぽう、細胞内 NO 濃度の上昇は癌細胞の Cancer stem cell-like な形質獲得に関与する可能性が他の癌腫で既に報告されている (Cell, 2011:53)。したがって、まず実際に miR122 の機能阻害細胞において癌幹細胞マーカーの発現状況や癌幹細胞としての生物学的形質の獲得について 実験的に確認した。この項については実際にはすでに一部解析を行っており、癌幹細胞のマーカーの一つである CD44 の発現が miR122 の機能低下に伴って増えることをみだしている。またこれまでの検討で、抗癌剤耐性能を獲得すること等もみだしており、miR122 の機能低下に伴って癌幹細胞的な形質を獲得する事象を確認した。

4) 細胞内 NO 濃度の上昇と cancer stem cell like な形質との関連について： 上述のように細胞内 NO 濃度の上昇は癌細胞の癌幹細胞形質獲得に関与する可能性が報告されている。そこで miR122 の機能欠損 肝癌細胞内の NO を消去することで、癌幹細胞形質（表面マーカー発現と生物学的機能の両者）を減弱させるかを検証した。

5) miR122 の標的分子のなかで L-arginine の細胞内輸送に関わる因子候補の選定

miR122 がそのシークエンス依存的に標的としている mRNA の候補を in silico で解析す

るとともに、cDNA array も用いて実際に mRNA の発現量が miR122 の機能阻害によって変化するものを網羅的に検討した。その中から、L-arginine の濃度調節に関わる可能性のある因子を探索することとした。

6) miR122 ノックダウン細胞における CAT-1 ノックダウンによる表現型のレスキュー実験による検証：

miR122 の機能低下細胞におけるここまでの表現型（細胞内 L-arginine 濃度の上昇、NO 濃度の変化、癌幹細胞形質の獲得）について、CAT-1 異常発現の寄与度について、CAT-1 遺伝子のノックダウンおよび過剰発現によって検証する。すなわち、コントロールの肝癌細胞、miR122 ノックダウン細胞、miR122 ノックダウン+CAT1 ノックダウン細胞、CAT1 過剰発現細胞における、細胞内 L-arginine 濃度、NO 濃度、癌幹細胞マーカーの発現等について検証し、miR122 機能低下に伴う癌悪性化における一連の現象における CAT1 の寄与度について検証した。

7) Arginine 欠乏アミノ酸による肝癌治療の可能性にむけての検討：

ここまでの検討で得られた知見に基づいて、miR122 ノックダウン細胞における癌幹細胞的な形質を、arginine 欠乏アミノ酸を用いることで、回復することができるか検証する。マウス肝癌モデル (xenograft model) を用いて、arginine 欠乏食による肝癌治療の可能性について in vivo でも検証した。

4. 研究成果

1) miR122 機能的ノックダウントランスジェニックマウスの肝組織およびノックダウン細胞株を用いたメタボローム解析：

miR122 の機能が阻害されると、細胞あるいは組織内の非必須アミノ酸の一つである L-arginine の含量が有意に増えることをみいだした。

2) L-arginine 癌量の増加と細胞・組織内 NO 濃度の変化との関連についての解析：

miR122 ノックダウンの肝癌細胞においては事前の想定通り、L-arginine の濃度が上昇しており、それに伴って NO 濃度も上昇していた。

上清から arginine を枯渇させた場合、細胞内の L-arginine の濃度も低下し、細胞内濃度の同アミノ酸の上昇は、細胞外からの取り込み低下に伴うことが示唆された。

3) miR122 機能低下に伴う肝癌悪性度増加と癌幹細胞形質の獲得についての解析

miR122 の発現低下・機能低下に伴い、肝細胞での癌幹細胞表面マーカーである CD44 の発現が増えることを FACS にて確認した。

4) 細胞内 NO 濃度の上昇と cancer stem cell like な形質との関連について：miR122 のノックダウン肝癌細胞では細胞内の NO 濃度が上がっていた。逆に、NO を除去する因子によ

って、癌幹細胞表面マーカーの発現は低下し、高い NO 濃度が癌幹細胞の表現型を惹起して

いる可能性が示唆された。

5) miR122 の標的分子のなかで L-arginine の細胞内輸送に関わる因子候補の選定

miR122 のノックダウン肝癌細胞を用いてマイクロアレイ検索を行い、arginine の輸送体である CAT-1 の発現が亢進していることを見出した。CAT-1 は miR122 の標的分子としてよく知られており、miR122 のノックダウンによって CAT-1 タンパクの発現量が増え、それに伴い arginine の細胞内取り込みが増え、さらに NO が産生されて、癌幹細胞様の形質の獲得に至っていることが示唆された。

6) miR122 ノックダウン細胞における CAT-1 ノックダウンによる表現型のレスキュー実験による検証：

逆に CAT-1 タンパクの発現をノックダウンによって減らすことにより、あるいは低 arginine 下での培養条件で細胞を飼育することにより、miR122 のノックダウンで見られた癌幹細胞様形質はキャンセルされた。このことから miR122 の低下に伴う癌幹細胞様形質の獲得にはこれらの因子が関与していることが示唆された。

7) Arginine 欠乏アミノ酸による肝癌治療の可能性にむけての検討：

肝癌のマウス xenograft モデルにおいて、arginine 欠乏食で飼育したマウス群では肝癌の成長速度が抑えられることが示された。このことから、進行肝癌の補助療法として arginine の摂取抑制は一定の効果が見込める可能性があることが示唆された。今後の検討を加えることで、進行肝癌の補助療法としてのアルギニン制限を臨床的に確立していきたいと考えている。

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3件)

1. Kishikawa T, Otsuka M, Poh Seng T, Ohno M, Sun X, Yoshikawa T, Shibata C, Takata A, Kojima K, Takehana K, Ohishi M, Ota S, Noyama T, Kondo Y, Sato M, Soga T, Hoshida Y, Koike K. Decreased miR122 in hepatocellular carcinoma leads to chemoresistance with increased arginine. *Oncotarget* 2015 in press. [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=3234](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=3234)
2. Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Impact of PNPLA3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology Res.* 2014;44(10):E137-44. doi:

10.1111/hepr.12258.

3. Yoshikawa T*, Takata A*, Otsuka M*, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, Koike K (*; equal contribution). Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. *Sci Rep.* 2012;2:637. doi: 10.1038/srep00637.

[学会発表](計2件)

1. 大塚基之、miRNA122 発現の低下した肝癌における新規栄養療法の提案、第 101 回 日本消化器病学会総会 パネルディスカッション 癌幹細胞を標的とした消化器癌治療の最前線、仙台 2015 年 4 月 24 日
2. 大塚基之、miR122 低下肝癌における補助療法としての抗アルギニン療法の理論的根拠、第 74 回 日本癌学会学術総会 一般口演 肝がん・GIST、2015 年 10 月 8 日、名古屋

[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

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