

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860513

研究課題名(和文)肝線維化に伴うmicroRNA発現変化を介した肝癌幹細胞維持メカニズムの解明

研究課題名(英文)Effect of miR-122 expression on liver cancer stem cells properties

研究代表者

三馬 聡 (MIUMA, Satoshi)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：30437892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：miR-122は肝臓で最も発現量が高く、様々な肝疾患への関与が想定される。今回、我々はmiR-122が肝癌幹細胞に与える影響について解析した。肝癌細胞株にmiR-122の定常発現させ解析したところ、miR-122発現によりCD44陽性細胞の割合が低下し、これはCD44陽性細胞特異的な細胞増殖能低下に起因することが明らかとなった。miR-122は肝癌幹細胞に対する新規治療法開発のターゲットの候補になりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA-122 (miR-122), a highly abundant and liver-specific miRNA, plays important role in liver disease. In this study, we elucidated the effect of miR-122 on liver cancer stem cells. MiR-122 overexpression decreased the ratio of hepatoma cells positive for CD44, but not other cancer stem cells surface marker, in flow-cytometry analysis. In addition, miR-122 overexpression induced lower proliferation of hepatoma cells positive for CD44. miR-122 may be a target for liver cancer stem cell therapy.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝細胞癌 miR-122 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は蛋白をコードしない 20mer 前後の小分子 RNA であり、遺伝子発現制御を介し、生体の発生、分化のほか、感染症、変性疾患、及び発癌と深く関与することが明らかとなっている。肝疾患でも同様であり、特に肝組織で最も多く存在する“miR-122”は、コレステロール合成、C 型肝炎ウイルスの複製調整の他、その発現が肝細胞癌進展を抑制することが報告され、新たな治療標的としての期待もあり、当科でも精力的に研究を進めている。

他方、癌形成については“癌幹細胞”を癌の起源とする考え方が提唱されて久しく、肝細胞癌においてもこの概念により新たな研究が展開されている。癌幹細胞の、通常癌細胞と異なる最大の特性は、際立った自己複製能、抗癌剤耐性能、及び腫瘍形成能である。これら特性は癌幹細胞“stemness”と称され、これにより癌は形成、維持され、癌組織の根幹になると考えられている。特に治療後再発が多い肝細胞癌では、癌幹細胞 stemness 維持機構を明らかにすることは非常に重要である。

本研究で我々は、肝癌幹細胞 stemness と miR-122 の関連に注目した。肝細胞癌は線維化が進展した肝硬変組織に発生することが多いが、当科では線維化の進展が肝組織中の miR-122 発現量を約 1/5 まで低下させることを確認している。また癌幹細胞誘導には上皮間葉転換 (EMT) 誘導と共通する遺伝子発現が必要であることが報告されているが、当科では miR-122 発現低下が肝癌細胞株の EMT を促進することも見出している。これらの知見より、本研究では「線維化に伴う miR-122 発現の低下は肝癌幹細胞の stemness に促進的に作用する」という作業仮説を提唱し、これを明らかにすべく検討を行った。

2. 研究の目的

肝細胞癌は、未だ治療後の再発が多く難治である。近年、癌幹細胞を癌の起源とする概念が着目されており、その癌幹細胞維持機構の制御の解明は新規治療法開発につながると考えられている。一方肝組織において最も多く発現するマイクロ RNA である miR-122 は、発癌リスクである肝線維化に伴いその発現は低下することが報告されている。したがって、miR-122 発現量の低下は、癌幹細胞維持機構にも関わることが推定されているが、これまで明らかにされていない。本研究では、miR-122 発現低下が肝癌幹細胞維持機構に促進的に働くことを in vitro の研究により明らかにし、肝細胞癌の新規治療法への研究基

盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) miR-122 発現量変化に伴う、各種肝癌幹細胞表面マーカーの変化の解析

各種肝癌細胞株 (Huh7 細胞、HepG2 細胞、PLC/PRF5 細胞、Huh1 細胞、Hep3B) の miR-122 発現量を real time PCR により解析したところ、HepG2 細胞、PLC/PRF 細胞の miR-122 発現量が低値であったため、同細胞に miR-122 定常強制発現を行った。強制定常発現には LentimiRa-GFP-has-miR-122-5p virus (abm 社) を用いた。定常発現株作製後、フローサイトメーターを用い、癌幹細胞表面マーカー発現 (CD133、CD44、EpCAM、CD90、CD13) について解析した。

(2) miR-122 発現が CD44 陽性細胞に与える影響の解析

HepG2 細胞、PLC/PRF5 細胞から作製したコントロール定常発現細胞、miR-122 定常発現細胞からフローサイトメーターにより、それぞれの CD44 陽性細胞を採取した (CD44 陽性細胞上位分画 20% の採取) (Ct1-CD44 (+) 細胞、miR-122-CD44 (+) 細胞)。これら細胞における、細胞増殖能、及びコロニー形成能について各種解析を行った。

(3) 肝星細胞より分泌される細胞外分泌顆粒が、CD44 陽性細胞に与える影響の解析

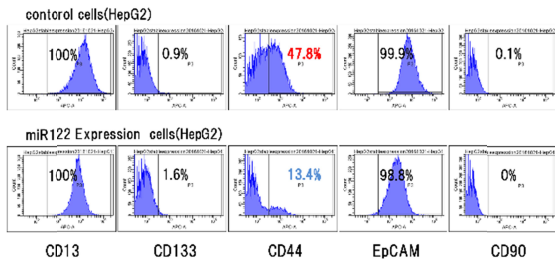
肝星細胞培養後の培養上清より超遠心法により、細胞外分泌顆粒 (EVs) を回収した。EVs は NanoTracking analysis によりサイズ確認、EVs 濃度計測を行った。これら EVs を各種肝癌細胞株に添加し、サイトカイン、ケモカイン分泌量の変化について、Luminex を用いて網羅的解析を行った (Cytokine 25-plex Human Panel、ProcartaPlex Human Growth factor Panel)。また miR-122 発現が及ぼす影響についても評価を行った。

4. 研究成果

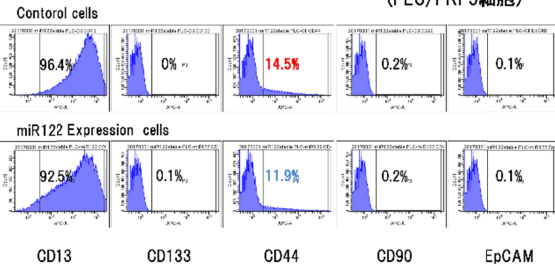
(1) miR-122 発現量変化に伴う、各種肝癌幹細胞表面マーカーの変化の解析

各細胞表面マーカーのうち、miR-122 強制発現により、CD44 陽性細胞分画のみ、変化が認められ、CD44 陽性細胞割合の低下を認めた (下図参照)。この結果は、miR-122 発現が CD44 蛋白発現を直接的に制御する可能性、あるいは、miR-122 発現が CD44 陽性細胞増殖能を制御する可能性が考えられた。

miR122 Expression細胞における各表面マーカーの変化 (HepG2)



miR122 Expression細胞における各表面マーカーの変化 (PLC/PRF5細胞)

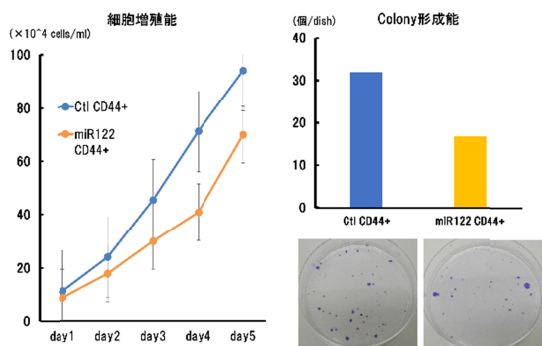


(2)miR-122 発現が CD44 陽性細胞に与える影響の解析

上記の miR-122 発現が CD44 陽性細胞に与える影響を明らかにするために、まず miR-122 を一過性発現させ、HepG2 細胞、PLC/PRF5 細胞の CD44 mRNA 発現変化についてリアルタイム PCR で解析を行った。しかし miR-122 の一過性発現は CD44 mRNA 発現に影響を与えなかった。このため、我々は、miR-122 の発現は CD44 陽性細胞増殖能に影響を与えているものと考え、さらに CD44 陽性細胞分画において、miR122 が及ぼす影響について解析を進めることとした。

フローサイトメーターを用い Ctl-CD44(+) 細胞、miR-122-CD44(+)細胞を採取後、それぞれの細胞増殖能をコロニー形成数計測、培養後の細胞数計測により評価した。下図に示すように、miR-122-CD44(+)細胞ではコロニー形成能、細胞増殖能の低下が認められた。miR-122 発現は CD44 陽性細胞分画において、その細胞増殖能を低下させると考えられた。

miR122発現変化によるCD44陽性細胞増殖能変化 (PLC/PRF5細胞)



(3)肝星細胞より分泌される細胞外分泌顆粒が、CD44 陽性細胞に与える影響の解析

以前より我々は細胞外分泌顆粒(EVs)の肝癌細胞株に対する作用に注目し検討を行っている。本研究は線維化に伴う miR-122 発現低下が肝癌細胞、肝癌幹細胞に与える影響を解析するものであるが、この肝微小環境を形成するもの一つとして活性化肝星細胞が挙げられる。そこで培養状態における活性化肝星細胞より分泌される EVs を用い、これが CD44 陽性細胞に与える影響について、miR-122 発現量を変化させ解析を行った。

肝星細胞由来の EVs を回収し、これを HepG2 細胞に添加し各種サイトカインを計測したところ、HGF 発現の著明な上昇が誘導された。そこで同様に Ctl-CD44(+) 細胞と miR-122-CD44(+)細胞にも EVs を添加し、HGF 発現変化を解析してみたが両細胞で差は見られなかった。尚、面白いことにエトポシドにて細胞老化を誘導した非活性の肝星細胞より回収した EVs では HGF 発現上昇は認められていない。近年、老化肝星細胞は Senescence-associated secretory phenotype (SASP) を介して肝細胞癌に対し促進的に働くことが報告されているが、老化肝星細胞の EVs は肝癌細胞に対しむしろ抑制的に働いていた。

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 4 件)

Miyaaki H, Tamada Y, Hayashi K, Taura N, Miuma S (その他 6 名). Recurrent Hepatitis B and D Virus Infection in a Liver Transplant Recipient. Transplant Proc. 2017 Jan - Feb ;49(1):175-177. DOI: 10.1016/j.

(査読あり)

Hidaka M, Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Ono S (その他 8 名, 7 番目). The Kupffer Cell Number Affects the Outcome of Living Donor Liver Transplantation from Elderly Donors. Transplant Direct. 2016 Jul 22;2(8):e94. (査読あり) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5082997/>)

Miuma S, Ichikawa T, Miyaaki H, Haraguchi M, Tamada Y (その他 7 名). Efficacy and Tolerability of Pegylated Interferon and Ribavirin in Combination with Simeprevir to Treat Hepatitis C Virus Infections After Living Donor Liver Transplantation. J

Interferon Cytokine Res. 2016
Jun;36(6):358-66. DOI: 10.1089/ jir.
(査読あり)

Paisie CA, Schrock MS, Karras JR, Zhang
J, Miuma S (その他 5 名). Exome-wide
single-base substitutions in tissues
and derived cell lines of the
constitutive Fhit knockout mouse.
Cancer Sci. 2016 Apr;107(4):528-35.
DOI:10.1111/cas. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

宮副由梨、三馬 聡、老化肝星細胞より
分泌される細胞外分泌顆粒の生物学的意
義の検討、第 23 回肝細胞研究会、
2016.7.7、大阪大学中之島センター(大
阪府・大阪市)

宮副由梨、三馬 聡、老化肝星細胞より
分泌される細胞外分泌顆粒の生物学的意
義の検討、第 8 回日本 RNAi 研究会、
2016.9.1、グランドプリンスホテル広島
(広島県・広島市)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三馬 聡 (MIUMA, Satoshi)
長崎大学・病院 (医学系)・助教
研究者番号: 30437892

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし