

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893191

研究課題名(和文) 治療抵抗性肝細胞癌におけるマイクロRNAの機能解析と新規治療への展開

研究課題名(英文) Role of micro-RNA on the progression for local recurrence in hepatocellular carcinoma

研究代表者

伊藤 心二 (ITO, Shinji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90382423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌において局所療法や塞栓療法後の局所再発はしばしば治療に難渋する。本研究において治療抵抗性肝細胞癌の進展・再発におけるマイクロRNA(miRNA)発現異常の解析を行い、新しい分子標的治療のターゲットとなりうる可能性について検討を行った。がん幹細胞と関連性があるスフェア形成細胞株を樹立した。スフェア形成細胞は通常培養細胞と比較して、増殖能は低いが、ストレス刺激に伴う耐性能を獲得していた。スフェア形成細胞におけるmiRNA発現の網羅的解析を行い、発現変化を認めるmiRNAを同定した。臨床検体を用いた検討でも同様のmiRNAの発現変化を認めた。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers worldwide. Hepatic resection and liver transplantation are considered to be curative treatments for HCC. Despite other forms of effective therapies including local ablation therapy and transcatheter arterial chemoembolization, many patients show local recurrence and finally progress to the advanced stages with vascular invasion and multiple intrahepatic metastases. In this study, we aimed to investigate the role of micro-RNA (miRNA) on the progression for local recurrence in HCC.

We generated sphere formational Huh7 cells. Sphere formational Huh7 cells exhibited lower proliferation than control cells. There was higher tolerance for reactive oxygen species with sphere formational Huh7 cells as compared with control cells. We then used a miRNA microarray analysis to investigate the epigenetics change induced by sphere formation. An up-regulated miRNA was confirmed by real time PCR analysis in clinical HCC samples.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 マイクロRNA スフェア

1. 研究開始当初の背景

本邦において肝臓癌(肝細胞癌)は死亡者数第3位、罹患率第4位を占めている。肝細胞癌に対する治療は肝切除が唯一の根治的治療であり、最近になり末期肝硬変に対する究極の治療法(肝細胞癌合併を含む)として生体肝移植が普及してきた。

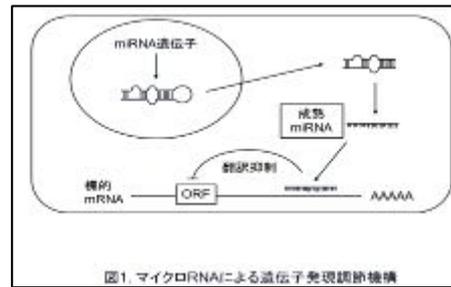
研究代表者は大学病院において肝切除に対して安全な肝切除を行い(Itoh S, et al. *Surg Today* 42(5): 435-40, 2012)、多発肝細胞癌症例に対する肝切除+焼灼療法の有効性を確立した(Itoh S, et al. *Ann Surg Oncol* 16(12): 3299-307, 2009)。市中病院においても肝細胞癌に対する新たなバイオマーカーを解明し(Itoh S, et al. *J Surg Res* 178(2): 640-5, 2012)、肝切除術後合併症の特長を明らかにした(Itoh S, et al. *Am Surg* 80(2): 166-70, 2014)。さらに、新たな肝切除手術手技を開発し(Itoh S, et al. *Surg Today* 42(12): 1176-82, 2012)、切除不能肝細胞癌に対する外科的マイクロ波凝固療法の意義を明らかにした(Itoh S, et al. *Ann Surg Oncol* 18(13): 3650-6, 2011)。

肝機能不良により肝切除不能となることも多く、切除不能症例に対して局所療法、塞栓療法の有効性が確立しているが、治療後の局所再発が問題となり、治療に抵抗性を示すことも少なくない。このような現況を踏まえると肝細胞癌の治療成績の向上のためには肝切除、局所療法、塞栓療法、肝移植に加え、治療後の局所再発を引き起こす腫瘍の分子的性質を解析し、特異的な新しい分子標的治療を開発することが急務であると考えられる。

研究代表者は、今までに分子生物学的解析を用いて、細胞外マトリックスとインテグリンシグナルで重要な役割を担い、最近癌幹細胞との関連も注目されている Focal Adhesion Kinase(FAK)が肝細胞癌の浸潤に関与し、強力な予後因子であることを解明した(Itoh S, et al. *Clin Cancer Res* 10(8): 2812-17, 2004)。また、アダプター蛋白である Growth factor receptor bound protein 7(Grb7)が肝細胞癌の浸潤に関与し、RNA 干渉の手法を用いて Grb7 蛋白発現低下により肝細胞癌の浸潤が抑制されることを解明した(Itoh S, et al. *J Clin Oncol* 2005S, Itoh S, et al. *Mol Cancer Res* 5(7): 667-73, 2007)。新規治療法として多価不飽和脂肪酸を用いた肝細胞癌の基礎的研究も行った(Itoh S, et al. *J Clin Biochem Nutr* 47(1): 81-90, 2010)。

近年、マイクロ RNA(miRNA)が癌の発生、進展において重要な役割を果たすことが分り注目されている。miRNA とは 19~25 個の塩基により構成されるタンパク質をコードしない小さな RNA 分子である。標的メッセンジャーRNA の翻訳抑制を行うことにより遺伝子の一次構造の変異を伴わない遺伝子のエピジェネティックな変異に重要な役割を果たしている(図1)。特に、miRNA

は同時にいくつもの蛋白合成にかかわっており、細胞の生存に重大な影響のある局面(特に低酸素下)において miRNA が関わっていることは合目的である。



最近、低酸素下で miRNA の発現パターンが変化することが報告され(Shen J, et al. *Nature* 2013)、肝細胞癌においても miRNA122 が嫌気性代謝の key enzyme である piruvate kinase M2 の発現に関与しているとの報告がなされている(Angela M, et al. *PLoS One* 2014)。肝癌は塞栓療法や局所療法による低酸素下状態において miRNA の発現プロファイルを変化させることにより治療抵抗性を獲得している可能性が示唆される。

腫瘍の基礎研究において、二次元培養は簡便性において重要な役割を果たしている。しかし、間質細胞など他の多くの細胞が取り除かれた特殊な環境である二次元のため、本来の組織特異的な遺伝子発現が消失し、生体より得られた腫瘍組織と細胞株の遺伝子発現パターンは約 30%程度異なると報告されている(Birgersdotter A, et al. *Semin Cancer Biol* 2005)。In vitro 系で生体内の構造を再現するため、三次元培養が開発され、代表的な培養方法としてスフェロイド培養がある。すなわち、スフェロイド(スフェア)形成下での低酸素状態における細胞培養は、治療後の局所再発の病変に極めて近い状態と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では治療抵抗性肝細胞癌の進展・再発における miRNA 発現異常の解析を行い、新しい分子標的治療のターゲットとなりうる可能性について検討する。

3. 研究の方法

肝細胞癌細胞株におけるスフェア形成樹立と機能解析

組織や臓器は細胞や細胞外マトリックスなどが三次元的に配列することによって構造的な機能を有している。細胞株の凝集体(スフェア形成)はより臨床に即した形態である。肝細胞癌細胞株を用いてスフェア形成を樹立し、細胞増殖の評価を行う。また、活性酸素を用いたストレス条件下での耐性を MTT assay を用いて評価する。

低酸素状態・スフェア形成状態での肝細胞癌細胞株における miRNA マイクロアレイを用いた miRNA 発現の網羅的解析

低酸素状態・スフェア形成状態、低酸素状態、スフェア形成状態および通常培養下での異なる環境における miRNA 発現を、miRNA マイクロアレイ法を用いた網羅的解析を行う。具体的手順は(1)各条件下での細胞株から total RNA を抽出、(2)total RNA より小分子 RNA のみを分離・精製、(3)miRNA サンプルの定量、(4)miRNA に蛍光色素を標識、(5)miRNA マイクロアレイと miRNA とのハイブリダイゼーション、(6)マイクロアレイのスクリーンを行う。

リアルタイム PCR 法による臨床検体を用いた miRNA の発現解析を行い、臨床病理学的因子との比較検討

miRNA マイクロアレイによりプロファイルされた miRNA の発現を臨床サンプルにおいてリアルタイム PCR で確認、臨床病理学的因子との相関を解析する。

#### 4. 研究成果

肝細胞癌細胞株におけるスフェア形成樹立と機能解析

肝細胞癌細胞株 Huh7 を用いて三次元培養を行い、スフェア形成を樹立した (図 2)。

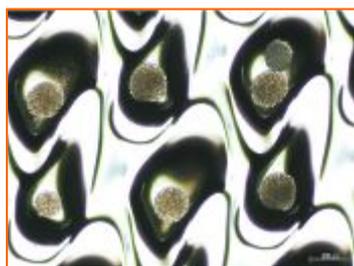


図 2.スフェア形成

通常培養細胞とスフェア形成細胞の増殖能に関してはスフェア形成細胞のほうが増殖能は低かった (図 3)。

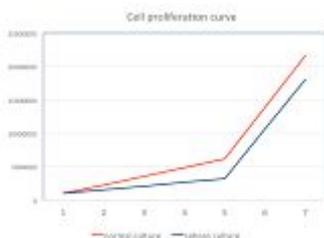


図 3.細胞増殖曲線

また、過酸化水素水添加によるストレス反応変化を観察するとスフェア形成細胞に比べて通常培養細胞において殺細胞効果を認めた。すなわち、スフェア形成によりストレス反応に伴う外的刺激に対して安定性を獲得することが示唆された。

肝細胞癌細胞株における miRNA マイクロアレイを用いた miRNA 発現の網羅的解析

通常培養細胞と低酸素培養細胞、通常細胞とスフェア形成細胞、低酸素培養細胞とスフェア形成細胞においての miRNA 発現の網羅的解析を、miRNA マイクロアレイを用いて行った (図 4)。

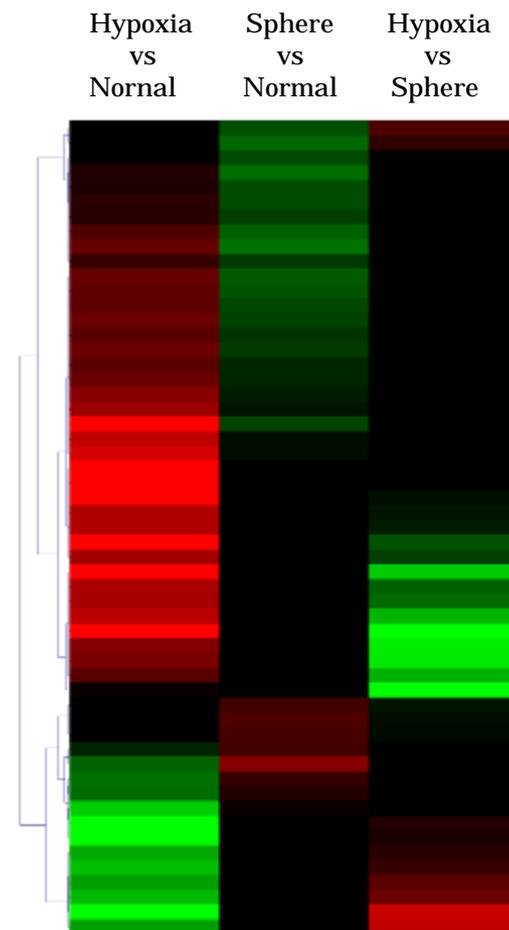


図 4. MiRNA マイクロアレイ

リアルタイム PCR 法による臨床検体を用いた miRNA の発現解析

網羅的に解析を行い、スフェア形成細胞にて発現変化を認めた miRNA に対し、臨床検体を用いた発現変化の検討を行った。臨床検体においても同様の結果を得られた。

#### 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 3 件)

Okabe H, Kinoshita H, Imai K, Nakagawa S, Higashi T, Arima K, Uchiyama H, Ikegami T, Harimoto N, Itoh S, Ishiko T, Yoshizumi T, Beppu T, Monga SP, Baba H, Maehara Y. Diverse Basis of  $\beta$ -Catenin Activation in Human Hepatocellular Carcinoma: Implications in Biology and Prognosis.

PLoS One. 2016 Apr 21;11(4):e0152695.

Kimura K, Shirabe K, Yoshizumi T, Takeishi K, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Uchiyama H, Okano S, Maehara Y.

Ischemia-Reperfusion Injury in Fatty Liver Is Mediated by Activated NADPH Oxidase 2 in Rats.

Transplantation. 2016 Apr;100(4):791-800.

Morita K, Shirabe K, Taketomi A, Soejima Y, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Yamashita Y, Sugimachi K, Harimoto N, Itoh S, Ikeda T, Maehara Y.

Relevance of microRNA-18a and microRNA-199a-5p to hepatocellular carcinoma recurrence after living donor liver transplantation.

Liver Transpl. 2016 May;22(5):665-76.

〔学会発表〕(計 4 件)

第 74 回日本癌学会学術総会

肝細胞癌における EphB2 発現の生物学的意義  
伊藤心二、調 憲、今井大祐、木村光一、  
岡部弘尚、播本憲史、池上 徹、内山秀昭、  
吉住朋晴、前原喜彦

第 26 回日本消化器癌発生学会総会

肝細胞癌における EphB2 発現の生物学的意義  
伊藤心二、下川雅弘、坂田一仁、冨野高広、  
吉田佳弘、別城悠樹、王 歆林、今井大祐、  
木村光一、岡部弘尚、播本憲史、池上 徹、  
内山秀昭、吉住朋晴、池田哲夫、調 憲、  
前原喜彦

第 26 回日本消化器癌発生学会総会

肝細胞癌の  $\beta$ -catenin シグナル活性化にお  
ける CTNNB1 遺伝子変異の意義  
岡部弘尚、調 憲、吉住朋晴、内山秀昭、  
池上 徹、播本憲史、伊藤心二、木村光一、  
馬場秀夫、前原喜彦

第 26 回日本消化器癌発生学会総会

肝細胞癌における SALL4、HDAC1、HDAC2 の発  
現と臨床病理学的検討  
王 歆林、調 憲、孝橋賢一、奥村幸彦、  
吉住朋晴、内山秀昭、池上 徹、播本憲史、  
伊藤心二、木村光一、小田義直、前原喜彦

〔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〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 心二 ( ITOH, Shinji )

九州大学・大学病院・助教

研究者番号 : 9 0 3 8 2 4 2 3