

論文の内容の要旨

論文題目 肝癌における肝特異的microRNA-122発現低下の生物学的意義に関する検討

氏名 小島 健太郎

肝細胞癌は、世界で3番目に死亡者数が多い癌であり、標準治療として外科的手術のほか、経皮的ラジオ波焼灼術(RFA)や経皮的肝動脈塞栓術(TAE)などが行われるが、門脈浸潤や遠隔転移を伴う進行肝癌では、これらの標準治療が適応外もしくは無効であり、その予後を厳しいものとしている。ソラフェニブなどの新規分子標的薬も登場したが、十分な予後改善効果があるとは言い難いため、肝細胞癌が悪性度を高める分子生物学期機序を明らかにした上で、肝細胞癌に対する新しい分子標的治療の開発が望まれる。

microRNA(miRNA)は20-25塩基の短い一本鎖のnon-coding RNAであり、標的遺伝子のmRNAの3'側非翻訳領域(3'UTR)に結合することにより、mRNAの分解もしくは翻訳を抑制し、その遺伝子発現を負に制御することが知られている。その結果、miRNAが細胞増殖、アポトーシス、分化、代謝、ウイルスの増殖を始め、発癌あるいは発癌抑制といった様々な生物学的機能に関与していることが分かってきた。

なかでもmicroRNA-122(miR122)は、肝臓で特異的に発現するmiRNAとして知られ、肝臓における脂質代謝や概日リズムの維持などへの関与のほか、miR122の肝細胞癌での発現低下も報告されている。高悪性度の肝癌でmiR122発現が低下することも報告されているが、その機序は十分に解明されていないのが現状である。

これらの背景から、本研究では肝癌におけるmiR122発現低下がもたらす生物学的意義について検討した。方法として、最初にmiR122のアンチセンス配列を発現するレンチウイルスベクターを用いて、miR122の機能を減弱した肝癌安定細胞株を樹立し、その生物学的表現型の変化および肝細胞分化マーカー発現、さらにそれらの変化の分子生物学的機構について検討した。また、miR122の機能を減弱したトランスジェニックマウスを作成し、その肝組織を用いて同様の検討を行った。さらに、同所異種移植モデル、ヒト肝癌臨床検体を用いて、*in vivo*でのmiR122発現と肝癌の悪性度の関係および*in vitro*の結果から得られた表現型の変化との関連について検証した。

その結果、miR122の機能を減弱した肝癌細胞株では、細胞増殖能に変化は見られなかつ

たが、活性型 RhoA の発現増加を介した浸潤能の亢進が認められた。また、他の肝細胞分化マーカーの発現にほとんど変化がない一方で、肝細胞癌に特異的な血清バイオマーカーである AFP の著明な発現増加が認められ、miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では、タンパク質、mRNA および転写レベルで AFP 発現が増加していた。miR122 による AFP 発現制御機構を明らかにするため、AFP の発現抑制因子として報告されている p53, β -catenin, Zinc finger and BTB domain-containing protein 20 (ZBTB20) について検討した結果、miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株で ZBTB20 発現の増加が認められた。

miR122 による AFP 発現制御の詳細な機序を検討するため、続いて *In silico* による miR122 の標的遺伝子候補の探索を行い、転写調節因子であり、RhoA の活性化を介して細胞の遊走や癌においては浸潤を促進する CUX1 に着目した。その結果、CUX1 は miR122 の標的遺伝子として、miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株で見られた AFP 発現増加および浸潤能亢進という表現型の制御因子であることを明らかにした。miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株において shRNA による CUX1 発現抑制を行った検討や Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay による解析結果から、miR122/CUX1/miR214/ZBTB20 の経路を経て AFP 発現の制御が、miR122/CUX1/RhoA の経路を経て肝癌における浸潤能の制御がなされていることが明らかになった。

同様に、miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウスでも肝臓での AFP 発現増加を認め、*in vitro* での検証同様に CUX1, miR214, ZBTB20 の発現変化を伴っていた。また、同所異種移植モデルを用いた検討では、miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株を移植したヌードマウスの肝臓で腫瘍の血管浸潤が認められ、*in vivo* での miR122 発現低下による肝癌浸潤能の亢進が示された。最後に、ヒト肝癌臨床組織での検討を行い、miR122 発現が低下した肝癌症例で AFP の発現増加および悪性度増大(分化度低下)が認められたことを確認した。

以上の結果、本研究において肝癌における miR122 の発現低下が、標的遺伝子である CUX1 を介して生物学的な癌の悪性度増加と AFP 発現増加の両者に関わることが明らかにされた。臨床的にも高悪性度の肝癌では AFP 高値であることが知られており、その生物学的機構を初めて明らかにした研究結果と言え、将来的に肝癌における悪性度と AFP 発現を規定する因子である miR122 が、進行肝癌に対する治療標的となりうる可能性も示唆された。