

肝臓における肝特異的 **microRNA-122** 発現低下の
生物学的意義に関する検討

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻

指導教員 小池 和彦教授

小島 健太郎

目次	頁
1. 要旨	4
2. 序文	5
3. 方法	7
1) 細胞	
2) レンチウイルスベクター	
3) miRNA の機能を減弱した肝癌安定細胞株の樹立	
4) miRNA の機能を減弱したトランスジェニックマウスの作製	
5) レポータープラスミド作成および遺伝子導入, ルシフェラーゼアッセイ	
6) 細胞増殖アッセイおよび定量偽足アッセイ	
7) 引っ掻きアッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイ	
8) 免疫細胞染色法	
9) RNA抽出および逆転写反応, RT-PCR法, 定量RT-PCR法	
10) Northern Blot法	
11) Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay	
12) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法	
13) Western Blot 法	
14) 免疫組織染色法	

15) <i>In situ</i> hybridization 法	
16) 免疫沈降キットを用いた活性型 Rho および Rac1 タンパク質の測定	
17) 同所異種移植モデル	
18) 統計解析	
4. 結果	19
1) miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株の表現型	
2) miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では浸潤能が増加する	
3) miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では AFP 発現が増加する	
4) CUX1 は miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株での表現型の制御因子である	
5) CUX1 は miR214 を介して ZBTB20 の発現を制御する	
6) miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウスでの検討	
7) 同所異種移植モデルを用いた <i>in vivo</i> での浸潤能の検討	
8) ヒト臨床肝癌組織を用いた miR122 と AFP 発現, 肝癌悪性度の関連の検討	
5. 考察	48
6. 結語	55
7. 参考文献	57
8. 謝辞	68

1. 要 旨

肝臓特異的に発現する microRNA-122(miR122)は, 肝癌での発現低下が報告されている。本研究では, 肝癌における miR122 発現低下の生物学的意義について検討した。

miR122 の機能を減弱した肝癌安定細胞株およびトランスジェニックマウス, 同所異種移植モデル, ヒト臨床肝癌組織を用いた検討で, miR122 の機能低下が標的遺伝子である CUX1 を介して, 肝癌の悪性度上昇と AFP 発現増加をもたらすことを突き止めた。さらに, miR122/CUX1/miR214/ZBTB20 の経路を経て AFP 発現の制御がなされ, miR122/CUX1/RhoA の経路を経て肝癌の浸潤能が亢進することを見出した。

以上の結果から, miR122 が肝癌における悪性度と AFP 発現を規定する因子であることが判明し, 将来的に miR122 が進行肝癌に対する治療標的として考慮すべき可能性が示唆された。

2. 序 文

原発性肝癌の約 95%を占める肝細胞癌は、世界で 3 番目に死亡者数が多い癌であり、世界的に患者数が増加傾向にある(1,2)。通常肝細胞癌に対する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ることが多く、その予後を厳しいものになっている。最近では、進行肝癌に対する新規治療として vascular endothelial growth factor (VEGF) に対する分子標的薬であるソラフェニブが登場したが、ソラフェニブ投与による生存期間の延長はわずか 3 ヶ月に満たず(3)、進行肝癌に対する有効な治療法は乏しいのが現状である(4)。従って、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が、そのためには肝細胞癌がその悪性度を高め、浸潤や転移を生じる分子生物学的機構を明らかにする必要がある(5)。

一方、microRNA (miRNA) は 20-25 塩基の短い一本鎖の non-coding RNA であり、最初に *Caenorhabditis elegans* で存在が発見され(6)、現在では植物から脊椎動物に至るまであらゆる生物での発現が確認されている(7)。Primary miRNA は、Drosha や Dicer に存在する RNA polymerase III によって mature miRNA となり、RNA-induced silencing complex (RISC) とよばれる複合体を形成し、標的とする遺伝子の 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、

標的遺伝子の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(8-10)。

なかでも mircoRNA-122 (miR122) は、肝臓で特異的に発現する miRNA として知られる(11)。肝臓における miR122 の機能として、肝臓での脂質代謝(12,13)や概日リズムの維持(14)などに関与していることが報告されている。また、miRNA の中には悪性腫瘍での発現低下が報告されているものがあり、例えば横紋筋特異的に発現する miR1/miR206 は横紋筋肉腫で発現が低下することが知られているが(15)、同様に miR122 も肝細胞癌で発現が低下していることが知られている(16)。さらに、肝細胞癌の悪性度が上がるにつれて miR122 発現が低下することも報告されているが、それに対して否定的な見解もあり(17-19)、肝細胞癌で miR122 発現が低下する意義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、ヒト肝癌細胞株およびトランスジェニックマウス、同所異種移植モデル、ヒト肝癌臨床組織を用いて肝癌における miR122 の発現低下がもたらす生物学的意義について検討した。

3. 方法

1) 細胞

ヒト肝癌細胞株である Huh7, PLC/PRF/5, Huh1, Hep3B およびヒト肝芽腫細胞株である HepG2 は Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) より入手したものを
用いた。ヒト胎児腎細胞株である 293T およびヒト乳癌細胞株である Hs578T は
American Type Culture Collection (ATCC) より入手したものを
用いた。全ての細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) にて培養した。

2) レンチウイルスベクター

miR122 および miR214 の機能を減弱した肝癌安定細胞株樹立およびトランスジェニックマウス作製のため、System Biosciences 社の miRZip Lentivector-Based Anti-microRNA Construct を用いた。その機序として、本ベクターが発現するヘアピン構造の RNA より産生される miRNA と完全な相補配列を持つ一本鎖 RNA (アンチセンス) が細胞内のセンス miRNA と結合する (図 1A) ことにより、miRNA の機能が恒常的に減弱される。

miR214 強制発現レンチウイルスベクターについては、pCDH ベクター (System Biosciences) を *XbaI* と *NotI* で切り出し、ヒトの miR214 配列を含む約 500 塩基の領域を pCDH ベクターの CMV プロモーター下流に挿入して作成した。

CUX1 発現を抑制した安定細胞株の樹立には, CUX1 shRNA を発現するレンチウイルスベクター (Santa Cruz Biotechnology, #sc-35051-V) を用いた。

また, ドキシサイクリン依存性に CUX1 発現を抑制した安定細胞株の樹立には, Dr. Alain Nepveu (Department of Pathophysiology, Second Military Medical University) から供与された pLVCT shCUX1-tTRKRAB レンチベクターを用いた。

3) miRNA の機能を減弱した肝癌安定細胞株の樹立

miRZip-122 レンチベクターと pPACKH1 Packaging Plasmid Mix (System Biosciences) を Effectene Transfection Reagent (QIAGEN) を用いて 293T 細胞に遺伝子導入した。48 時間後にレンチウイルスを含む培養液を採取し, PEG-it Virus Precipitation Solution (System Biosciences) を用いて精製した。Huh7 および PLC/PRF/5 細胞に miRZip-122 を含むレンチウイルス懸濁液を 8 μ g/ml のポリブレンを用いて感染させた。miRZip-122 レンチベクターはピューロマイシン耐性遺伝子を持ち, 6 μ g/ml のピューロマイシン投与下で培養することで, miRZip-122 を発現する細胞のみを選択的に増殖させ, miR122 の機能を減弱した肝癌安定細胞株を樹立した。

4) miRNA の機能を減弱したトランスジェニックマウスの作製

既報(20)を参考にして, miRZip-122 レンチベクターを *PvuII* で切り出し, 電気泳動にて H1 promoter と SV40 polyA を含む 1085 塩基のプラスミド DNA 断片を切り出した (図 6A)。ユニーテック社に委託し, miR122 のアンチセンスを発現することで miR122 の機

能を減弱したトランスジェニックマウス(C57BL/6)を作製した。いずれのマウスも標準的な飼育環境下(室温 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\% \pm 5\%$, 12/12時間の明暗周期)で市販の食餌(日本クレア)と水を与えて飼育した。

実験動物を含むすべての手順は東京大学動物実験実施マニュアルおよび東京大学医学部動物実験指針, 朝日生命成人病研究所の実験指針に従って行った。

5) レポータープラスミド作成および遺伝子導入, ルシフェラーゼアッセイ

miR122の機能検討のため, pGL3レポータープラスミド(Promega)を*FseI*で切り出し, CMVプロモーター下流のルシフェラーゼ発現遺伝子の3'非翻訳領域に2箇所のmiR122の完全相補配列(応答配列)を挿入したレポータープラスミドを作成した。

標的遺伝子へのmiRNAの結合能検討のため, ルシフェラーゼ発現遺伝子の下流にmiR122の結合部位を含むCUX1 3'側非翻訳領域を挿入したレポータープラスミド(Luc-CUX1-3' UTR wt)を作成した。前述のCUX1 3'側非翻訳領域約500塩基は, ヒトゲノムDNAをテンプレートとしてPCR法で増幅し, PCR産物をpGL4.50レポータープラスミド(promega)の*FseI*切断部位へクローニングした。CUX1 3'側非翻訳領域内のmiR122の結合部位を変異(ACACUCCA→TCTCUCCA)させたレポータープラスミド(Luc-CUX1-3' UTR mut)は, Quik Change II Site-directed Mutagenesis Kit(Stratagene)を用い, プロトコールに従って作成した。miR214の結合部位を含むZBTB20 3'側非翻訳領域を挿入したレポータープラスミド(Luc-ZBTB20-3' UTR)も同様に作成した。

AFPの転写活性検討のため、ヒトゲノムDNAを用いて981塩基のAFPプロモーター領域の配列をPCR法にて増幅し、pGL4.23レポータープラスミド (Promega) のXhoI切断部位へクローニングしたレポータープラスミドを作成した。

p53の転写活性検討のため、東京大学消化器内科大塚基之先生より供与されたp53発現ベクター (pCNX2-p53) およびp53レポーターベクターを用いた(21)。β-cateninの転写活性検討には、TOP-Flash and FOP-Flash vectors (Millipore) を用いた。

全てのベクターは、Effectene Transfection Reagent (QIAGEN) を用いて細胞への遺伝子導入を行い、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼアッセイを施行した。*Renilla reniformis*を用いて細胞間の遺伝子導入効率による誤差を補正した。

6) 細胞増殖アッセイおよび偽足定量アッセイ

miR122の機能減弱による細胞増殖への影響を検討するため、Cell Counting Kit-8 (同仁堂)を用いて比色法による経時的な細胞増殖アッセイを行った。

miR122の機能を減弱した肝癌細胞株における細胞形態変化に伴う偽足の定量には、Quantitative Pseudopodia Assay Kit (Chemicon)を用いて検討した。具体的な方法として、10μg/mlのファイブロネクチンでコーティングした2段chamberの上段に細胞を撒き、上段にFBS非添加DMEM培地を、下段のchamberに10% FBSを添加したDMEM培地を加え、37°Cで2時間培養し、偽足の発育を誘発した。1x Phosphate

Buffered Saline (PBS) で洗浄後に上段の細胞を scraper で除去し、下段の chamber 側へ発育した偽足のみを附属の溶解バッファーを用いてタンパク質溶解液とし、比色法 (OD 600nm) で定量化した。

7) 引っ掻きアッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイ

miR122 の機能減弱による細胞の遊走能および浸潤能を検討するため、引っ掻きアッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイを行った。前者については、10 μ g/ml のファイブロネクチンでコーティングした dish で細胞を培養し、200 μ l ピペットチップを用いて dish 中央を引っ掻き、経時的な細胞の遊走能を評価した。後者については、Becton Dickinson 社の BD BioCoat Matrigel Invasion Chambers を用い、プロトコールに従って行った。22 時間の培養後に基底膜を通過した細胞数を 4 ヶ所無作為に選択し、平均値を算出して浸潤能を評価した。

8) 免疫細胞染色法

細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.5% Triton-X 100で浸透処理した後、Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen , 1:500) で15分間反応もしくは、5%ヤギ血清で30分間ブロッキングした後に抗AFP抗体 (Cell Signaling Technology, #2137, 1:1000) で1時間反応させた。抗AFP抗体で反応させた細胞は、Alexa Fluor 555標識抗ヤギ2次抗体 (Invitrogen, 1:500) で30分間反応させた。最後にスライドをDAPI (Vector Labs) にて核染色した。

9) RNA抽出および逆転写反応, RT-PCR法, 定量RT-PCR法

細胞および破碎したマウス肝組織より, ISOGEN試薬(Nippon Gene)を用いてRNAを抽出した。続いて, SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)を用いて逆転写反応を施行し, 相補的DNA(cDNA)を合成した。cDNAを用いてRT-PCRもしくは定量RT-PCRを施行した。定量RT-PCRは, FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science)を用い, ABI 7000 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)で施行した。内在性コントロールとして β -actinで発現量を補正した。

miRNA発現の定量に際しては, Mir-X miRNA First-Strand Synthesis and SYBR qRT-PCR Kit (Clontech)を用い, プロトコールに従ってRNAからcDNA合成, 定量RT-PCRを行った。内在性コントロールとしてU6 snRNAで発現量を補正した。各遺伝子およびmiRNAの発現解析に使用したプライマーについては, 表1に記載した。

10) Northern Blot法

RNA溶液は, 7M尿素を含む15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, Hybond N+膜(Amersham)へ転写した。Pre-hybridizationの後, miR122もしくはU6 snRNAに対する特異的ビオチン化プローブをULTRA hyb-Oligo Buffer (Ambion)で希釈して, 42°Cで1晩かけてhybridizationを行った。2x Standard Saline Citrate (SSC) bufferを用いてHybond N+膜を洗浄し, BrightStar BioDetect Kit (Ambion)を用いてシグナルの検出を行った。

11) Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay

細胞を1%ホルムアルデヒドで10分間処理し、蛋白とDNAを化学的に架橋させた上で、RIPA-M buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 1mM PMSF, protease inhibitors) で細胞を溶解した。細胞溶解物は10W 30秒、休止30秒の間隔で10回ソニケーションを行い、DNAを600~800塩基程度に細片化させ、1晩かけてDr.Alain Nepveuより供与された抗CUX1抗体(22)を用いて免疫沈降を行い、CUX1に結合しているDNAを回収した。Wash buffer I (20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.2% SDS), wash buffer II (20mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 500mM NaCl, 1%, NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS), wash buffer III (50mM Tris-HCl, 2mMEDTA, 1mMEGTA, 0.5MLiCl, 1% NP-40, 0.7% DOC)を用いて回収したDNAを各3回洗浄し、DNAを精製・濃縮した。免疫沈降前のサンプルDNA (input) に対するCUX1と結合しているDNAの増幅量を定量PCR法によって解析した。定量PCRに際して使用したプライマーについては、表1に記載した。

12) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法

細胞培養液中の AFP 発現量について SRL 社に委託し、AFP 特異的 ELISA Kit を用いて検討した。

13) Western Blot 法

細胞およびホモジナイザーにて破碎したマウス肝組織は溶解バッファー (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.02% Sodium Azide)にて溶解した。抽出したタンパク質溶解液を 10% SDS-PAGE にて電気泳動し、PVDF 膜へ転写した。5%スキムミルクにてブロッキングした後、4°C 1 晩の条件で 1 次抗体反応を行った。続いて Horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体で反応させ、HRP シグナルを ECL-plus (GE Healthcare Life Sciences) で検出した。抗 β -actin 抗体は Sigma-Aldrich 社から入手したもの (A5441, 1:5000) を、抗 ZBTB20 抗体は Abcam 社から入手したもの (#ab48889, 1:500) を、抗 CUX1 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社から入手したもの (CDP, #sc-13024, 1:1000) および Dr. Alain Nepveu から供与されたもの (1:1000) を使用した(22)。

14) 免疫組織染色法

ヒト肝細胞癌組織を配列した組織アレイは Biomax 社より入手した。スライドの脱パラフィン化の後、3% 過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼ抑制処理を行い、10mM のクエン酸バッファー (pH 6.0) を入れた容器内で 89°C 10 分間加熱し、抗原賦活化を行った。5% ヤギ血清 (Dako) にて 10 分間ブロッキングを行った後、4°C 1 晩の条件で 1 次抗体反応を行った。続いて、ビオチン標識抗ウサギ 2 次抗体 (ニチレイバイオサイエンス) で反応させ、3,3'-diaminobenzidine (ニチレイバイオサイエンス) にて発色を行った。最後に、スライドをヘマトキシリンで核染色し、脱水処理後に Clarion mounting

medium (Biomed) で封入した。

15) *In situ* hybridization 法

マウスの肝臓およびヒト肝細胞癌組織における miR122 および miR214 の発現を、digoxigenin (DIG) 標識 locked nucleic acid (LNA) probe を用いた *in situ* hybridization 法で解析した(23)。LNA-scramble (ネガティブコントロール), LNA-anti-miR122, LNA- anti-miR214 の各プローブは EXIQON 社より入手した。スライドの脱パラフィン化の後, 10 μ l/ml の ProteinaseK (Promega) で 37 $^{\circ}$ C 10 分間処理し, 4%パラホルムアルデヒドにて再固定を行った。続いて, 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) に 0.25% 無水酢酸を加えてアセチル化を行い, 48 $^{\circ}$ C 30 分間の pre-hybridization を行った後, 20nM LNA probe を加えた hybridization buffer (5xSSC buffer, 50%ホルムアミド, 500 μ g/ml tRNA, 50 μ g/ml Cot-1 DNA) で 48 $^{\circ}$ C 1 晩かけて hybridization を行った。Hybridization の温度は既報(24)を参考にした。その後, 0.1xSSC buffer で 52 $^{\circ}$ C 10 分間 \times 3 回の洗浄を行い, DIG blocking buffer (Roche Diagnostics) を用いて 30 分間ブロッキングを行った。続いて, 抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics, 1:500) にて室温 1 時間の条件で反応し, NBT/BCIP buffer (Promega) を用いて発色させた。核は Nuclear FastRed (Sigma-Aldrich) で染色し, スライドの脱水処理後に Clarion mounting medium (Biomed) で封入した。

16) 免疫沈降キットを用いた活性型 Rho および Rac1 蛋白の測定

miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株における活性型 Rho および Rac1 の発現検討のため、Active Rho Pull-down and Detection Kit (Thermo Fisher Scientific) および PAK-GST Protein Beads (Cytoskeleton, #PAK02) を用いた。活性型 Rho タンパク質は付属の抗 RhoA 抗体 (1:100) を用いて、活性型 Rac1 タンパク質は抗 Rac1 抗体 (Thermo Fisher Scientific, #89856D, 1:100) を用いて Western Blot 法で検出した。

17) 同所異種移植モデル

BALB/c (nu/nu) ノードマウスは日本クレア社より入手した。既報を参考に(25,26), コントロールおよび miR122 の機能を減弱した 2×10^6 個の PLC/PRF/5 細胞を, 1% マトリゲルを含む PBS で懸濁し, 開腹したノードマウス (各 6 匹) の肝臓の左葉被膜下に 28 ゲージ針を用いて各細胞を移植し, 閉腹した。移植 4 週間後にマウスを解剖し, 腫瘍の脈管浸潤の有無について検討した。

18) 統計解析

各群間の統計学的有意性の解析法として, 分散が等しい場合は Student の t 検定を, 分散が等しくない場合は Welch の t 検定を用いた。得られた P 値が 0.05 未満の時に統計学的に有意と判断した。

RT-PCRに用いたプライマー

AFP	forward	5'- ATT CAG ACT GCT GCA GCC AA -3'
	reverse	5'- GTG CTC ATG TAC ATG GGC CA -3'
Albumin	forward	5'- CCT TTG GCA CAA TGA AGT GGG TAAC C -3'
	reverse	5'- CAG CAG TCA GCC ATT TCA CCA TAG G -3'
HNF4 α	forward	5'- CCA AGT ACA TCC CAG CTT TC -3'
	reverse	5'- TTG GCA TCT GGG TCA AAG -3'
α 1-antitrypsin	forward	5'- GCT GAA GAC CTT AGT GAT GC -3'
	reverse	5'- CTT TGA AGT CAA GGA CAC CG -3'
GAPDH	forward	5'- ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC -3'
	reverse	5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3'

定量RT-PCRに用いたプライマー (ヒト用)

AFP	forward	5'- GAA ACT GGA GAT GAA CAG CT -3'
	reverse	5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3'
α -SMA	forward	5'- AAG AGG AAG ACA GCA CAG CTC -3'
	reverse	5'- GAT GGA TGG GAA AAC AGC C -3'
E-cadherin	forward	5'- TAT CCA GGA GGT CTT TGA GG -3'
	reverse	5'- GCG ATG GCA GCA TTG TAG -3'
ZBTB20	forward	5'- CGC CAA ACA GAA CTA CGT CA -3'
	reverse	5'- TGA AGC GCT TGT TGC AGA TA -3'
CUX1	forward	5'- GCC CTA AGT GAT TTC CAC AGG TTC -3'
	reverse	5'- CGC TCT GAA GCC ATT AGA TGG CAG -3'
β -actin	forward	5'- GCA CTT CCA GCC TTC CTT CC -3'
	reverse	5'- TCA CCT TCA CCG TTC CAG TTT TT -3'

定量 RT-PCR に用いたプライマー (マウス用)

AFP	forward	5'- AGC TCA GCG AGG AGA AAT GGT -3'
	reverse	5'- GTT CAC AGG GCT TGC TTC ATT C -3'
ZBTB20	forward	5'- CGC CAA ACA GAA CTA CGT CA -3'
	reverse	5'- TGA AGC GCT TGT TGC AGA TA -3'
CUX1	forward	5'- GCC CTA AGT GAT TTC CAC AGG TTC -3'
	reverse	5'- CGC TCT GAA GCC ATT AGA TGG CAG -3'
β -actin	forward	5'- GGC CAA CCG TGA AAA GAT GA -3'
	reverse	5'- CAG CCT GGA TGG CTA CGT ACA -3'

表 1. 本研究で使用したプライマー一覧

miRNA定量RT-PCRに用いたプライマー

miR214	5'- CAG CAG GCA CAG ACA GGC AGT -3'
miR375	5'- TTG TTC GTT CGG CTC GCG TGA -3'

miR122の機能を減弱したトランスジェニックマウスのジェノタイプングプライマー

forward	5'- AGT TCT GTA TGA GAC TTG G -3'
reverse	5'- AAG ATA CAT TGA TGA GTT TGG AC -3'

miR214発現レンチウイルスベクター作成に用いたプライマー

forward	5'- TCT AGA TCT GAA TAA AGT CAA AAG TCT AAC -3'
reverse	5'- GCG GCC GCT TTT GGT GGG TTT TAA TAC TTG AAT -3'

miR122の機能をみるレポータープラスミド作成に用いたプライマー

5'- ACA AAC ACC ATT GTC ACA CTC CAA CTT CAC CCA ACC ATT GTC ACA CTC CAC TCG AGC CGG -3'
--

ルシフェラーゼ遺伝子下流にCUX1もしくはZBTB20 3'非翻訳領域を挿入したレポータープラスミド作成に用いたプライマー

ZBTB20	forward	5'- GGC CGG CCT GCC CTA AGT GAT TTC CAC AG -3'
	reverse	5'- GGC CGG CCG ATT TGG CCT AGA ATG GAG TG -3'
CUX1	forward	5'- GGC CGG CCG CTA TGG CAC TAG AAT TTA AGA A -3'
	reverse	5'- GGC CGG CCC AGT GGA CCT CCT GAA GCA C -3'

ChIPアッセイ時の定量PCRに用いたプライマー

-4676	forward	5'- TTC TTC CCT CCC ACC TTC CTC -3'
	reverse	5'- CTT ACA ATG CTT CCA CTT CTC TGA GC -3'
-2812	forward	5'- ATG GGT GGT CTG TAG GCG AGA G -3'
	reverse	5'- GCT TGG CAT TCG GGC TTT C -3'
-2379	forward	5'- GGA ATT TCC TGT CTC AGG TTA AAG C -3'
	reverse	5'- GCT CTA AGG AGA ATA GCC CAC CC -3'
-2072	forward	5'- ACT TCA TTG TTA TGT TGA ACC TGC C -3'
	reverse	5'- CCA GTT TCC TGG AGT TGC TTT G -3'
-624	forward	5'- GAG CCT AAT TTA TTT GGC AAC CC -3'
	reverse	5'- ACC CTT TTG ATT CAC AGC ATG G -3'
-55	forward	5'- TCA GGT TTC CTT TGC TCA TAG ACA G -3'
	reverse	5'- TTT TCT CCC TTT CCC CTT ACT CTC -3'
+328	forward	5'- AAG GTC AAG GGT AGT GAT TTG CTG -3'
	reverse	5'- ACC CAC CAA AAG TAA AGT GAG TGG -3'

表 1. 本研究で使用したプライマー一覧

4. 結果

1) miR122 の機能を減弱した肝癌安定細胞株の表現型

miR122 の機能を減弱した肝癌安定細胞株樹立のため、ヒト肝癌細胞株(ヒト肝芽腫細胞株である HepG2 も含める)における miR122 の発現を Northern Blot 法にて解析した(図 1B)。肝細胞癌では正常肝に比べて miR122 の発現が低下しており、代表的な肝癌細胞株である Huh7 でも正常肝と比べると miR122 発現量は 1/10 程度であるが(27,28), 既報とも照らし合わせ(17,29), 比較的 miR122 発現が保たれている Huh7, PLC/PRF/5 の 2 つの肝癌細胞株に miRZip-122 レンチベクターを用いて miR122 の機能を減弱した安定細胞株を樹立した(図 1A)。miR122 の機能をルシフェラーゼアッセイ法で検討したところ(図 1C), miR122 を強制発現させるとコントロール細胞で低下したルシフェラーゼ活性が miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では低下しておらず, miR122 の機能低下を確認出来た(図 1D)。

次に、コントロールおよび miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で増殖能, 細胞の形態, 肝細胞マーカーの発現を検討した。細胞増殖については、両者で有意な差を認めなかったが(図 1E), 細胞形態については、miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で多数の偽足を形成したような形態変化を認め(図 1F), 偽足定量アッセイでも miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で有意な偽足数の増加を認めた(図 1G)ことから、浸潤・転移の足掛かりとなる細胞形態の変化と考えた。PLC/PRF/5 細胞でも同様の結果

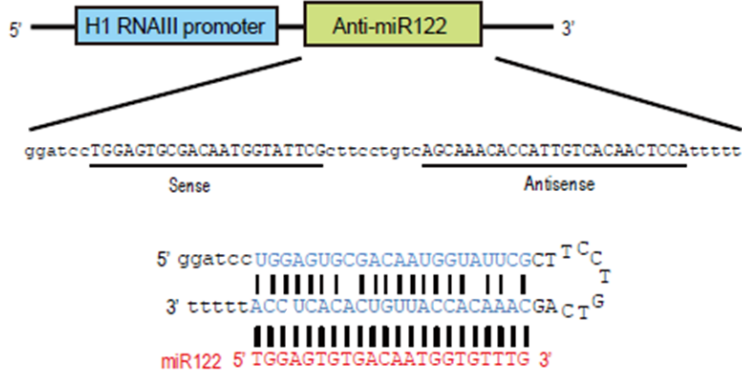
が得られた。

また、各種肝細胞分化マーカー(α -fetoprotein [AFP], アルブミン, HNF4 α , α 1-アンチトリプシン)発現について RT-PCR 法にて検討したところ, miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で著明な AFP 発現増加と軽度のアルブミン発現増加が認められた。

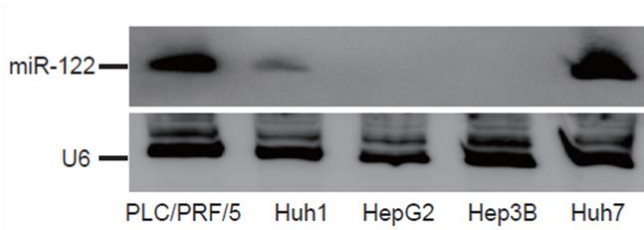
HNF4 α , α 1-アンチトリプシンについては, コントロール細胞と比べて発現に変化を認めなかった(図 1H)。PLC/PRE/5 細胞でも同様の結果が得られた。

AFP は肝細胞癌における代表的な血清腫瘍マーカーであり, 臨床的に広く用いられている(30)。臨床的にも, 門脈浸潤や遠隔転移を生じた進行肝癌や悪性度の高い低分化型肝癌症例では, 血清 AFP 値が上昇することが多く(31-33), 肝癌における miR122 の発現低下がこれらの現象の本質となっている可能性も考えられた。そこで次に, *in vitro* で miR122 が肝細胞癌における浸潤能および AFP 発現を調節する機序について検討した。

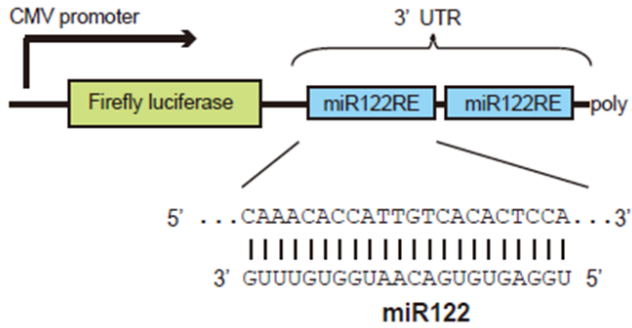
A



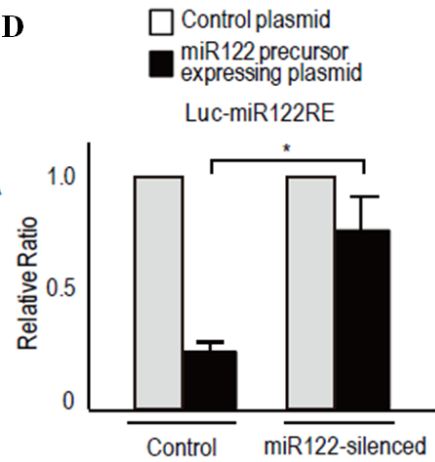
B



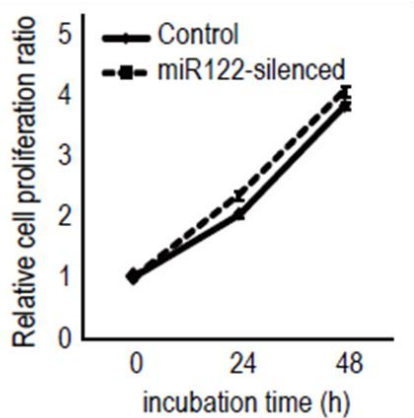
C



D



E



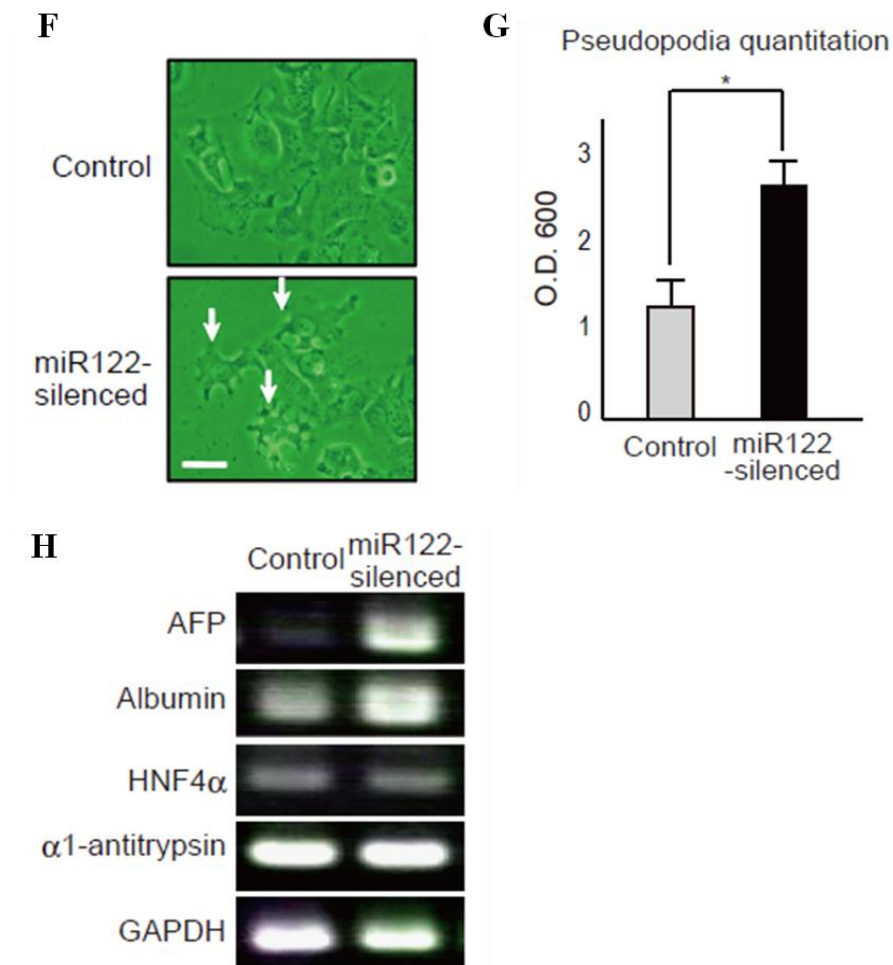


図 1. miR122 の機能を減弱した肝癌安定細胞株の表現型

- (A) miRZip-122 レンチベクターの構造。
- (B) Northern Blot 法によるヒト肝癌細胞株における miR122 の発現。PLC/PRF/5 と Huh7 細胞で miR122 の発現が多く見られた。
- (C) miR122 の機能をみるレポータープラスミドの構造。
- (D) ルシフェラーゼアッセイによる miR122 の機能確認。miR122 強制発現時にコントロールで低下したルシフェラーゼ活性が miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞では低下しなくなった。* $P < 0.05$ 。
- (E) 経時的な細胞増殖アッセイ。コントロール(実線)と miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞(破線)で細胞増殖に差は見られなかった。
- (F) miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞の形態変化。偽足様の構造(白矢印)が出現した。Scale bar 50 μ m。
- (G) 偽足定量アッセイの結果。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で偽足数が増加した。* $P < 0.05$ 。
- (H) RT-PCR 法による肝細胞分化マーカーの発現。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で著明な AFP 発現増加と軽度のアルブミン増加が見られた。

2) miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では浸潤能が増加する

コントロールおよび miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞に 2ng/ml の TGF- β を添加した培養液で 12 時間培養し, Phalloidin による蛍光細胞染色を行ったところ, 後者で線維性アクチンの増加が認められた(図 2A)。また, 定量 RT-PCR 法にて間葉系マーカーである α -SMA と上皮系マーカーである E-cadherin の発現を検討したところ, miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で α -SMA 発現増加と E-cadherin 発現低下が認められた(図 2B)。PLC/PRF/5 細胞でも同様の傾向が見られた。

次に, 引っ掻きアッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイにて細胞の遊走能, 浸潤能を検討したところ, miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で遊走能, 浸潤能ともに有意な亢進が認められた(図 2C,2D)。PLC/PRF/5 細胞でも同様の傾向が見られた。

最後に, miR122 の機能減弱で肝癌の浸潤能が亢進する機序として, 低分子量 GTP 結合タンパク質のひとつである Rho ファミリーの活性(GTP 結合型)について検討した。Rho ファミリーは細胞骨格形成, 細胞の移動や接着などに関与し, 癌での Rho ファミリーの活性化は浸潤や転移の亢進に寄与するため(34), 活性型 Rho および Rac1 タンパク質発現について免疫沈降キットおよび Western Blot 法を用いて検討した。活性型 Rac1 の発現は両者で差が見られなかったが, miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で活性型 Rho の発現増加が認められ(図 2E), miR122 の発現低下が Rho の活性化を介して肝癌の浸潤能を亢進させることが示された。

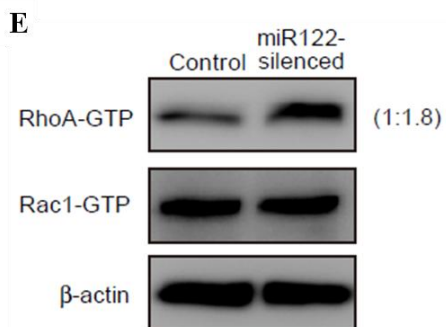
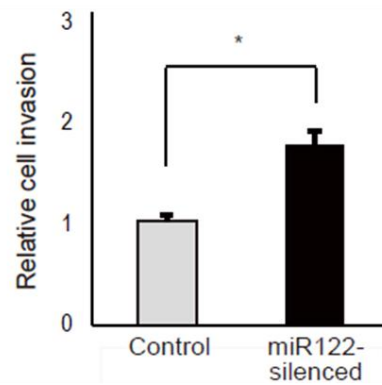
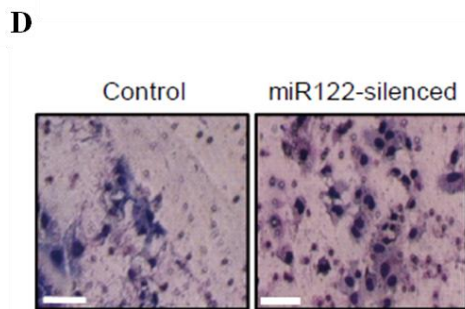
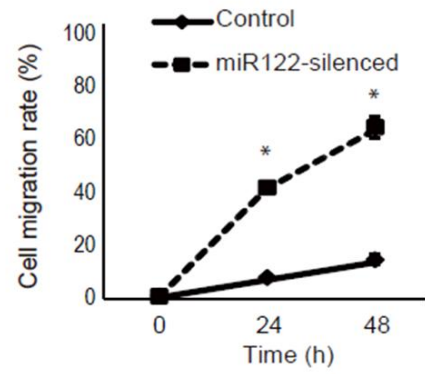
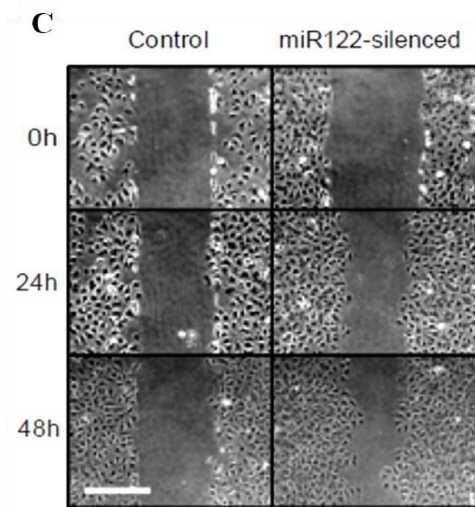
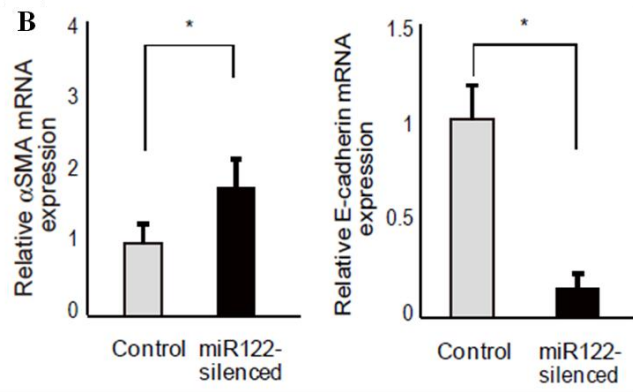
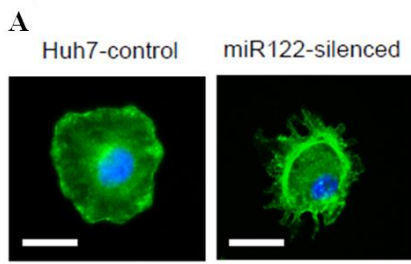


図 2. miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では浸潤能が増加する

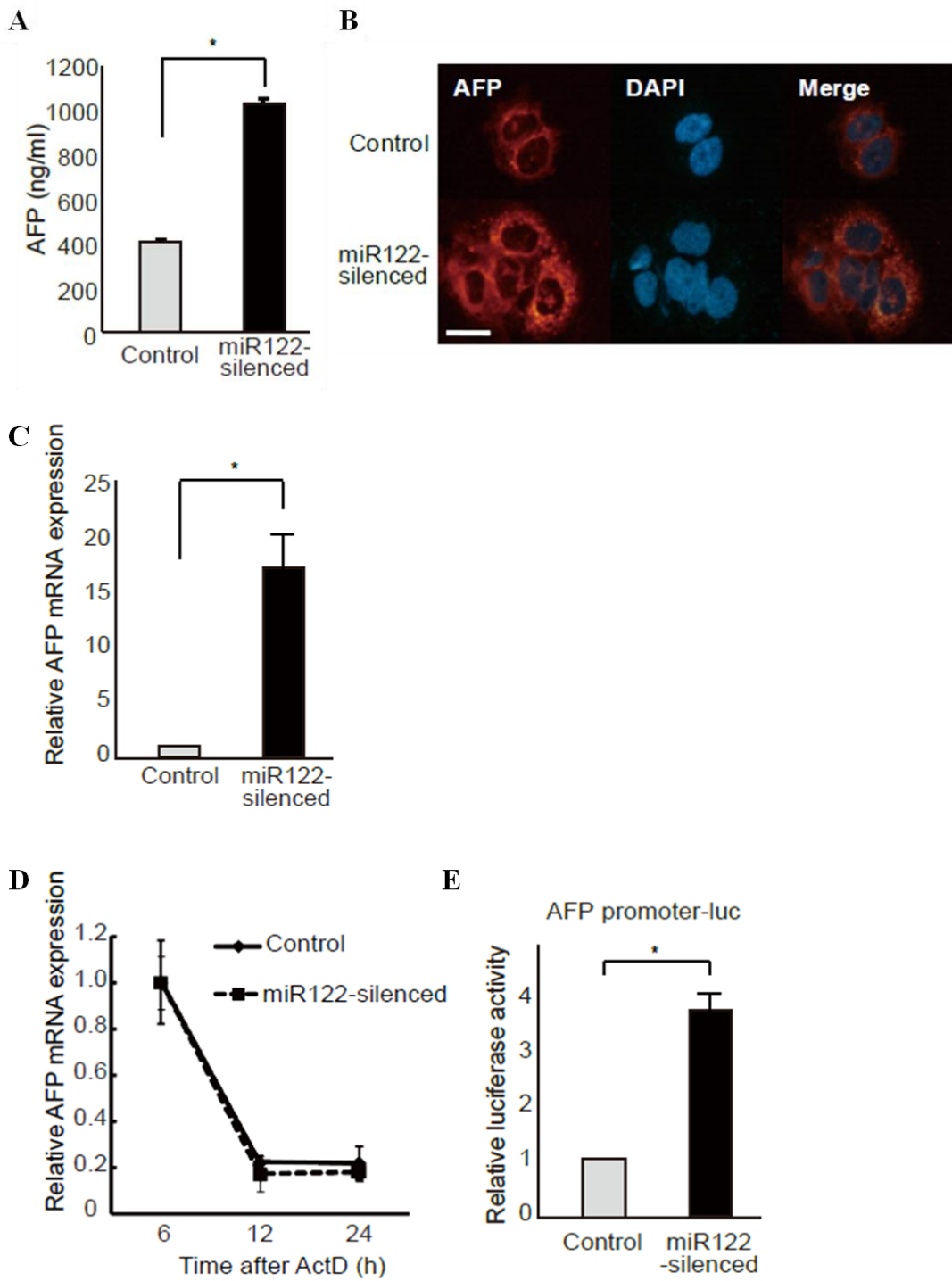
- (A) miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞での phalloidin 蛍光細胞染色による線維性アクチンの増加。Scale bar 20 μ m。
- (B) 定量 RT-PCR 法による α -SMA と E-cadherin 発現の変化。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で α -SMA 発現増加と E-cadherin 発現低下が見られた。* $P < 0.05$ 。
- (C) 引っ掻きアッセイによる細胞遊走能の検討。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で細胞遊走能の亢進が見られた。Scale bar 200 μ m, * $P < 0.001$ 。
- (D) マトリゲル浸潤アッセイによる細胞浸潤能の検討。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で浸潤細胞数の増加が見られた。Scale bar 100 μ m, * $P < 0.01$ 。
- (E) Western Blot 法による活性型 Rho および Rac1 発現の検討。活性型 Rac1 の発現には差が見られなかったが, miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で活性型 Rho の発現増加が見られた。

3) miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では AFP 発現が増加する

miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では RT-PCR 法で AFP 発現増加が認められたため、次に細胞培養液中の AFP 値を ELISA 法で測定した。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞ではコントロール細胞に比べて約 3 倍の AFP 上昇が認められた(図 3A)。抗 AFP 抗体による蛍光免疫染色でも同様に miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で AFP 発現の増強が認められた(図 3B)。次に、定量 RT-PCR 法にて mRNA レベルでの AFP 発現を検討したところ、miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で約 17 倍の AFP 発現上昇が認められ(図 3C)、miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株におけるタンパク質および mRNA レベルでの AFP 発現増加が示された。PLC/PRF/5 細胞を用いた検討でも同様の結果が得られた。

しかしながら、AFP は TargetScan ver.5.0 (<http://targetscan.org>) を用いた *in silico* での検討では、miR122 の標的遺伝子候補ではなかったため、次に miR122 による AFP mRNA の安定化への関与を検討した。各細胞に 10 μ l/ml のアクチノマイシン D を添加し、mRNA レベルでの経時的な AFP 発現を定量 RT-PCR 法で測定したところ、コントロールと miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で AFP 発現に差を認めなかった(図 3D)。そのため、miR122 が他の因子を介して AFP 発現を制御しているものと考えた。まず、転写レベルでの AFP 発現をルシフェラーゼアッセイ法で検討したところ、miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で AFP 転写活性の増加が認められた(図 3E)。

AFPの転写制御因子には、抑制的に働くものとしてp53(35)、 β -catenin(36)の存在が知られており、miR122の機能を減弱した肝癌細胞株におけるこれらの発現変化について検討した。その結果、p53、 β -cateninに関しては、ルシフェラーゼアッセイの結果転写レベルでコントロールとmiR122の機能を減弱したHuh7細胞にて発現に差を認めなかった(図3F, 3G)。そこで、近年AFPの新たな転写抑制因子として報告されたZinc finger and BTB domain- containing protein 20(ZBTB20)(37)に着目し、ZBTB20の発現をWestern Blot法で検討したところ、miR122の機能を減弱したHuh7細胞にてZBTB20発現の低下が認められた(図3H)。以上の結果から、miR122がAFPの転写抑制因子であるZBTB20を介してAFPの発現制御を行っている可能性が示された。続いて、TargetScan ver.5.0を用いて*in silico*によるmiR122の標的遺伝子候補について検討することにした。



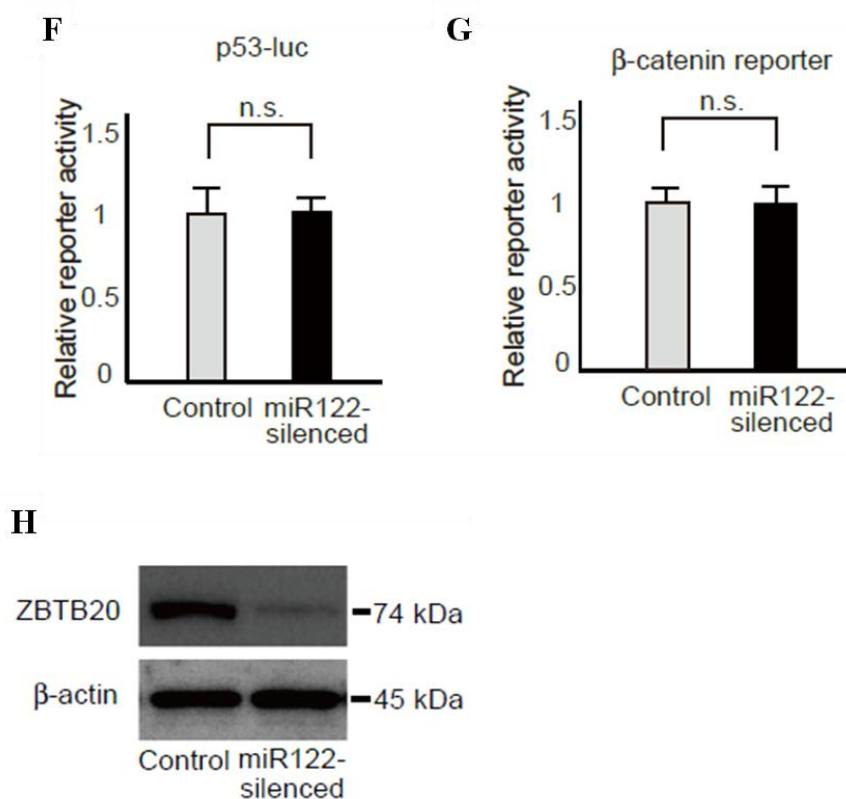


図 3. miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株では AFP 発現が増加する

- (A) ELISA 法による培養液中の AFP 値の変化。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で約 3 倍の AFP 値の上昇を認めた。 $*P < 0.01$ 。
- (B) 免疫組織染色法による AFP 発現の検討。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で AFP 発現増加が見られた。Scale bar 50 μ m。
- (C) 定量 RT-PCR 法による AFP mRNA 発現の変化。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で約 17 倍の AFP 発現増加が見られた。 $*P < 0.05$ 。
- (D) アクチノマイシン D 添加による経時的な AFP mRNA の安定性の検討。定量 RT-PCR 法にてコントロールと miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で AFP mRNA の発現量に差を認めなかった。
- (E) ルンフェラーゼアッセイ法による AFP 転写活性の検討。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で転写活性の増加が見られた。 $*P < 0.05$ 。
- (F) ルンフェラーゼアッセイ法による p53 転写活性の検討。コントロールと miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で転写活性に差は見られなかった。
- (G) ルンフェラーゼアッセイ法による β -catenin 転写活性の検討。コントロールと miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で転写活性に差は見られなかった。
- (H) Western Blot 法による ZBTB20 発現の検討。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で ZBTB20 発現の低下を認めた。

4) CUX1 は miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株での表現型の制御因子である

TargetScan ver.5.0を用いた *in silico* による miR122 の標的遺伝子候補の検討結果、Cut homeobox 1 (CUX1)に着目した(図 4A)。CUX1 は細胞の遊走や浸潤に関与し、また転写調節因子としても作用する遺伝子として知られており(38,39)、さらには Rho ファミリーGTP 結合タンパク質関連遺伝子の転写促進因子として働くことで、RhoA の活性化を通して細胞運動性や浸潤能の亢進に関わることも報告されている(40-42)。

CUX1 には数種類のアイソフォームがあり、発現するアイソフォームによって転写促進的にも抑制的にも働くことが知られている。CUX1 から性質の異なる複数のタンパク質アイソフォームが生成される過程として、例外的に p75 のみイントロン 20 の範囲内の転写開始部位下流で作られる短い mRNA から生成される以外、例えば p110, p90 は cathepsin L に、p150 はまだ特定されていない cysteine protease によるタンパク質分解処理を受けて生成されることが知られている(38)。

CUX1 が miR122 の標的遺伝子であることを証明するため、*in silico* で miR122 の結合部位 (ACACUCCA) を含む CUX1 の 3' 側非翻訳領域の配列をルシフェラーゼ遺伝子下流に挿入したレポータープラスミド (Luc-CUX1-3' UTR wt) および CUX1 の 3' 側非翻訳領域内の miR122 の結合部位に変異 (TCTCUCCA) を含むレポータープラスミド (Luc-CUX1-3' UTR mut) を作成し(図 4B)、miR122 の結合能をルシフェラーゼアッセイ法で検討した。Luc-CUX1-3' UTR wt では miR122 の強制発現により、コントロー

ルと比べてルシフェラーゼ活性の低下を認めたが, Luc-CUX1-3' UTR mut では miR122 を強制発現してもルシフェラーゼ活性に有意な変化を認めなかった(図 4C)。以上の結果から, CUX1 が miR122 の標的遺伝子であることが証明された。

miR122 による標的遺伝子 CUX1 タンパク質発現の制御の確認のため, miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株での CUX1 発現を Western Blot 法で検討した。その結果, miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞において CUX1 p200, p110 のアイソフォームの発現増加を認めた(図 4D)。次に, 293T 細胞で miR122 を強制発現する安定細胞株を樹立し, 逆に CUX1 の発現が低下するかを検討した。Western Blot 法による検討で, miR122 強制発現 293T 細胞では CUX1 p200, p110 の発現低下と ZBTB20 の発現増加が認められた(図 4E)。なお, 定量 RT-PCR 法ではコントロール細胞と比べて miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞において mRNA レベルでの CUX1 発現に変化は認めなかった(図 4F)。

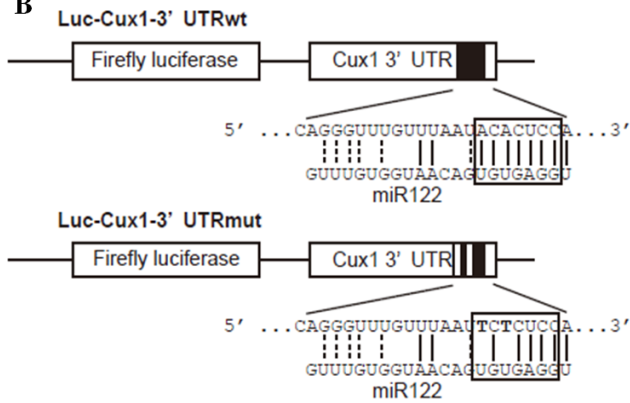
次に, miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株で見られた浸潤能亢進や AFP 発現増加が CUX1 依存性であることを確認するため, miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞にレンチウイルスベクターを用いて CUX1 shRNA を導入し, CUX1 発現を抑制した細胞株を樹立し, Western Blot 法にて CUX1 発現抑制を確認した(図 4G)。続いて, 細胞培養液中の AFP 値を ELISA 法で定量したところ, miR122 の機能減弱かつ CUX1 発現を抑制した Huh7 細胞で有意な AFP 値の低下を認め(図 4H), ZBTB20 の発現回

復も認められた(図 4G)。最後に浸潤能の変化に関してマトリゲル浸潤アッセイを行ったところ, miR122 の機能減弱かつ CUX1 発現を抑制した Huh7 細胞で浸潤細胞数の減少を認めた(図 4I)。以上の結果から, miR122 が標的遺伝子である CUX1 依存的に肝細胞癌における浸潤能や AFP 発現の制御を行っている可能性が示された。

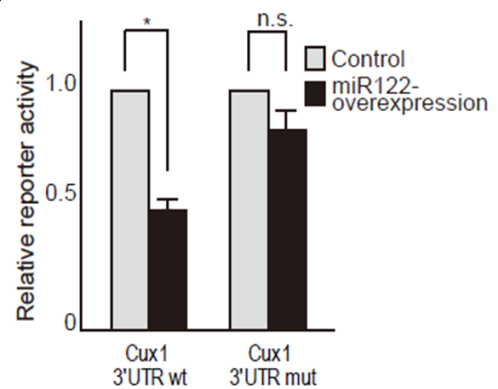
A

Target gene	Gene name	total	8mer	7mer- m8	7mer- 1A	total	8mer	7mer- m8	7mer- 1A
CLIC4	chloride intracellular channel 4	2	1	1	0	0	0	0	0
RFXAP	regulatory factor X-associated protein	1	1	0	0	1	0	1	0
RIMS1	regulating synaptic membrane exocytosis 1	1	0	1	0	2	0	1	1
DULLARD	dullard homolog (Xenopus laevis)	1	1	0	0	1	1	0	0
SOX11	SRY (sex determining region Y)-box 11	2	1	0	1	0	0	0	0
LMNB2	lamin B2	1	1	0	0	1	0	1	0
CUX1	cut-like homeobox 1	1	1	0	0	0	0	0	0
NICN1	nicolin 1	1	1	0	0	1	0	0	1
P4HA1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I	1	1	0	0	0	0	0	0
PRKRA	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	1	1	0	0	0	0	0	0
USP53	ubiquitin specific peptidase 53	1	1	0	0	0	0	0	0
CLIC5	chloride intracellular channel 5	1	1	0	0	2	0	0	2
GRHL2	grainyhead-like 2 (Drosophila)	1	1	0	0	1	0	1	0
OCLN	occludin	1	1	0	0	0	0	0	0
MIPOL1	mirror-image polydactyly 1	1	1	0	0	1	1	0	0
FOXK2	forkhead box K2	1	0	0	1	1	0	1	0
MAP3K12	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12	1	1	0	0	0	0	0	0
PIP4K2A	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha	1	1	0	0	0	0	0	0
GALNT17	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 17	1	1	0	0	0	0	0	0
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	1	1	0	0	0	0	0	0
BAI2	brain-specific angiogenesis inhibitor 2	1	1	0	0	0	0	0	0
CCNG1	cyclin G1	1	1	0	0	0	0	0	0

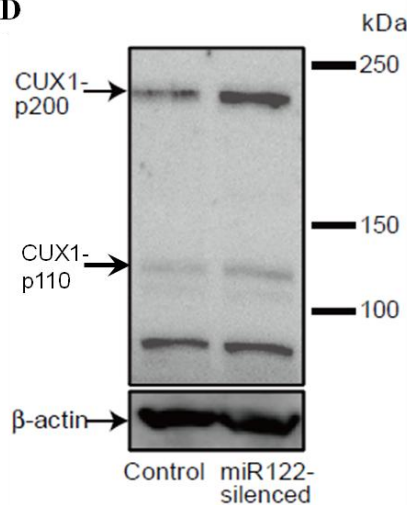
B



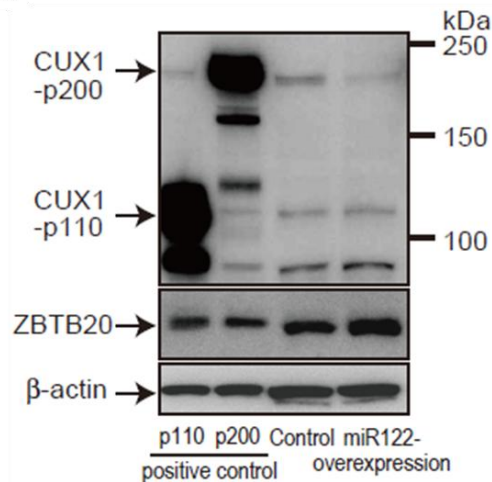
C



D



E



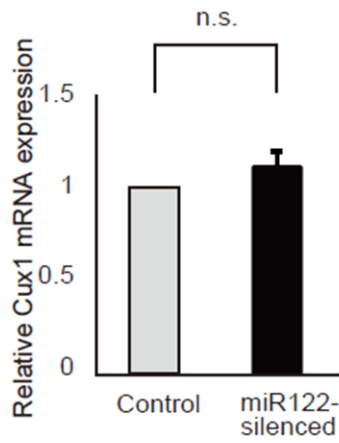
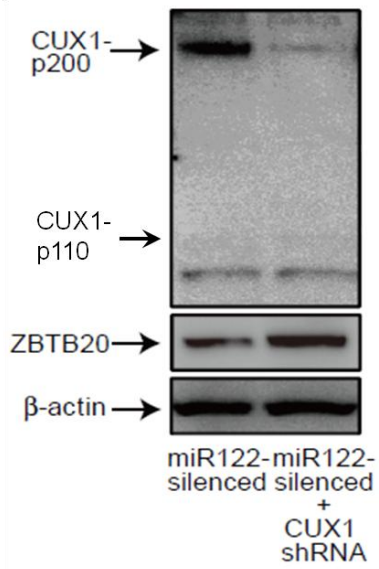
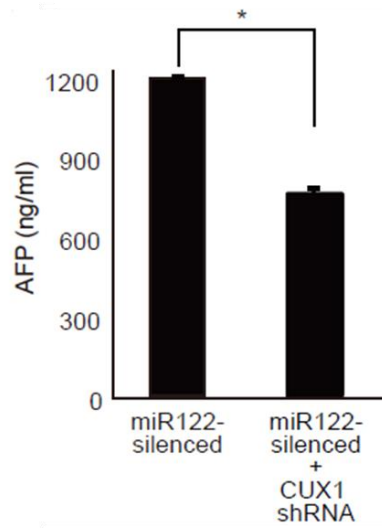
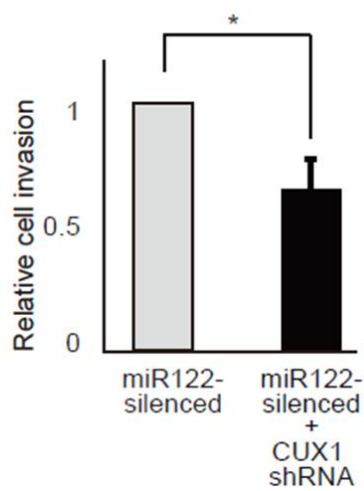
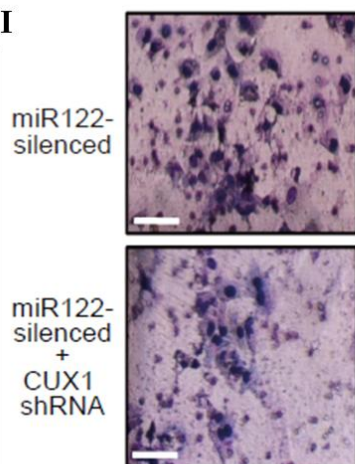
F**G****H****I**

図 4. CUX1 は miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株での表現型の制御因子である

- (A) TargetScan ver5.0 による miR122 の標的遺伝子候補の例。
- (B) miR122 の CUX1 3'UTR への結合能を検討するためのルシフェラーゼレポーターの構造。
- (C) ルシフェラーゼアッセイによる miR122 の CUX1 3'UTR への結合能の検討。
- (D) miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株での Western Blot 法による CUX1 タンパク質発現の検討。miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で CUX1 p200, p110 の発現増加を認めた。
- (E) miR122 強制発現細胞での Western Blot 法による CUX1 タンパク質発現の検討。miR122 強制発現 293T 細胞で CUX1 p200, p110 の発現低下と ZBTB20 発現増加を認めた。
- (F) miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株での定量 RT-PCR 法による CUX1 mRNA 発現の検討。コントロールと miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で発現に差は見られなかった。
- (G) miR122 の機能減弱かつ CUX1 発現を抑制した (shCUX1) Huh7 細胞における Western Blot 法による CUX1 発現抑制の確認および ZBTB20 の発現変化の検討。
- (H) miR122 の機能減弱かつ CUX1 発現を抑制した (shCUX1) Huh7 細胞における ELISA 法による培養液中の AFP 値の検討。miR122 の機能減弱かつ CUX1 発現を抑制した Huh7 細胞で AFP 値の低下が認められた。* $P < 0.01$ 。
- (I) miR122 の機能減弱かつ CUX1 発現を抑制した (shCUX1) Huh7 細胞におけるマトリゲル浸潤アッセイによる浸潤能の検討。miR122 の機能減弱かつ CUX1 発現を抑制した Huh7 細胞で有意な浸潤細胞数の減少が認められた。Scale bar 100 μm , * $P < 0.01$ 。

5) CUX1 は miR214 を介して ZBTB20 の発現を制御する

CUX1 が ZBTB20 を制御する機序について検討した。前述の通り CUX1 は転写調節因子でもあり, *in silico* での検討では ZBTB20 の転写を直接制御している可能性も考えられたが, 定量 RT-PCR 法にて miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞における ZBTB20 mRNA の発現量に変化を認めなかった(図 5A)。miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株での ZBTB20 のタンパク質レベルと mRNA レベルでの発現の解離を説明できる現象は, miRNA による標的遺伝子の制御時のみであるため, CUX1 が他の miRNA の転写促進を介して ZBTB20 の発現調節を行っている可能性を考えた。

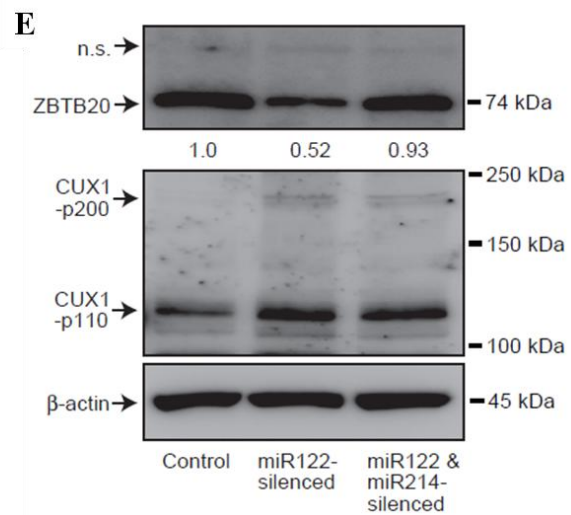
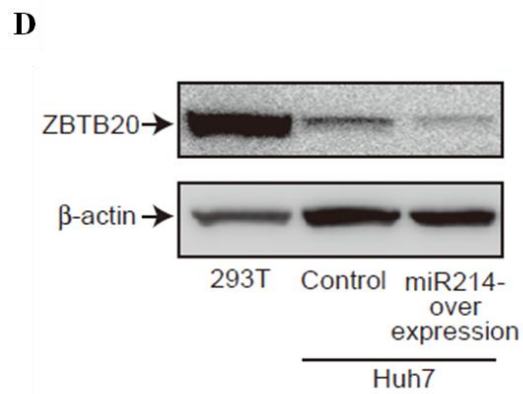
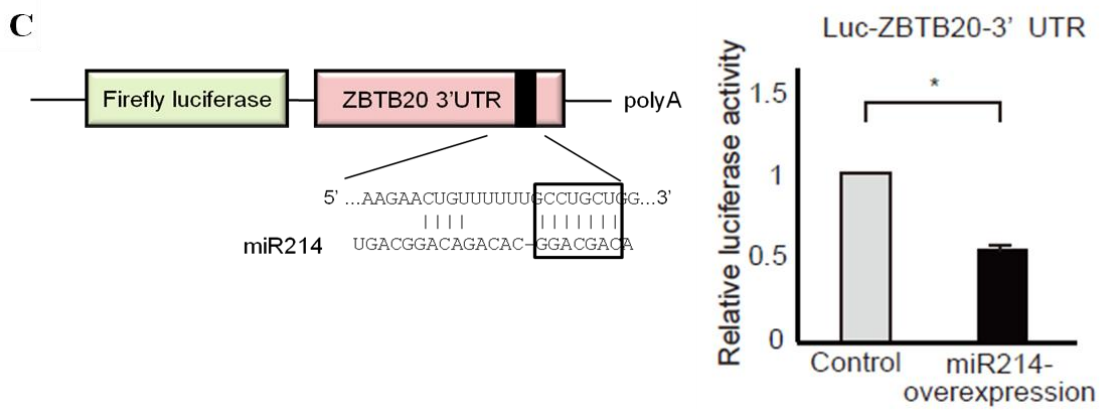
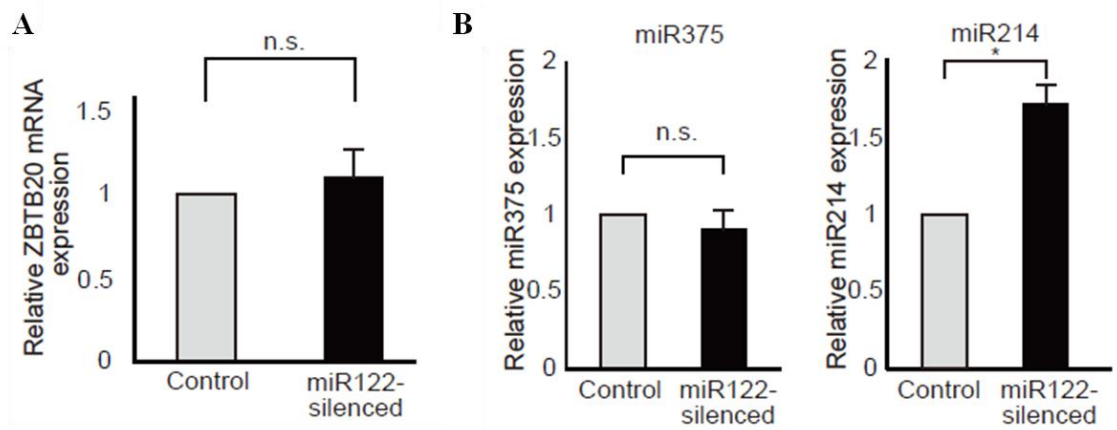
TargetScan ver5.0 を用いた *in silico* での検討で, ZBTB20 を標的遺伝子とする miRNA として miR375 と miR214 が候補に挙げられたため, 定量 RT-PCR 法を用いてその発現量を検討したところ, miR375 の発現量にはコントロールと miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で差が認められなかったが, miR214 については miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞において発現量の増加が認められた(図 5B)。そこで, ZBTB20 が miR214 の標的遺伝子であることを確認するため, miR214 の結合部位を含む ZBTB20 の 3' 非翻訳領域配列をルシフェラーゼ遺伝子下流に発現するレポータープラスミド (Luc-ZBTB20-3' UTR) を作成し, miR214 の結合能をルシフェラーゼアッセイ法で検討したところ, miR214 の強制発現によってルシフェラーゼ活性の低下が認められ(図 5C), ZBTB20 は miR214 の標的遺伝子であることが示された。Western Blot 法にてタ

ンパク質レベルでも miR214 の強制発現による ZBTB20 の発現低下が確認された(図 5D)。また, miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞において miRZip-214 レンチベクターを用いて miR214 の機能を減弱すると, Western Blot 法にて CUX1 の発現には変化が見られなかったが, ZBTB20 の発現増加が認められたことから(図 5E), miR214 が CUX1 の下流側で ZBTB20 の発現制御を行っていることも示された。

続いて, CUX1 が miR214 の制御に関与することを検証するため, ヒト乳癌細胞株である Hs578T に CUX1 発現を抑制した (shCUX1) 細胞および CUX1 p110 を強制発現させた細胞を用いて, 定量 RT-PCR 法にて miR214 の発現を検討した。miR122 の機能減弱で発現が増加した CUX1 のアイソフォームは p200 と p110 であったが, このうち転写促進的に働くのが p110 のアイソフォームのみであるため(43), CUX1 p110 と miR214 発現の関係について検討した。その結果, 前者では miR214 の発現低下が認められたが(図 5F), 後者では miR214 の発現増加が認められ(図 5G), CUX1 発現に連動した miR214 の発現変化が確認された。同様に, ドキシサイクリン存在下で CUX1 発現が抑制される (shCUX1 を発現する) Hs578T 細胞を樹立し, ドキシサイクリン存在下および非存在下での経時的な miR214 の発現変化を定量 RT-PCR 法にて検討した。ドキシサイクリン存在下で低下した miR214 発現が, ドキシサイクリン非存在下での培養開始後 CUX1 発現の回復とともに, miR214 発現も回復していることが示された(図 5H)。最後に, CUX1 が miR214 の転写促進因子であることを証明するため, MATCH

(<http://www.gene-regulation.com>)を用いた *in silico* での検討にて miR214 のプロモーター領域で CUX1 が結合可能な部位を検索し, Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) アッセイを用いて定量 PCR 法で解析した。その結果, miR214 の上流 3000~500 塩基の間に CUX1 と複数箇所の直接的結合が証明された(図 5I)。

以上の結果から, miR122 の標的遺伝子である CUX1 が miR214 の転写促進的に働く調節因子であり, miR122/CUX1/miR214/ZBTB20 の経路を介して AFP 発現を調節する可能性が示された。



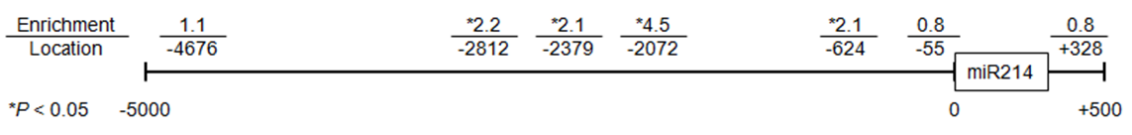
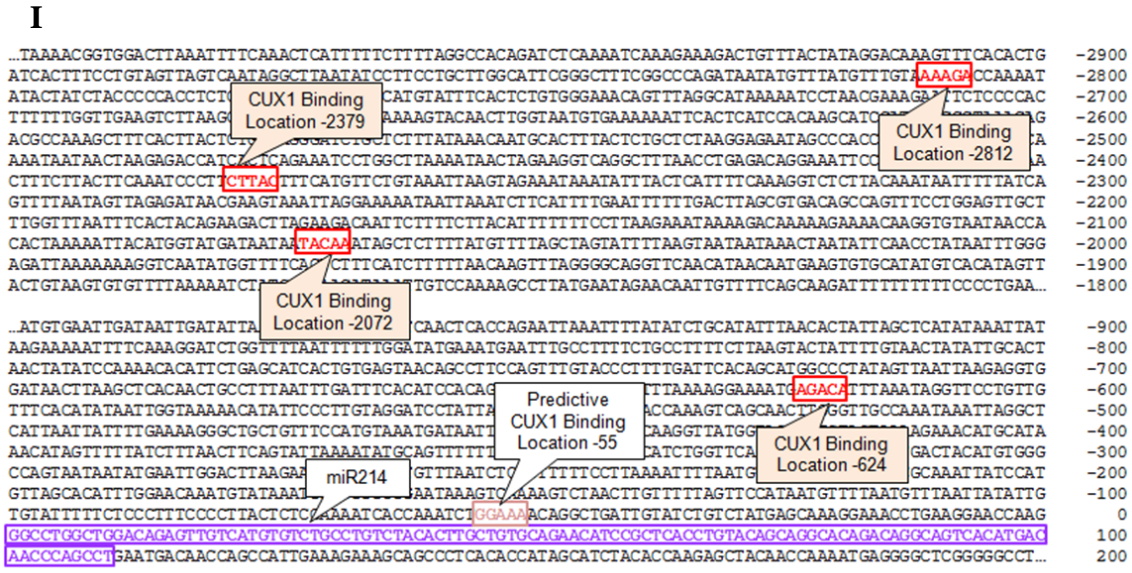
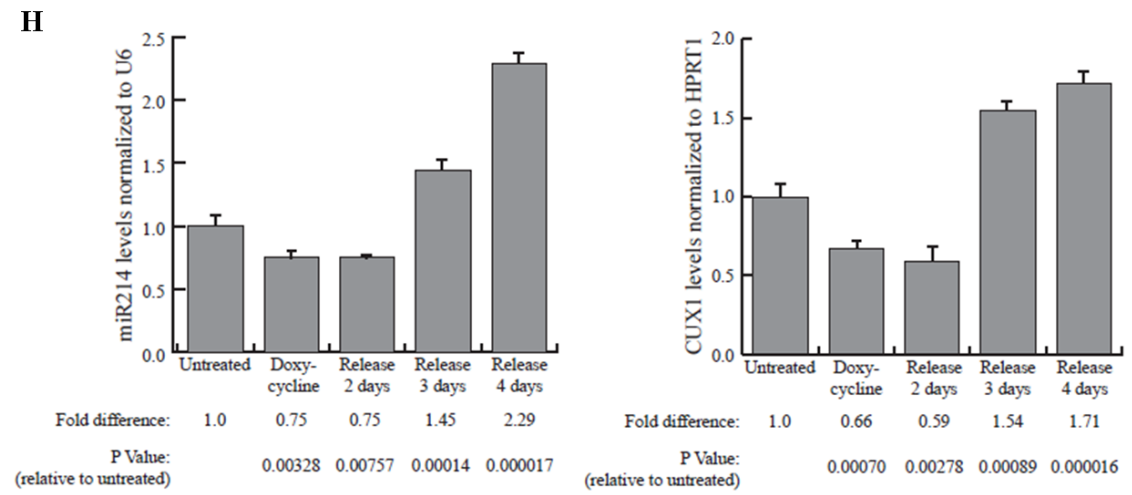
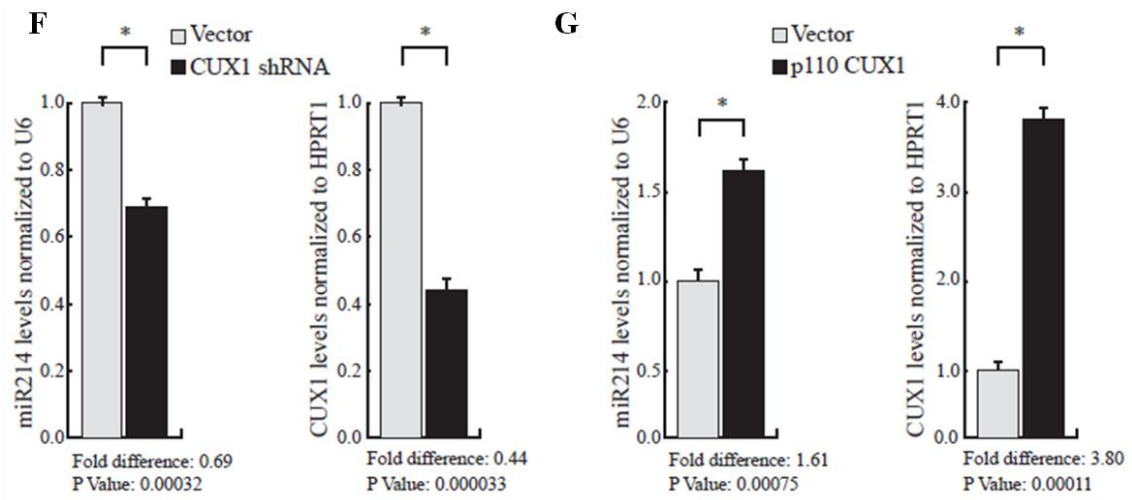


図 5. CUX1 は miR214 を介して ZBTB20 の発現を制御する

- (A) 定量 RT-PCR 法による ZBTB20 mRNA 発現の検討。コントロールと miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で ZBTB20 発現に差が認められなかった。
- (B) 定量 RT-PCR 法による miR375 および miR214 発現の検討。コントロールと miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で miR375 発現に差は認めなかったが、miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞で有意な miR214 発現増加が認められた。
* $P < 0.05$ 。
- (C) ルシフェラーゼアッセイによる miR214 強制発現時の ZBTB20 転写活性の検討。miR214 強制発現によって転写活性の低下が見られた。
* $P < 0.05$ 。
- (D) Western Blot 法による miR214 強制発現時の ZBTB20 タンパク質発現の検討。miR214 強制発現 Huh7 細胞にて ZBTB20 の発現低下が認められた。
- (E) Western Blot 法による miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株での miR214 機能減弱時の ZBTB20 タンパク質発現の検討。miR122/miR214 の機能を減弱した Huh7 細胞で ZBTB20 の発現増加が見られたが、CUX1 発現には差が見られなかった。
- (F) 定量 RT-PCR 法による Hs578T 細胞での CUX1 発現抑制 (shCUX1) 時の CUX1 および miR214 発現の検討。Hs578T shCUX1 細胞にて CUX1 発現低下とともに miR214 発現の低下が認められた。
* $P < 0.01$ 。
- (G) 定量 RT-PCR 法による Hs578T での CUX1 p110 強制発現時の CUX1 および miR214 発現の検討。Hs578T CUX1 p110 強制発現細胞にて CUX1 発現増加とともに miR214 発現増加が認められた。
* $P < 0.01$ 。
- (H) 定量 RT-PCR 法によるドキシサイクリン依存性 Hs578T shCUX1 細胞での CUX1 および miR214 発現の検討。ドキシサイクリン添加中止後、CUX1 発現回復とともに miR214 発現も連動して増加している。
* $P < 0.01$ 。
- (I) ChIP アッセイによる miR214 プロモーター領域への CUX1 結合能の検討。定量 PCR による解析で miR214 の上流 3000~500 塩基の間に CUX1 と 4 箇所の結合部位が同定された。
* $P < 0.05$ 。

6) miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウスでの検討

In vitro で認められた miR122 による浸潤能および AFP 発現調節メカニズムについて *in vivo* での検証を行うため、H1 プロモーター下流に miR122 のアンチセンスを導入し(44), 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(図 6A), 野生型と合わせて各 3 匹について表現型を解析した。Hematoxylin-Eosin (HE) 染色では, 野生型 (WT) と miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウス (anti- miR122 Tg マウス) の肝臓に組織学的変化は認められなかった(図 6B)。また, *in situ* hybridization 法により, anti-miR122 Tg マウスにおいて miR122 の機能が抑制されたことを確認した(図 6C)。次に, 定量 RT-PCR 法を用いて肝臓における AFP 発現を検討したところ, 野生型 (WT) と比べて anti-miR122 Tg マウスで約 8 倍の AFP 発現増加を認めた(図 6D)。続いて, Western Blot 法にて肝臓における CUX1, ZBTB20 の発現を検討したところ, 野生型 (WT) と比べて anti-miR122 Tg マウスで CUX1 の発現増加と ZBTB20 の発現低下を認めた(図 6E)。最後に, 肝臓における miR214 の発現を定量 RT-PCR 法で検討したところ, 野生型 (WT) と比べて anti-miR122 Tg マウスで miR214 の発現増加を認めた(図 6F)。

以上の結果から, *in vivo* でも miR122/CUX1/miR214/ZBTB20 による AFP 発現調節経路が示された。

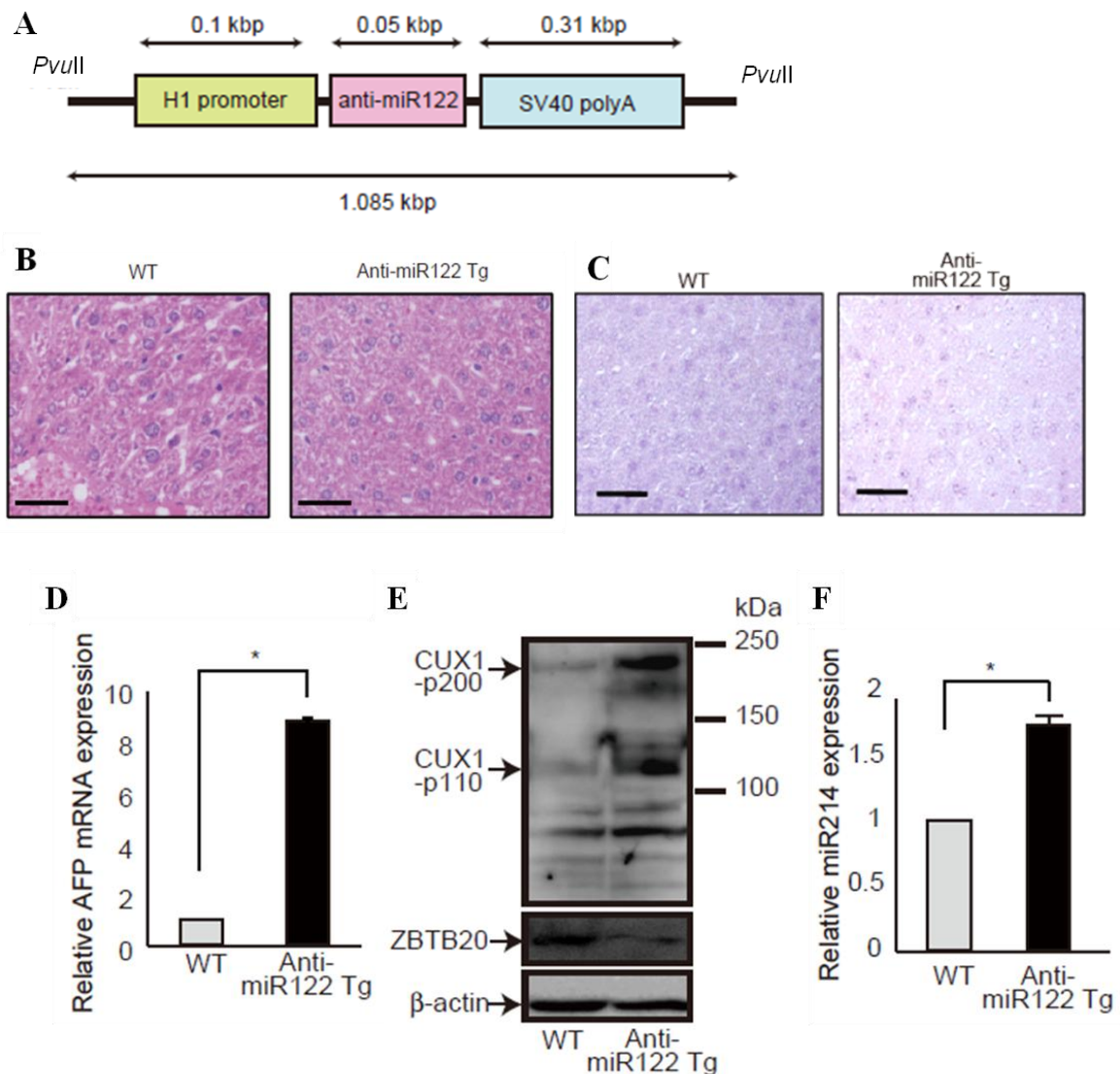


図 6. miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウスでの検討

- (A) miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウス作製に用いた DNA 断片構造。
- (B) miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウス (Anti-miR122 Tg マウス) の肝組織 (HE 染色)。コントロール (WT) と比べて組織学的変化は見られなかった。
- (C) *in situ* hybridization 法による miR122 の発現検討。Anti-miR122 Tg マウスで miR122 の機能減弱を確認。
- (D) 定量 RT-PCR 法による肝臓での AFP 発現の検討。Anti-miR122 Tg マウスで約 8 倍の AFP 発現増加が見られた。* $P < 0.05$ 。
- (E) Western Blot 法による肝臓での CUX1, ZBTB20 発現の検討。Anti-miR122 Tg マウスで CUX1 発現増加と ZBTB20 発現低下が認められた。
- (F) 定量 RT-PCR 法による肝臓での miR214 発現の検討。Anti-miR122 Tg マウスで miR214 の発現増加が認められた。* $P < 0.05$ 。

7) 同所異種移植モデルを用いた *in vivo* での浸潤能の検討

miR122 機能減弱による *in vivo* での浸潤能を検証するため、コントロールおよび miR122 の機能を減弱した PLC/PRF/5 細胞をヌードマウスの肝被膜下に移植した(図 7A)。移植する肝癌細胞株に PLC/PRF/5 を選択した根拠として、ヌードマウスへの優れた可植性があるためである(45)。miR122 の機能を減弱した PLC/PRF/5 細胞を移植したヌードマウスの肝臓では、血管内への腫瘍浸潤が認められた(図 7B)。

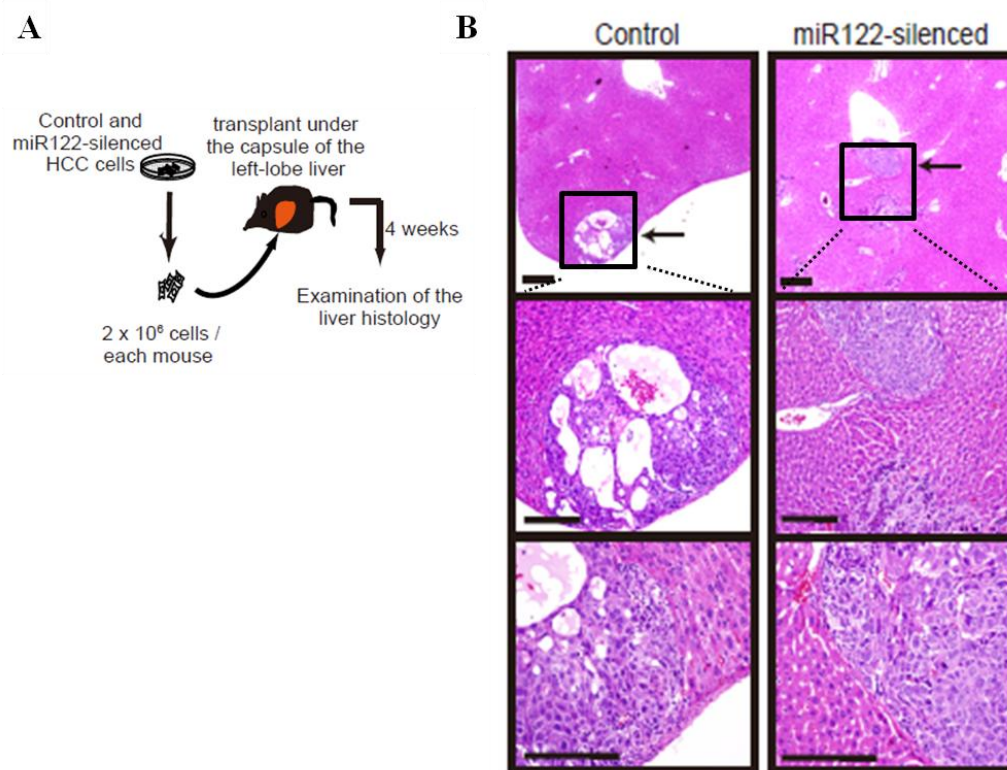


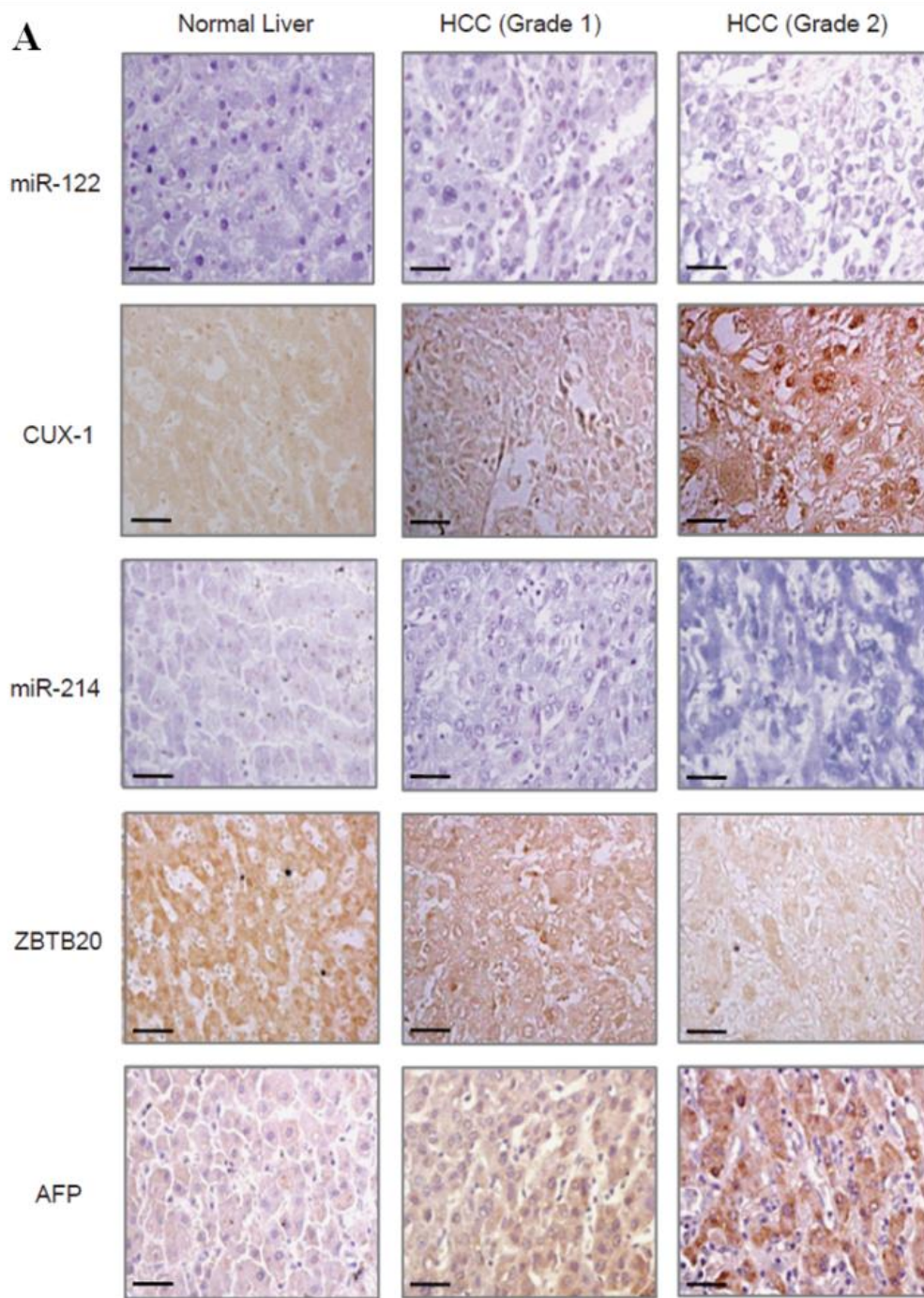
図 7. 同所異種移植モデルを用いた *in vivo* での浸潤能の検討

(A) 同所異種移植モデルの概要。

(B) 移植 4 週間後の腫瘍浸潤の評価 (HE 染色)。miR122 の機能を減弱した PLC/PRF/5 細胞を移植したヌードマウスの肝臓では、血管内への腫瘍浸潤が認められた。

8) ヒト臨床肝癌組織を用いた miR122 と AFP 発現, 肝癌悪性度の関連の検討

In vitro およびマウスモデルで実証された miR122 と AFP 発現, 肝癌悪性度の関連を臨床的に検証するため, ヒトの正常肝および分化度の異なる肝細胞癌サンプルの載った組織アレイを用いて *in situ* hybridization 法で miR122 および miR214 の発現を, 免疫組織染色法で AFP, CUX1, ZBTB20 の発現を検討した。サンプル 120 例の内訳は, 正常肝 10 例, 肝細胞癌 95 例 (Grade1: 高分化型癌 10 例, Grade2: 中分化型癌 66 例, Grade3: 低分化型癌 19 例), 胆管細胞癌 15 例であり, 胆管細胞癌については解析対象から外した。また, 今回用いた組織アレイの付与情報から悪性度の指標として分化度を用いた。正常肝組織では, miR122 の発現が保たれ, AFP 発現も認められなかったが, 肝細胞癌の分化度が下がる (悪性度が上がる) につれて miR122 の発現低下と連動した AFP 発現の増加が認められた (図 8A)。また, miR122 の発現が低下している低分化度の肝細胞癌で, CUX1 および miR214 の発現増加傾向が認められるとともに, ZBTB20 の発現低下傾向が認められた (図 8A, 8B)。ヒト臨床肝癌組織での miR122 と AFP 発現の相関性を検証するため, 肝細胞癌の組織アレイ 54 例 (Grade1: 高分化型癌 9 例, Grade2: 中分化型癌 36 例, Grade3: 低分化型癌 9 例) を追加検討し (計 149 例), Spearman の順位相関関数検定を用いて相関性を検討した。その結果, miR122 と AFP 発現に逆相関が認められ (図 8C), miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株およびトランスジェニックマウスでの検証結果を裏付ける結果が得られた。



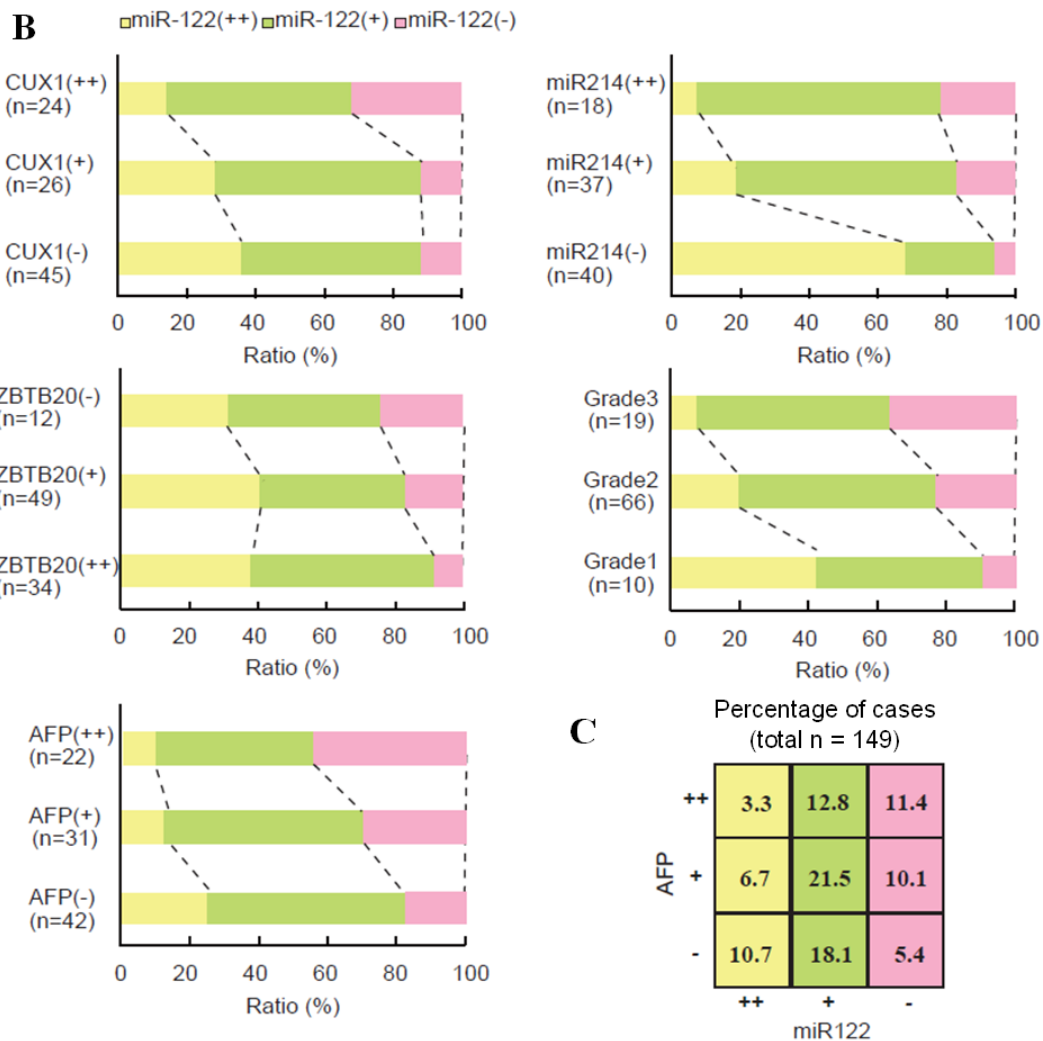


図 8. ヒト臨床肝癌組織を用いた miR122 と AFP 発現, 肝癌悪性度の関連の検討
 (A) 正常肝および肝癌分化度別の *In situ hybridization* 法 (miR122, miR214) および免疫組織染色法 (AFP, CUX1, ZBTB20) による発現検討。
 (B) miR122 発現レベルで分類した肝癌分化度および AFP, miR214, CUX1, ZBTB20 発現の解析 (計 95 例)。
 (C) ヒト臨床肝癌組織における miR122 と AFP 発現の関係 (計 149 例)。miR122 の発現が低下するにつれて AFP 発現の増加が認められた。* $P < 0.05$ (Spearman の順位相関関数検定)。

5. 考 察

miR122は成人の肝臓で最も豊富に発現している miRNA として知られ、肝臓における全 miRNA 発現の約 80%を占めている(11)。肝臓における miR122 の機能として、これまで脂質代謝への関与(12,13)や C 型肝炎ウイルス(HCV)の増殖(46)、肝臓での恒常性の維持などが報告されている(14)が、肝臓における癌と miR122 の関係については、肝細胞癌において miR122 の発現が低下していることが、ラットモデルおよびヒト肝癌検体を用いた検討で初めて報告された(16)。その後、肝癌における miR122 発現低下と肝癌の悪性度について検討した報告も散見されるようになったが(17,18)、その機序について十分に解明されたとは言い難く、miR122 が肝癌抑制的に作用するのは確かであるが、その生物学的意義については未知数である。

一方、肝細胞癌の血清腫瘍マーカーとして広く用いられている AFP の上昇は、臨床的に肝細胞癌における生物学的な癌の悪性度と関連が見られ、例えば門脈浸潤や肝内転移を伴う進行肝癌患者では通常 AFP 上昇を伴っていることが多い(47)。加えて、このような患者では、無再発生存期間も全生存期間も不良であるのが実情である(48)。しかしながら、高悪性度の肝細胞癌で AFP が上昇する機序について分子生物学的に検討した既報はこれまでなく、本研究において肝細胞癌における miR122 の発現低下が、悪性度増加と AFP 上昇をもたらすという、臨床的に関連がある 2 つの現象を結びつける結果が初めて分子生物学的に明らかにされた。その根拠として、最初に

miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株およびマウスを用いた検討において AFP 発現の増加と肝癌浸潤能の亢進が認められた点が挙げられる。次に、悪性腫瘍の浸潤に関与する CUX1 が AFP の発現制御に関わり、かつ miR122 の標的遺伝子であることを見出した点が挙げられる。3 番目に、ヒトの肝癌臨床組織において miR122 発現と AFP 発現、および miR122 発現と肝癌の悪性度に逆相関が見られることを明らかにした点が挙げられる。この逆相関の結果のみでは、肝細胞癌における AFP 上昇と悪性度の増加が偶然の付帯事象に過ぎない点があるのは否定できないが、今回の研究によって肝細胞癌において miR122 の発現が低下することで AFP と悪性度が同時に増加することへの分子生物学的な説明を与えたことは間違いない。また、AFP は肝癌でのみならず、胎生期の肝臓(肝前駆細胞)でも発現が見られる。本研究では、胎生期の肝臓における miR122 と AFP 発現の相関については未検討であるが、既報では胎生期マウスの肝臓における miR122 発現は成体より少なく、さらに胎生期初期の肝臓でほとんど発現が見られない miR122 が胎生期後期にかけてその発現が徐々に増加することからも(49,50)、胎生期における肝臓での AFP 発現調節にも miR122 が後述する CUX1 を介して関与している可能性が示唆される。実際、miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウスの成体の肝臓では AFP の発現増加が見られた。

最近の研究で、HNF4 α などの肝特異的転写調節因子が、miR122 の発現促進により、標的遺伝子である CUX1 の発現を抑制することで肝臓の分化に関わっていること

が明らかにされたが(49), 本研究でも CUX1 が miR122 の標的遺伝子であることを確認するとともに, miR122 発現が低下している高悪性度の肝癌で CUX1 発現が増加していることを明らかにした。CUX1 の発現増加が, 進行乳癌において予後の悪化と関連があることも報告されている(51)。また, トランスジェニックマウスモデルの検討で CUX1 は, そのアイソフォームや臓器によって癌に関連する様々な異常をもたらすことも報告されている(43,52-55)。CUX1 の癌における根本的な役割は複雑であり, 細胞自律的および非自律的な効果の両者に関与するものと考えられる。しかしながら, 細胞ベースでの検討からは, CUX1 が細胞運動性, 細胞周期の促進, 染色体の分離という少なくとも 3 つの明確な過程において役割を果たしている(39,40,56,57)。また, siRNA による CUX1 発現の抑制により, 細胞周期における S 期への流入が遅くなり, 細胞運動性や浸潤能が妨げられるが(40,57), 逆に CUX1 p110 を強制発現すると, S 期への流入が加速し, 細胞増殖や浸潤が促進される(40,57)。加えて, CUX1 が細胞質分裂の失敗により, ゲノムの不安定性を促進させることも示されている(39)。

AFP 遺伝子の発現調節に関しては, 抑制因子として p53(35)や β -catenin(36)の存在が知られているが, 最近の報告で ZBTB20 が AFP の強力な発現抑制因子であることがノックアウトマウスモデルを用いた検討にて明らかにされた(37)。本研究では, miR122 発現の低下に付随して ZBTB20 の発現低下が生じることを明らかにした。この現象は CUX1 の発現増加によるものであり, miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株で

CUX1 の発現も抑制すると ZBTB20 の発現が回復するとともに、AFP の発現も低下した。さらに、CUX1 発現を抑制した肝癌細胞株で ZBTB20 の発現増加が見られたことから、ZBTB20 の発現が CUX1 によって制御されることが明らかになった。この miR122/CUX1/miR214/ ZBTB20 による発現調節経路は、肝細胞癌で認められる AFP 発現増加を説明するものであり、加えて CUX1 による RhoA の活性化や細胞運動性に関わる蛋白の発現調節が、肝細胞癌における浸潤能の増加という現象を説明するものとなっている(図 9)(33-38)。

本研究では、miR122 発現が低下した肝癌における AFP の上昇と悪性度の増加という 2 つの現象を制御する因子として CUX1 を同定したが、悪性度増加という観点からは別の機序による制御も当然考慮される。例えば、最近の報告で正常幹細胞同様に悪性腫瘍でも自己複製能と多分化能を有する癌幹細胞の存在が明らかになっている(58)。肝細胞癌においては、CD13⁺細胞、CD90⁺/CD45⁻細胞、CD133⁺細胞、EpCAM⁺/AFP⁺細胞などが、癌幹細胞の性格を有する細胞として報告されており(59)、これら表面マーカーの発現を定量 RT-PCR 法で検討したところ、miR122 の機能を減弱した Huh7 細胞にて EpCAM 発現増加が認められた(data not shown)。本研究で示した通り、miR122 の発現低下で AFP 発現は増加するため、miR122 の発現低下が癌幹細胞としての性格を有する EpCAM⁺/AFP⁺肝癌細胞の増加をもたらし、肝癌の悪性度増加に関与している可能性も考えられる。また、本研究では肝細胞癌における

miR122 の発現低下が悪性度の増大に関わることを示したが、肝臓における miR122 の発現低下自体に発癌能力があるかどうかはまだ明らかにされていない。今回の研究で用いた miR122 の機能を減弱したトランスジェニックマウスでは、短期間での観察では肝臓の自然発生は見られていないものの、発癌能力の検討のためにはさらに長期間の観察が必要であると考えられる。

以上をまとめると、本研究において肝臓における miR122 の発現低下が、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を明らかにした。さらには、これらの現象が miR122 の標的遺伝子である CUX1 を介して制御されていることを明らかにした(60)。本研究の結果から、肝臓における悪性度と AFP 発現を規定する因子である miR122 が、将来的に進行肝臓癌に対する治療標的となりうる可能性が示唆された。

肝細胞癌

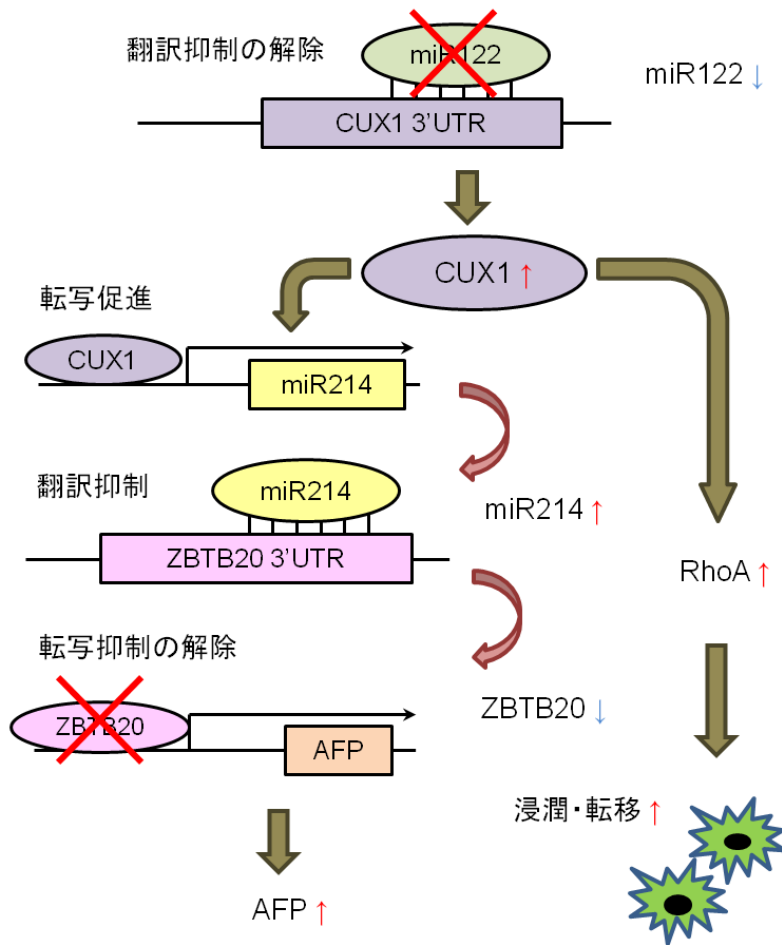


図 9. 肝癌における miR122 発現低下が悪性度増加と AFP 上昇をもたらす機序

6. 結 語

本研究では、miR122 の機能を減弱した肝癌細胞株およびトランスジェニックマウス、同所異種移植モデル、ヒト肝癌臨床組織による検討から、肝癌における miR122 の発現低下が標的遺伝子である CUX1 を介して肝癌の悪性度および AFP 発現を増加させることを明らかにした。この結果から、臨床的に高悪性度の肝癌がしばしば AFP 高値であることへのひとつの機構を提示したと言え、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、将来的に進行肝癌に対する治療標的として考慮すべき可能性が示唆された。

3' UTR	3' untranslated region
AFP	α -fetoprotein
α -SMA	α -smooth muscle actin
ATCC	American Type Culture Collection
ChIP	chromatin immunoprecipitation
DIG	digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
HCC	hepatocellular carcinoma
HNF4 α	hepatocyte nuclear factor 4 α
JCRB	Japanese Collection of Research Bioresources
LNA	locked nucleic acid
miRNA	microRNA
OD	optical density
PBS	phosphate buffered saline
RISC	RNA-induced silencing complex
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SSC	standard saline citrate
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZBTB20	zinc finger and BTB domain- containing protein 20

表 2. 略語集

7. 参考文献

1. Parkin D, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **55**, 74–108, 2005.
2. El-Serag H. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatol. Res.* **37**, S88–94, 2007.
3. Llovet J, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **359**, 378–390, 2008.
4. Greten T, Papendorf F, Bleck JS, Kirchhoff T, Wohlberedt T, Kubicka S, Klempnauer J, Galanski M, Manns M. Survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of 389 patients. *Br. J. Cancer* **92**, 1862–1868, 2005.
5. Greten T, Korangy F, Manns M, Malek N. Molecular therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* **100**, 19–23, 2009.
6. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854, 1993.
7. Carrington J, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**, 336–338, 2003.
8. Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**,

281–297, 2004.

9. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350–355, 2004.

10. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR.

MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838, 2005.

11. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A,

Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S,

Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J,

Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI,

Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G,

Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W,

Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T.

A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing.

Cell **129**, 1401–1414, 2007.

12. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel

M. Silencing of microRNAs *in vivo* with ‘antagomirs’. *Nature* **438**, 685–689, 2005.

13. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL,

Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF,

- Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metab.* **3**, 87–98, 2006.
14. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, Ruskeepaa AL, Oresic M, Esau CC, Zdobnov EM, Schibler U. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev.* **23**, 1313–1326, 2009.
15. Yan D, Dong Xda E, Chen X, Wang L, Lu C, Wang J, Qu J, Tu L. MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J. Biol. Chem.* **284**, 29596–29604, 2009.
16. Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J. Cell. Biochem.* **99**, 671–678, 2006.
17. Coulouarn, C., Factor, V., Andersen, J., Durkin, M, Thorgeirsson, S. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* **28**, 3526–3536, 2009.
18. Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, Chau GY, Lin CW, Chen CM, Lin CD, Liao YL, Wang JL, Chau YP, Hsu MT, Hsiao M, Huang HD, Tsou AP. MicroRNA-122 a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular

carcinoma. *Hepatology* **49**, 1571–1582, 2009.

19. Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **47**, 1223–1232, 2008.

20. Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* **275**, 34122–34130, 2000.

21. Zhou Y, Rideout WM 3rd, Zi T, Bressel A, Reddypalli S, Rancourt R, Woo JK, Horner JW, Chin L, Chiu MI, Bosenberg M, Jacks T, Clark SC, Depinho RA, Robinson MO, Heyer J. Chimeric mouse tumor models reveal differences in pathway activation between ERBB family- and KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Nat. Biotechnol.* **28**, 71–78, 2010.

22. Harada R, Vadnais C, Sansregret L, Leduy L, Bérubé G, Robert F, Nepveu A. Genome-wide location analysis and expression studies reveal a role for p110 CUX1 in the activation of DNA replication genes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 189–202, 2008.

23. Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjörn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*

452, 896–899, 2008.

24. Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J. Biol. Chem.* **284**, 32015–32027, 2009.

25. Yao X, Hu JF, Daniels M, Yien H, Lu H, Sharan H, Zhou X, Zeng Z, Li T, Yang Y, Hoffman AR. A novel orthotopic tumor model to study growth factors and oncogenes in hepatocarcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2719–2726, 2003.

26. Kim M, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nat. Protoc.* **4**, 1670–1680, 2009.

27. Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, Veronese A, Ferracin M, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Croce CM, Tavorari S, Chieco P, Negrini M, Bolondi L. MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* **69**, 5761-5767, 2009.

28. Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol* **82**, 8215-8223, 2008.

29. Wong QW, Lung RW, Law PT, Lai PB, Chan KY, To KF, Wong N. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology* **135**, 257–269, 2008.
30. Di Bisceglie A. Issues in screening and surveillance for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **127**, S104–S107, 2004.
31. Oishi K, Itamoto T, Amano H, Fukuda S, Ohdan H, Tashiro H, Shimamoto F, Asahara T. Clinicopathologic features of poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Oncol.* **95**, 311–316, 2007.
32. Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, Kume Y, Ikeda H, Norman GL, Shums Z, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, Kokudo N. AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC. *J. Gastroenterol.* **45**, 1272–1282, 2010.
33. Matsumoto Y, Suzuki T, Asada I, Ozawa K, Tobe T, Honjo I. Clinical classification of hepatoma in Japan according to serial changes in serum alpha-fetoprotein levels. *Cancer* **49**, 354–360, 1982.
34. Sahai E, Marshall C. RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 133–142, 2002.

35. Ogden SK, Lee KC, Wernke-Dollries K, Stratton SA, Aronow B, Barton MC. p53 targets chromatin structure alteration to repress alpha-fetoprotein gene expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 42057–42062, 2001.
36. Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations. *Int. J. Cancer.* **112**, 44–50, 2004.
37. Xie Z, Zhang H, Tsai W, Zhang Y, Du Y, Zhong J, Szpirer C, Zhu M, Cao X, Barton MC, Grusby MJ, Zhang WJ. Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 10859–10864, 2008.
38. Sansregret L, Nepveu A. The multiple roles of CUX1: insights from mouse models and cell-based assays. *Gene* **412**, 84–94, 2008.
39. Sansregret L, Vadnais C, Livingstone J, Kwiatkowski N, Awan A, Cadieux C, Leduy L, Hallett MT, Nepveu A. Cut homeobox 1 causes chromosomal instability by promoting bipolar division after cytokinesis failure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 1949–1954, 2011.
40. Kedinger V, Nepveu A. The roles of CUX1 homeodomain proteins in the

establishment of a transcriptional program required for cell migration and invasion.

Cell Adh. Migr. **4**, 348–352, 2010.

41. Michl P, Knobel B, Downward J. CUTL1 is phosphorylated by protein kinase A, modulating its effects on cell proliferation and motility. *J. Biol. Chem.* **281**, 15138–15144, 2006.

42. Seguin L, Liot C, Mzali R, Harada R, Siret A, Nepveu A, Bertoglio J. CUX1 and E2F1 regulate coordinated expression of the mitotic complex genes Ect2, MgcRacGAP, and MKLP1 in S phase. *Mol. Cell Biol.* **29**, 570–581, 2009.

43. Kedinger V, Sansregret L, Harada R, Vadnais C, Cadieux C, Fathers K, Park M, Nepveu A. p110 CUX1 homeodomain protein stimulates cell migration and invasion in part through a regulatory cascade culminating in the repression of E-cadherin and occludin. *J. Biol. Chem.* **284**, 27701–27711, 2009.

44. Kunath T, Gish G, Lickert H, Jones N, Pawson T, Rossant J. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat. Biotechnol.* **21**, 559–561, 2003.

45. Shouval D, Reid LM, Chakraborty PR, Ruiz-Opazo N, Morecki R, Gerber MA, Thung SN, Shafritz DA. Tumorigenicity in nude mice of a human hepatoma cell line containing hepatitis B virus DNA. *Cancer Res.* **41**, 1342–1350, 1981.

46. Jopling C, Yi M, Lancaster A, Lemon S, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577–1581, 2005.
47. Nomura F, Ohnishi K, Tanabe Y. Clinical features and prognosis of hepatocellular carcinoma with reference to serum alpha-fetoprotein levels. Analysis of 606 patients. *Cancer* **64**, 1700–1707, 1989.
48. Johnson P, Melia W, Palmer M, Portmann B, Williams R. Relationship between serum alpha-foetoprotein, cirrhosis and survival in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* **44**, 502–505, 1981.
49. Xu H, He JH, Xiao ZD, Zhang QQ, Chen YQ, Zhou H, Qu LH. Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development. *Hepatology* **52**, 1431–1442, 2010.
50. Zeng C, Wang R, Li D, Lin XJ, Wei QK, Yuan Y, Wang Q, Chen W, Zhuang SM. A novel GSK-3 beta-C/EBP alpha-miR-122-insulin-like growth factor 1 receptor regulatory circuitry in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **52**, 1702-1712, 2010.
51. Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, Warne PH, Wagner M, Poulson R, D'Arrigo C, Ryder K, Menke A, Gress T, Downward J. CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* **7**, 521–532, 2005.

52. Ledford AW, Brantley JG, Kemeny G, Foreman TL, Quaggin SE, Igarashi P, Oberhaus SM, Rodova M, Calvet JP, Vanden Heuvel GB. Deregulated expression of the homeobox gene Cux-1 in transgenic mice results in downregulation of p27(kip1) expression during nephrogenesis, glomerular abnormalities, and multiorgan hyperplasia. *Dev. Biol.* **245**, 157–171, 2002.
53. Brantley JG, Sharma M, Alcalay NI, Heuvel. GB. Cux-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis and interstitial fibrosis. *Kidney Int.* **63**, 1240–1248, 2003.
54. Cadieux C, Kedinger V, Yao L, Vadnais C, Drossos M, Paquet M, Nepveu A. Mouse mammary tumor virus p75 and p110 CUX1 transgenic mice develop mammary tumors of various histologic types. *Cancer Res.* **69**, 7188–7197, 2009.
55. Cadieux C, Harada R, Paquet M, Côté O, Trudel M, Nepveu A, Bouchard M. Polycystic kidneys caused by sustained expression of Cux1 isoform p75. *J. Biol. Chem.* **283**, 13817–13824, 2008.
56. Aleksic T, Bechtel M, Krndija D, von Wichert G, Knobel B, Giehl K, Gress TM, Michl P. CUTL1 promotes tumor cell migration by decreasing proteasome-mediated Src degradation. *Oncogene* **26**, 5939–5949, 2007.
57. Sansregret L, Goulet B, Harada R, Wilson B, Leduy L, Bertoglio J, Nepveu A. The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase.

Mol. Cell Biol. **26**, 2441–2455, 2006.

58. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* **66**, 9339-9344, 2006.

59. Liu LL, Fu D, Ma Y, Shen XZ. The Power and the Promise of Liver Cancer Stem Cell Markers. *Stem Cells Dev.* Aug 4, 2011.

60. Kojima K, Takata A, Vadrnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* **2**, 338, 2011.

8. 謝 辞

本論文の作成にあたり懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京大学医学部消化器内科小池和彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たりましては以下の先生方(敬称略)に特に多大なる御協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

Goodman Cancer Center and Departments of Oncology, Biochemistry and Medicine,
McGill University

Alain Nepveu, Charles Vадnais

Department of Pathophysiology, Second Military Medical University

Zhifang Xie, Weiping J. Zhang

東京大学医学部消化器内科

大塚 基之, 高田 朱弥, 吉田 晴彦