

## 肝臓の発生、再生、がん化を制御する microRNA

勝 田 毅, 落 谷 孝 広

小分子非翻訳 RNA である microRNA (miRNA) は、標的遺伝子のタンパク質への翻訳を阻害することで遺伝子発現を微調整し、個体発生や生体の恒常性維持など様々な生命現象を制御している。また、miRNA の発現異常は疾患の発生につながる事が報告されている。最近、肝臓研究においても、miRNA による制御機構の重要性が注目されつつある。これまで肝臓発生の研究では、増殖因子やサイトカインを介した分子機構に重点が置かれてきたが、これらに加え、miRNA による制御機構の寄与も明らかになってきた。また、肝臓特有の現象である再生においても、その各過程で miRNA が重要な役割を演じていることがわかってきた。さらに、miRNA が肝がんの発生や悪性化に関与していることも示され、miRNA を用いた治療や診断への期待が高まりつつある。本稿では、肝臓の「発生」、「再生」、「がん化」に着目し、それらの現象における miRNA の役割について我々の研究を交えて概説する。

## はじめに

microRNA (miRNA) は 1993 年に線虫で発見されて以降<sup>1)</sup>、動植物を含む様々な生物種で報告され、種々の生命現象の新たな鍵となる分子として注目されている。miRNA は 21~23 塩基の非翻訳 RNA であり、標的 mRNA に結合してそのタンパク質への翻訳を阻害する (図 1)。ゲノムから転写された miRNA 遺伝子は、Drosha と Dicer という二つの RNase によって切断された後、成熟 miRNA となる。成熟した miRNA は標的とする mRNA の主として 3' 側非翻訳領域に結合し、mRNA の分解あるいはペプチド鎖伸長抑制などにより、mRNA からタンパク質への翻訳を阻害する。ヒトにおいて現在 2,000 種近い miRNA が同定されており (miRBase, ver. 18)<sup>2)</sup>、これらの miRNA が、タンパク質をコードする遺伝子の約 3 分の 1 の発現を

制御していると推定されている。また、1 種の miRNA が標的とする mRNA が複数存在する一方で、1 種の mRNA の 3' 側非翻訳領域には複数の miRNA 結合部位がある。このように、細胞内には極めて複雑な制御ネットワークが存在することから、miRNA は、まさに遺伝子発現の「ファインチューナー」として細胞内環境を精巧に制御しているといえる。

最近の研究で、個体の発生、生体の恒常性維持、発がんなど、幅広い生命現象に miRNA が関わっていることがわかってきた。細胞の分化、増殖、形態形成といった生理現象は、時空間的に極めて精密に制御されている。これまで、これらの現象を支配しているのは専ら増殖因子やサイトカインといったタンパク質と考えられてきたが、最近になって、miRNA も重要な役割を担っていることがわかってきた。一方、miRNA の発現異常が、がんの発生や悪性化につながることもわかってきた。正常細胞では、がん遺伝子とがん抑制遺伝子の発現のバランスが一定に保たれているが、このバランスが崩れるとがん化に至る。最近、様々ながんにおいて、がん遺伝子・がん抑制遺伝子を制御する miRNA の発現に異常があることが報告されている。

本稿では、肝臓の生命現象を制御する miRNA の役割について、最近明らかになってきた知見を中心に、我々の研

国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 (〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1)

microRNAs act as a fine-tuner of liver development, regeneration, and carcinogenesis

Takeshi Katsuda and Takahiro Ochiya (Division of Molecular and Cellular Medicine, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan)

究を交えて概説する。まず第1節では、肝臓の発生における miRNA の役割について概説する。第2節では、肝臓特

有の現象として知られる再生を取り上げ miRNA が果たす役割について概説する。第3節では、肝がんと miRNA の関連性について、その分子機序や miRNA の臨床応用の可能性について議論する。

### 1. 肝発生における miRNA

肝臓の発生を制御する miRNA の探索およびその制御機構について、この数年で研究が進んできた。これまで、肝臓における細胞分化や形態形成を制御する分子機構の理解にあたって、増殖因子やサイトカインを介した転写因子の活性化機構の解明に重点が置かれてきた。近年、これらの分子に加え、miRNA による制御機構の重要性が明らかになりつつある。miRNA による肝発生の制御機構が明らかになれば、肝発生物学のより深い理解につながるばかりでなく、幹細胞を用いた肝臓の再生医療実現に向けての重要な知見が得られることになる。本節では肝臓の発生機構について概観した後、miRNA の関連性について紹介する。

#### 1.1. 肝発生の概要

肝臓は胚発生の過程において、内胚葉を起源として形成される(図2)。着床後、原腸陥入に伴い、胚盤胞から内胚葉・中胚葉・外胚葉の三胚葉が形成される。このとき、トランスフォーミング増殖因子(transforming growth factor: TGF)-βスーパーファミリーに属する Nodal の濃度勾

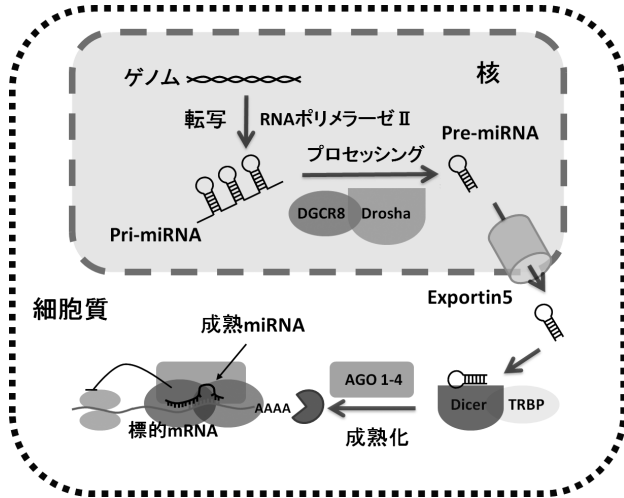


図1 miRNA の生合成経路と標的 mRNA の発現抑制機構の概要  
ゲノムから RNA ポリメラーゼによって転写された primary miRNA (pri-miRNA) は、核内で Drosha によるプロセッシングを受けて pre-miRNA となる。核外へと輸送された pre-miRNA はさらに Dicer によるプロセッシングを受けて成熟し、AGO タンパク質のファミリーを中心とする RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれて標的 mRNA と結合し、翻訳を抑制する。

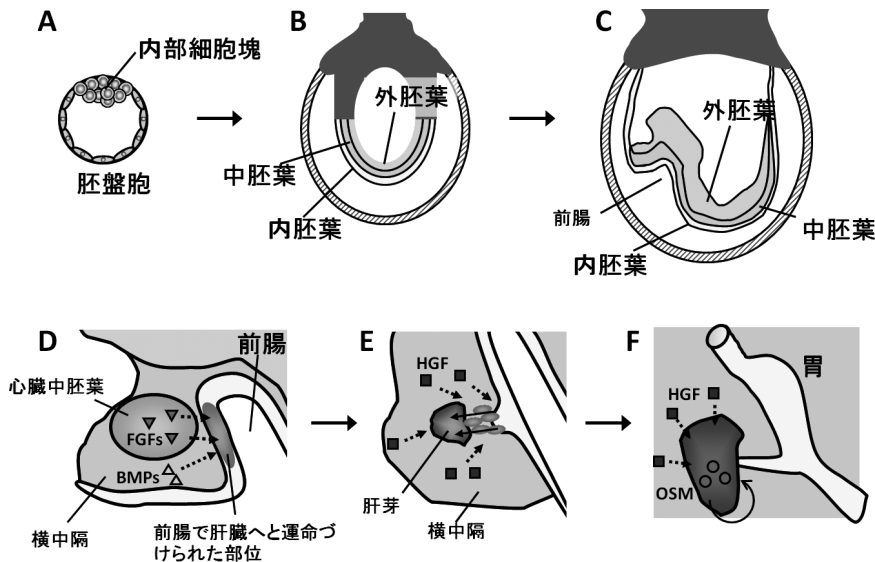


図2 肝発生の概要  
(A) 胚盤胞の一部である内部細胞塊が胚の基となる。(B) 着床後、内部細胞塊から外胚葉、中胚葉、内胚葉の三葉が形成される。(C) 内胚葉が、転写因子 FOXA2 と GATA4 の制御下で、前腸を形成してゆく<sup>8,9)</sup>。(D) 前腸の一部が肝臓の基となる肝芽を形成する。このとき、横中隔と心臓内胚葉からそれぞれ分泌される BMP, FGF の刺激が、前腸の内胚葉細胞を肝芽細胞へと運命づける<sup>10,11)</sup>。(E) 肝芽細胞が横中隔へと増殖と移動を続け、肝芽は次第に大きくなる。横中隔および肝芽細胞を取り囲む内皮細胞から分泌される HGF が、肝芽の成長に必須の役割を担う<sup>12,13)</sup>。(F) 肝芽自身から分泌されるオンコスタチン M (OSM) が、HGF と協調しながら、胎児肝細胞の分化を促し、肝臓を成熟化へと導く<sup>14,15)</sup>。(※図はマウスをモデルとしている。)

配に依存して三胚葉分化が起こり、高濃度の Nodal による刺激が内胚葉への分化を誘導する。内胚葉からは腸管が形成され<sup>3,4)</sup>、その一部である前腸が、周辺組織からの刺激を受け、肝臓の前駆組織である肝芽を発生させる<sup>5)</sup>。肝芽を形成するのは肝芽細胞と呼ばれる肝前駆細胞である。この細胞は、肝細胞と胆管上皮細胞の両細胞への分化能と高い増殖能を併せ持つ。肝芽細胞は増殖を繰り返しながら肝臓を形成し、その後成熟過程を経て肝機能を獲得してゆく<sup>6)</sup>。

これらの一連の過程は、周辺組織および肝前駆細胞自身から分泌される様々なシグナル分子によって支配されている。そのようなシグナル分子として、増殖因子やサイトカインについて広く研究が行われてきた。実際、各段階で鍵となる分子と、それらの起源となる組織・細胞、そしてそれらが寄与するシグナル経路については深い理解が得られている<sup>7)</sup>。一方で、発生という非常に動的な現象が極めて精密に制御されていることを考えると、そのファインチューナーとして miRNA が働いていることは容易に想像できる。miRNA による制御機構についての研究が進んできたのは 2000 年代後半と比較的最近のことであるが、徐々にその分子機序が明らかになってきた。

## 1.2. 肝芽細胞の運命決定を制御する miRNA

miRNA が実際に肝芽細胞の運命決定に寄与することが、複数のグループによって報告されている。Rogler らは、miR-23b が TGF- $\beta$  経路を制御することで、肝芽細胞の運命決定を大きく左右することを見いだした<sup>16)</sup>。一般的に、TGF- $\beta$  は細胞の増殖を抑制することが知られている。胎児肝では全域に渡り TGF- $\beta$  と TGF- $\beta$  受容体の両方が存在するにも関わらず、胆管上皮細胞に運命づけられた細胞だけが増殖を止めて胆管形成へと向かい、肝細胞に運命づけられた細胞は TGF- $\beta$  の刺激を回避して増殖を続けることが知られていた。彼らは、この TGF- $\beta$  への反応の違いに miRNA が関与しているかどうかを検討し、miR-23b の発現が胎児肝の実質部位で特異的に高いことを見いだした。そして実際に、この miRNA が TGF- $\beta$  の下流で機能する Smad をターゲットとして、実質部位の TGF- $\beta$  経路を不活性化していることを明らかにした。一方 Hand らは、マウスとゼブラフィッシュを用いた実験で、miR-30 が肝芽細胞の胆管形成に寄与することを明らかにした<sup>17)</sup>。彼らはマウスの miR-30 の発現が、胆管上皮細胞に特異的で、しかもその発現は E18.5 から新生仔の初期までの一時期に限られていることを発見した。また、ゼブラフィッシュを用いた実験では、胆管形成の時期に miR-30 を阻害すると胆管の形成不全が起こることを見いだした。さらに彼らはこの阻害実験から、miR-30 のターゲットとして、RNA-induced silencing complex (RISC) に必須な構成要素である Trinucleotide repeat containing (Tnrc) 6a を同定した。RISC は、miRNA や siRNA (低分子干渉 RNA) などの鋳

型となる短鎖 RNA と複数のタンパク質から構成される複合体で、鋳型 RNA をガイドとして標的 mRNA を認識し切断する。Tnrc6a の不活性化が胆管形成にどのような影響を与えているかは不明であるが、胆管形成時に広い範囲で miRNA の産生が抑制されるという事実は興味深い。

我々の研究室でも、miR-500 が胎仔期の肝臓発生に関与していることを見いだしている<sup>18)</sup>。山本らは、マウスの E14, 16, 18 の胎仔肝と、新生仔および成体肝の miRNA の発現を比較し、miR-500 と miR-346 が胎生期に発現が高く、肝臓の成熟化に従って発現が低下していくことを見いだした。miR-500 については、ヒトの場合でも、マウスと同様の発現パターンを取ることが確認されている。また、詳細については第 3 節で述べるが、もう一つの重要な発見として、miR-500 が肝がんのバイオマーカーとなる可能性が見いだされている。

## 1.3. 内胚葉分化に関わる miRNA

肝発生の初期、特に内胚葉の形成に関わる miRNA についても、断片的ながら報告が出てきている。Tzur らは ES 細胞に酪酸ナトリウムを加えて内胚葉への分化を誘導し、未分化 ES 細胞に比較してどのような miRNA の発現が増加するかを検討した<sup>19)</sup>。その結果、酪酸ナトリウム処理した細胞で、miR-24 と miR-10a の発現が増加することが確かめられた。miR-24 と miR-10a のターゲットはそれぞれ Notch1 と Homeobox A1 であり、いずれも内胚葉分化を阻害することが報告されている。Hinton らも同様に、ES 細胞を Activin の刺激下で内胚葉に分化する実験を行い、分化後に特異的に発現が上がる miRNA として miR-375 を<sup>20)</sup>、そのターゲットとして Translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A を同定している。ただし、これらの分子がどのような形で内胚葉分化に関わっているかについての詳細は明らかになっていない。内胚葉分化に関しては、重要な miRNA の同定およびその役割の解釈など、未解決の部分も多く残されている。

## 1.4. miRNA による肝発生制御における複雑性

ここまで、miRNA が肝発生の制御に寄与しうることを述べてきたが、一方で、miRNA は肝発生において必須ではないという報告もある。Hand らは肝発生における miRNA の重要性を検討するため肝特異的に Dicer をノックアウトしたマウスを作製し、肝臓内の全 miRNA の発現を抑制する実験を行った<sup>21)</sup>。胎仔肝および成体肝細胞における Dicer の発現を抑制する Albumin/ $\alpha$ -fetoprotein enhancer/promoter element-Cre と Dicer1<sup>loxP/loxP</sup> のマウスを掛け合わせてノックアウトマウスを作製したところ、肝臓内のほとんどの miRNA が、正常なマウスに比べて約 90% 減少していることを確認した。ところが驚いたことに、このマウスは正常に生まれ、血中アルブミン、ビリルビン、コレステロール値のいずれも正常値を示すことがわかった。し

かし生後100日ごろから、肝細胞のアポトーシスや胆管の過形成を伴った肝炎を起こすことが明らかになった。同様の結果が、関根らによっても報告されている<sup>22)</sup>。彼らはAlbumin-Cre と Dicer1<sup>loxP/loxP</sup> のマウスを掛け合わせて肝特異的に Dicer1 を欠損させたマウスを作製し、やはりこのマウスが正常に生まれることを確認している。その後彼らは、このマウスの成熟肝細胞が異常な増殖能を獲得する一方、高頻度のアポトーシスを起こし、最終的には高い発がんリスクを伴うことを見いだした。これら二報の報告が示すように、肝臓の miRNA は発生過程よりはむしろ、発病の機序により大きく寄与しているのかもしれない。

## 2. 肝再生における miRNA

### 2.1. 肝再生とは

肝臓は、全容量の2/3を切除しても、残った1/3の組織が驚異的な再生能力を発揮し、げっ歯類では約1週間で元の大きさまで回復することが知られている。部分肝切除 (partial hepatectomy: PH) 後の肝臓の再生は、非常に複雑でありながら、極めて精密に制御された現象である<sup>23, 24)</sup>。肝再生時には、普段 G0 期にある肝細胞が1~2回の分裂を経て肝臓を修復する。この過程は、開始期 (priming phase)、増殖期 (growth phase)、終止期 (termination phase) の三つの段階に分けられる (図3)。開始期では、インターロイキン (interleukin: IL)-6 や腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF)- $\alpha$  といったサイトカインの刺激を受けた肝細胞が G0 期を抜けて G1 期に入る。続く増殖期では、G1 期に入った肝細胞は肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) などの増殖因子の刺激下で、サイクリン依存的に細胞周期を進めて増殖する。増殖期を経て肝臓が元の大きさに戻ると、肝細胞は TGF- $\beta$  や Activin の刺激を受けて増殖を止め、再び G0 期に入る。このように、肝再生は様々な分子機構に支配された一連の過程が精密に制御されて起こる現象である。最近、肝再生の各段階で miRNA が重要な役割を担っていることがわかってきた (図4)。

### 2.2. 開始期

開始期における miRNA の役割については、miRNA のグローバルな発現プロファイルの変化を解析した Shu らが興味深い結果を報告している<sup>25)</sup>。彼らは、70%PH 後3時間では約40%の miRNA の発現が上昇するのに対し、24時間後には約70%の miRNA の発現が低下することを見いだした。3時間後に増加した miRNA の中には Droscha, Dgcr8, Dicer, Tarbp2, Prkra といった miRNA の合成に関わる遺伝子をターゲットとするものが含まれていた。そして、これがネガティブフィードバックとなって、24時間後のグローバルな miRNA の減少が起こり、その結果細胞の増殖が亢進することが明らかになった。後述するように、がんでは miRNA のグローバルな減少が起こって

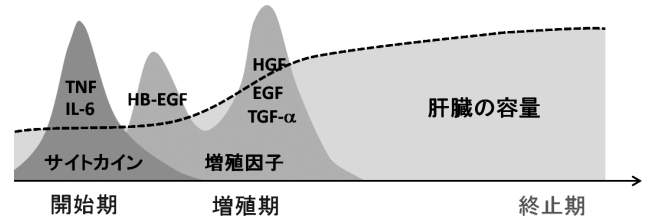


図3 肝再生の概要

肝再生の各段階で起こるイベントに関わる分子群の変動と、それに伴う肝臓の容量の変化を示す。図中に記されている分子名は、それぞれの段階で誘導される分子の代表例を示す。

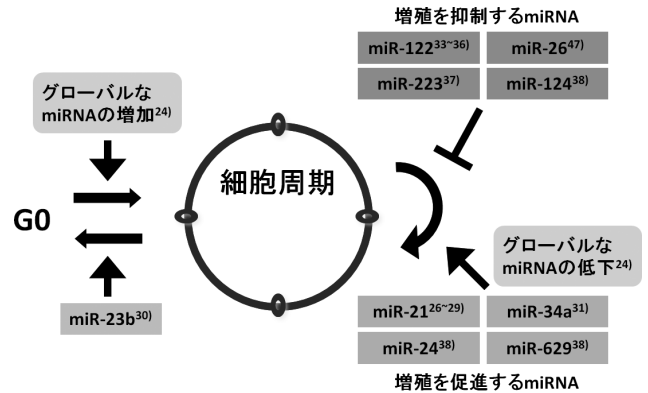


図4 miRNAによる細胞増殖の制御

本稿で紹介した miRNA を例に挙げ、miRNA が細胞の増殖にどのような形で関与するかを模式的に示す。

り、異常な細胞の増殖につながっていると考えられている。以上より、一時的な miRNA の増加は、細胞増殖の開始シグナルとして働いていることが示された。

### 2.3. 増殖期

増殖期で多くの miRNA の減少が認められることを述べたが、Chen らもそれを支持する結果を報告している<sup>26)</sup>。彼らは50%PHを施したラットで、1, 2, 3日後の肝臓の miRNA を比較し、PH 後3日までの間ほとんどの miRNA が減少していることを発見した。それに伴って細胞周期と増殖に関わる遺伝子の発現が増加していることが確かめられた。この結果から彼らは、増殖を促進する要因として、miRNA のグローバルな減少が重要であると主張している。

一方、増殖期に増加する miRNA についても研究が進んでおり、特に miR-21 の発現上昇は重要な役割を果たすことが示されている。Willenbring のグループは、まず肝特異的に miRNA を欠損させたマウスを作製し、miRNA の存在が肝再生に関与しているかどうかを検討した<sup>27)</sup>。このマウスでは、2/3PHを行うと肝細胞は G1 期には直ちに移行できるが、S 期に移行する時期が正常なマウスより遅く、再生に遅れが生じることがわかった。PH 後36時間までの miRNA の発現の変化を調べた結果、細胞周期を阻害する B-cell translocation gene (Btg)2 をターゲットとする miR-21 の発現が顕著に増加していた。同グループはその

後も肝再生における miR-21 の役割について研究を進め、Btg2 とは別に Ras homolog gene family, member B (RhoB) をターゲットとした経路でも、miR-21 が肝細胞の増殖を促進することを発見した<sup>28)</sup>。彼らは、2/3PH を施したマウスにアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与して miR-21 をノックダウンすると、実際に RhoB の発現が増加し、その下流のサイクリン D1 までの一連の経路が阻害され、肝細胞の増殖が抑制されることを実証した。これらの報告の他にも、肝再生での miR-21 の発現上昇が細胞増殖を促進することが報告されている<sup>29,30)</sup>。

#### 2.4. 終末期

開始期を過ぎた後は、多くの miRNA が肝細胞の増殖を抑制し、肝再生を終末期へと誘導する方向に働くと考えられる。前述の Shu らは、2/3PH 後 24 時間で miRNA の発現低下のピークを迎えた後は、通常の miRNA の発現プロファイルへと徐々に戻っていくことを報告している<sup>25)</sup>。一方、Jiao のグループは開始期以降の miRNA の発現を観察し、発現量の変動するものとして miR-23b と miR-34a を同定した。Smad3 をターゲットとして TGF- $\beta$  経路を阻害することで増殖を促進する miR-23b は、PH 後 24 時間では発現が高いが、その後 3 日目から 7 日目まで一貫して発現量が低下することが確かめられた<sup>31)</sup>。これとは反対に、増殖抑制に働く miR-34a は PH 後 24 時間以降 9 日目まで、すなわち増殖期から終末期にかけての間、一貫して発現が高くなることがわかった<sup>32)</sup>。

### 3. 肝がんにおける miRNA

肝臓の miRNA についての研究の中では、肝がんについての研究が最も盛んに行われている。多くの研究グループが、がん抑制効果を持つ miRNA の減少、あるいは悪性化を促進する miRNA の増加が肝がんの発生や進行につながることを報告している。本節ではそれらの中で代表的なものに焦点を絞って概説する。また、我々の研究室で最近報告した、天然化合物の有する、miRNA 制御を介した抗がん作用についても紹介する。

#### 3.1. がん化に伴うグローバルな miRNA の減少

Lu らは様々ながんを対象に調査を行い、正常組織に比べ、がんでは大部分の miRNA の発現が低下していることを発見した<sup>33)</sup>。彼らは、miRNA が細胞の最終分化を促進し、細胞分裂を防ぐ役割を担っているという解釈を提案しており、がんにおけるグローバルな miRNA の減少は、細胞分化の度合いを反映したものであるとしている。以下で見ると、肝臓でも miRNA の減少が、がんの悪性化に影響を及ぼしていることがわかる。一方、一部の miRNA は、がん化に伴って発現が増加し、がんの悪性化に寄与することも報告されている。

#### 3.2. がん化を抑制する miRNA

肝がん減少している miRNA の多くは、細胞増殖を抑制する作用を持つ (図 4)。miR-122 は肝臓特異的に発現する miRNA であると同時に、がん化に伴ってその発現が低下することが知られている<sup>34~37)</sup>。実際に miR-122 が細胞増殖を阻害することでがんの抑制に働くこともわかってきた。Gramantieri らは、miR-122a がサイクリン G1 をターゲットとして、細胞増殖を抑制することを報告した<sup>34)</sup>。miR-122 以外にも、複数の miRNA が細胞増殖を抑制することが示されている。例えば Wong らは miR-223 が、がん遺伝子として知られる Stathmin 1 をターゲットとして細胞の増殖抑制およびアポトーシスの誘導に機能していることを報告している<sup>38)</sup>。また、Hatzia Apostolou らは miR-124 が IL-6 をターゲットとして STAT3 シグナリングの活性化を阻害し増殖を抑制することを見だし、後述するように、この miRNA が肝がんモデルマウスに対して治療効果を示すことを明らかにした<sup>39)</sup>。

一方、細胞増殖だけでなく、がん細胞の上皮間葉転換 (epithelial mesenchyme transition : EMT) を制御する miRNA の発現異常が、がんの悪性化につながるという報告もある。Meng らは miR-194 が N-カドヘリンをはじめとした複数の EMT 制御因子をターゲットとして、がん細胞の遊走・浸潤を防ぐ役割を果たすことを発見した<sup>40)</sup>。また、Huang らは miR-152 が DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT)1 の発現を抑制することで、エピジェネティックに遺伝子発現を制御することを報告している<sup>41)</sup>。肝がん細胞株で miR-152 を過剰発現させると DNMT-1 の発現が低下し、その結果グルタチオン S-トランスフェラーゼ P-1 と E-カドヘリンといった上皮マーカーの発現が抑制された。

#### 3.3. がん化を促進する miRNA

がん化を促進する miRNA の代表例として、肝再生の項でも取り上げた miR-21 が注目を集めている。miR-21 は、がん抑制遺伝子 *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) をターゲットとしており、様々ながんでその発現上昇が認められている<sup>42)</sup>。肝臓では Meng らのアレイ解析によって、肝がんおよび肝がん細胞株での miR-21 の発現増加が確かめられた<sup>43)</sup>。実際に、肝がん細胞株で miR-21 の発現を抑制すると PTEN の発現が上昇し、増殖能・遊走能・浸潤能が抑制されることが確かめられた。さらに Vinciguerra らは、不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acid : UFA) が miR-21 の発現誘導の一因となることを報告している<sup>44)</sup>。彼らは、UFA によって活性化された mTOR/NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) 複合体が miR-21 のプロモーターを活性化していることを突き止め、既に知られていた UFA による PTEN の不活性化<sup>45)</sup>の分子機序が、miR-21 の発現を介したものであることを明らかにした。

miR-21 以外にもがんを促進する miRNA が複数報告されている。Yao らは、転移が認められた多くの肝がん患者で miR-30d の発現が増加していることを見いだした<sup>46)</sup>。実際に、*in vitro* の実験から miR-30d が Galphai 2 をターゲットとして転移を促進していることが明らかとなった。また、Ying らは miR-210 が肝がんの悪性化を促進することを発見した<sup>47)</sup>。miR-210 は低酸素状態で hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  によって発現誘導されることが知られていたが、彼らの研究により、低酸素下におかれたがん細胞は miR-210 の発現を通じて転移能を獲得することが示唆された。

### 3.4. C 型肝炎ウイルスと miRNA

C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus : HCV) の感染は肝がんの主要な原因の一つである。HCV に感染すると、免疫応答を介した肝細胞の障害と、それに伴う肝組織の繊維化が起きる<sup>48)</sup>。そして繊維化の悪化が肝硬変へと進んだ結果、最終的に肝がんの発症へと至る。現在まで HCV に対する有効なワクチンは開発されておらず、HCV の感染予防は重要な課題となっている。一方で慢性 C 型肝炎の治療は、インターフェロンとリバビリンの併用療法が開発され著しく向上した。しかし、この治療の効果は患者間で著しく異なり、ウイルスの完全除去が可能な例は一部の患者集団に限られているのが現状である。また、HCV の感染に伴う肝がんの発症機序についての詳細は明らかになっておらず、多くの課題が残されている。

このような中最近の研究から、HCV の生活環に肝細胞の miRNA が大きく関与していることがわかってきた。2005 年に Jopling らは、miR-122 が肝細胞における HCV RNA の蓄積を制御していることを報告した<sup>49)</sup>。興味深いことに、miR-122 は HCV 由来 RNA の 5'-UTR に結合することで、通常の RNAi 効果とは異なった機構で、HCV RNA の複製を亢進することが明らかとなった。さらに 2009 年には、miR-122 の抑制が HCV 除去に寄与し、治療効果を示すことが報告された<sup>50)</sup>。Lanford らは、miR-122 に対する locked nucleic acid (LNA) を、HCV を感染させたチンパンジーに投与した結果、HCV RNA 量の減少および、肝炎の改善が見られることを確認した。これらの報告に加え、他にも複数の miRNA が HCV の複製に関与することが報告されている<sup>51~53)</sup>。一方 Pedersen らは、インターフェロンが HCV RNA と相補性をもつ複数の miRNA の発現を誘導し、抗ウイルス効果を示すことを報告した<sup>54)</sup>。彼らはさらに、インターフェロンによって miR-122 の発現が低下していることも確かめた。しかしながら、*in vitro* で観察されたこれらの結果が *in vivo* で実際に起こっているかということについては議論が生じている。インターフェロン治療を行った臨床サンプルを用いて行われた研究では、miR-122 の発現量とインターフェロンの治療効果との間に相関が確かめられず、また、miR-122 の発現量と血

中の HCV RNA 量との間にも相関が見られないという事実が判明した<sup>55)</sup>。さらには、Pedersen らが報告した、*in vitro* の実験でインターフェロンによって誘導されることが認められた抗ウイルス性 miRNA 群が、マウスを用いた *in vivo* の実験ではほとんど発現に変化が見られないということも確かめられた。以上のように、C 型肝炎と miRNA との関連性については依然不明な点も多く、2011 年の米国肝臓病学会で報じられた miR-122 の抑制剤である mi-ravirsen (LNA-antimiR-122) の臨床試験での好成績は期待できる成果だとしても、今後慎重に動向を見守る必要がある。

### 3.5. miRNA をターゲットとした肝がん治療の可能性

ここまで、がんの制御因子としての miRNA について簡単に紹介してきたが、miRNA による治療を目指した研究も精力的に進められている。miRNA を用いた肝がん治療の可能性については、がん抑制性 miRNA の投与による治療効果が二つの研究グループによって報告されている。最初の報告は miR-26 に着目した Kota らの研究である<sup>56)</sup>。彼らは、miR-26a がサイクリン D2 とサイクリン E2 をターゲットとするがん抑制性 miRNA であることを見いだした。この miRNA を肝がんモデルマウスに投与すると、細胞増殖の抑制とアポトーシスの誘導により肝がんの進行が抑制された。先に紹介した Hatzia Apostolou らの報告でも、有望な結果が出ている<sup>39)</sup>。彼らはがん抑制性 miR-124 が、肝がんモデルマウスに対し、抗がん作用を発揮することを明らかにした。また彼らは、がん促進性の miR-24 と miR-629 を同定しており、それぞれの miRNA を阻害した肝がん細胞株をマウスに移植すると、コントロール群に比べて miRNA 導入群で腫瘍の増殖が抑えられることを確認している。したがって、LNA などの、特定の miRNA の機能を阻害する物質の投与によって、がん細胞の増殖抑制効果が得られる可能性も十分にある。がん抑制性 miRNA および、がん促進性 miRNA に対する抑制物質を同時に投与することで、相乗的な治療効果が得られる可能性が大いに期待される。

最近我々の研究室で、天然化合物を用いた新たながん治療のアプローチを提案した。萩原らは、スチルベン誘導体の一種であるレズベラトロールを乳がんモデルマウスに投与したところ、がんの進行が抑制されることを発見した<sup>57)</sup>。興味深いことに、この効果はレズベラトロールが、がん抑制性 miRNA の発現を誘導し、がん幹細胞と考えられる細胞の性質を抑制していることによるものであった。乳がん細胞株にレズベラトロールを加えると、がん抑制性 miRNA として知られる miR-16、-141、-143、-200c の発現が増加し、それに伴い、浸潤能の低下やがん幹細胞画分の減少、さらには EMT の阻害など、がん幹細胞様の性質が抑制されることが確認された。さらに驚いたことに、レズ

ベラトロールは単にがん抑制性 miRNA の発現を誘導するだけでなく、miRNA の RNAi 効果の律速因子として知られる Argonaute (Ago) 2 の発現を促進していることが明らかとなった。レズベラトロールが、がん抑制性 miRNA 群と Ago2 の両方の発現を同時に促進することで、相乗的に高い効果を発揮するという点は重要である。レズベラトロールの抗がん作用に、miRNA の機能を支配する Ago2 の増加が寄与していること、一方で、miRNA のグローバルな減少が多くのがんで共通していることを考慮すると、あらゆる種類のがんで同様の効果が得られる可能性が期待される。

### 3.6. バイオマーカーとしての miRNA

miRNA を用いたがん診断の可能性にも期待が寄せられている。ここまで紹介してきたように、肝がん患者の miRNA の発現プロファイルは、非がん部あるいは健康な肝臓のそれとは異なることが明らかになってきた。このことは miRNA が、肝がんの診断や予後予測の新たなバイオマーカーになりうることを示している。

この可能性を裏付けるものとして、Wang のグループによる二つの報告は重要である。Budhu らは、肝がん患者の miRNA の発現プロファイルから、予後を正確に予測できることを報告した<sup>58)</sup>。彼らはまず、がん部と非がん部で顕著に発現が異なる 20 種類の miRNA を選出した。これらの miRNA を基に、肝切除術を受けた患者のうち血管浸潤が見られた患者と、そうでない患者とを区別できるような分類法を確立した。実際にこの分類法に基づいて肝切除術後の患者の全生存率、無病生存率、および再発率を正確に予測できることが示された。続いて同研究グループは、肝切除を受けた肝がん患者の miRNA 発現プロファイルと生存率との関連性について検討し、miR-26a と miR-26b が肝がん特異的に発現が低くなることを見いだした<sup>59)</sup>。さらに、肝がん患者を、miR-26a の発現がより低いグループと比較的高いグループとに分けると、発現の低いグループでは予後が悪い反面、インターフェロン- $\alpha$  に対する応答性が高いという事実が判明した。彼らの報告は、肝がん治療の方針を決める際の重要な手掛かりとなる。

### 3.7. 血中 miRNA による診断の可能性

我々の研究室からは、血中を流れる miR-500 が肝がんのマーカーになりうることを報告した<sup>18)</sup>。miR-500 が胎児肝特異的に発現することは先に述べた。さらに miR-500 は、肝がん細胞においても発現が高くなっており、いわゆる oncofetal な性質を持つことがわかった。miR-500 の発現は、正常な肝細胞に比べて肝がん細胞株で高く、また肝がん患者の肝臓では、非がん部に比べてがん部で高かった。さらに重要なことに、血中の miR-500 の量が肝がんの状態を反映していることが明らかになった。肝がんの摘出術を受けた患者の術前と術後の血液を採取し miR-500 の量

を測ったところ、術後で miR-500 の血中量が低くなっており、血中の miRNA が有用なバイオマーカーになりうるということが強く示唆された。

これに関連して、最近の研究で、miRNA などの核酸が血中を循環するという事実が注目を集めている<sup>60)</sup>。長らく、血液をはじめとした体液中には RNase が豊富に含まれているため、RNA は細胞外で安定に存在できないと考えられてきた。ところが、2007 年に Valadi らが、RNA がエクソソームという直径約 100 nm の脂質二重層の分泌顆粒に入って細胞間を移動することを発見し、多くの研究者を驚かせた<sup>61)</sup>。我々の研究室でも小坂らが、エクソソームを介した miRNA の分泌経路がセラミド依存的であること、さらには分泌されて取り込まれた miRNA がレシピエントの細胞内で実際に RNAi 効果を示すことを発見した<sup>62)</sup>。さらに最近、正常細胞が分泌するエクソソームにはがん抑制性の miRNA が入っており、腫瘍の増殖を抑制することがわかった<sup>63)</sup>。また、がん細胞のエクソソーム由来 miRNA が、がん細胞の転移に必須の役割を担っていることを示すデータも出てきた(未発表データ)。これら一連の発見により、がんの発生・増殖・転移というあらゆる局面で分泌型 miRNA が重要な役割を担っていることが判明した。同時に、エクソソーム由来の miRNA のプロファイルを、がんの進行に応じた形で識別することができれば、がんの新たな診断が可能となるかもしれない。

## おわりに

ここまで、肝臓における miRNA の機能について、発生、再生、がん化という三つの現象を例に見てきたが、その機能の幅は非常に広範であることがわかる。一つの miRNA を取り上げてもそのターゲットは無数に存在し、その機能を完全に把握することは困難である。例えば、miR-21 が肝再生時に増殖促進に寄与することを示したが、Marquez らは miR-21 がそれとは逆に増殖抑制に働きうることを報告している<sup>30)</sup>。他の報告と同様に、彼らも PH 後 miR-21 の発現増加を確認した。しかし、他の報告と相反して彼らは miR-21 のターゲットとして、NF- $\kappa$ B の活性化を行う Pellino-1 を同定しており、miR-21 が増殖抑制にも働きうることを示した。このことから、miR-21 が増殖促進を促すという一方向の役割を担っているだけでなく、同時に増殖抑制にも寄与する可能性もあり、miR-21 が、複雑なメカニズムを介して再生の制御に関わっていることが示唆された。このような miR-21 の作用の多面性の意義は完全に理解されていないが、もしかすると、増殖期でのいたづらな増殖を防止するような微調整機構として備わっているのかもしれない。miRNA の生理的な意義についてはいまだ不明点が多く、更なる研究が必要である。

このように多様な機能を持つ miRNA は、生命現象を理



解する上で重要であるだけでなく、新たな治療法や診断法の開発など、臨床の面でも重要な位置を占めるようになると考えられる。特に、miRNAのグローバルな減少が多くのがんで共通した現象であることを考えると、萩原らが提案したような、全面的なmiRNAの活性化というアイデアは有望なアプローチとなるかもしれない<sup>57)</sup>。一方、がんの新たな診断法としてのmiRNAの利用にも期待したい。現在、様々なタンパク質が血中腫瘍マーカーとして診断に使われているが、高頻度に偽陽性の診断が出ることが大きな問題となっている。そのような中、血中のmiRNAが新たな診断法を提供してくれる可能性も十分に考えられる。miRNA研究が今後広げる展開に注目したい。

## 謝辞

本稿を執筆するにあたり貴重な助言をくださった、国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野の小板展慶博士に深く感謝いたします。

## 文 献

- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., & Ambros, V. (1993) *Cell*, 75, 843–854.
- <http://www.mirbase.org/>
- Lowe, L.A., Yamada, S., & Kuehn, M.R. (2001) *Development*, 128, 1831–1843.
- Vincent, S.D., Dunn, N.R., Hayashi, S., Norris, D.P., & Robertson, E.J. (2003) *Genes Dev.*, 17, 1646–1662.
- Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Martinez Barbera J.P., & Zaret, K.S. (2006) *Dev. Biol.*, 290, 44–56.
- Sosa-Pineda, B., Wigle, J.T., & Oliver, G. (2000) *Nat. Genet.*, 25, 254–255.
- Tanimizu, N. & Miyajima, A. (2007) *Int. Rev. Cytol.*, 259, 1–48.
- Bossard, P. & Zaret, K.S. (1998) *Development*, 125, 4909–4917.
- Cirillo, L.A., Lin, F.R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M., & Zaret, K.S. (2002) *Mol. Cell*, 9, 279–289.
- Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., & Zaret, K.S. (1999) *Science*, 284, 1998–2003.
- Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., & Zaret, K.S. (2001) *Genes Dev.*, 15, 1998–2009.
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., & Birchmeier, C. (1995) *Nature*, 373, 699–702.
- Ishikawa, K.S., Masui, T., Ishikawa, K., & Shiojiri, N. (2001) *Histochem. Cell Biol.*, 116, 453–462.
- Kamiya, A., Kinoshita, T., Ito, Y., Matsui, T., Morikawa, Y., Senba, E., Nakashima, K., Taga, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., & Miyajima, A. (1999) *EMBO J.*, 15, 2127–2136.
- Kamiya, A., Kinoshita, T., & Miyajima, A. (2001) *FEBS Lett.*, 9, 90–94.
- Rogler, C.E., Levoci, L., Ader, T., Massimi, A., Tchaikovskaya, T., Norel, R., & Rogler, L.E. (2009) *Hepatology*, 50, 575–584.
- Hand, N.J., Master, Z.R., Eaucclair, S.F., Weinblatt, D.E., Matthews, R.P., & Friedman, J.R. (2009) *Gastroenterology*, 136, 1081–1090.
- Yamamoto, Y., Kosaka, N., Tanaka, M., Koizumi, F., Kanai, Y., Mizutani, T., Murakami, Y., Kuroda, M., Miyajima, A., Kato, T., & Ochiya, T. (2009) *Biomarkers*, 14, 529–538.
- Tzur, G., Levy, A., Meiri, E., Barad, O., Spector, Y., Bentwich, Z., Mizrahi, L., Katzenellenbogen, M., Ben-Shushan, E., Reubinoff, B.E., & Galun, E. (2008) *PLoS One*, 3, e3726.
- Hinton, A., Afrikanova, I., Wilson, M., King, C.C., Maurer, B., Yeo, G.W., Hayek, A., & Pasquinelli, A.E. (2010) *Stem Cells Dev.*, 19, 797–807.
- Hand, N.J., Master, Z.R., Le Lay, J., & Friedman, J.R. (2009) *Hepatology*, 49, 618–626.
- Sekine, S., Ogawa, R., Ito, R., Hiraoka, N., McManus, M.T., Kanai, Y., & Hebrok, M. (2009) *Gastroenterology*, 136, 2304–2315.
- Michalopoulos, G.K. (1997) *Science*, 276, 60–66.
- Fausto, N., Campbell, J.S., & Riehle, K.J. (2006) *Hepatology*, 43, S45–S53.
- Shu, J., Kren, B.T., Xia, Z., Wong, P.Y., Li, L., Hanse, E.A., Min, M.X., Li, B., Albrecht, J.H., Zeng, Y., Subramanian, S., & Steer, C.J. (2011) *Hepatology*, 54, 609–619.
- Chen, X., Murad, M., Cui, Y.-Y., Yao, L.-J., Venugopal, S.K., Dawson, K., & Wu, J. (2010) *Transplantation*, 91, 293–299.
- Song, G., Sharma, A.D., Roll, G.R., Ng, R., Lee, A.Y., Brelloch, R.H., Frandsen, N.M., & Willenbring, H. (2010) *Hepatology*, 51, 1735–1743.
- Ng, R., Song, G., Roll, G.R., Frandsen, N.M., & Willenbring, H. (2012) *J. Clin. Invest.*, 122, 1097–1108.
- Castro, R.E., Ferreira, D.M.S., Zhang, X., Borralho, P.M., Sarver, A.L., Zeng, Y., Steer, C.J., Kren, B.T., & Rodrigues, C. M. (2010) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 299, G887–G897.
- Marquez, R.T., Wendlandt, E., Galle, C.S., Keck, K., & McCaffrey, A.P. (2010) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 298, G535–G541.
- Yuan, B., Dong, R., Shi, D., Zhou, Y., Zhao, Y., Miao, M., & Jiao, B. (2011) *FEBS Lett.*, 585, 927–934.
- Chen, H., Sun, Y., Dong, R., Yang, S., Pan, C., Xiang, D., Miao, M., & Jiao, B. (2011) *PLoS One*, 6, e20238.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., & Golub, T.R. (2005) *Nature*, 435, 834–838.
- Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F., Veronese, A., Sabbioni, S., Liu, C.G., Calin, G.A., Giovannini, C., Ferrazzi, E., Grazi, G.L., Croce, C.M., Bolondi, L., & Negrini, M. (2007) *Cancer Res.*, 67, 6092–6099.
- Budhu, A., Jia, H.L., Forgues, M., Liu, C.G., Goldstein, D., Lam, A., Zanetti, K.A., Ye, Q.H., Qin, L.X., Croce, C.M., Tang, Z.Y., & Wang, X.W. (2008) *Hepatology*, 47, 897–907.
- Coulouarn, C., Factor, V.M., Andersen, J.B., Durkin, M.E., & Thorgeirsson, S.S. (2009) *Oncogene*, 28, 3526–3536.
- Ladeiro, Y., Couchy, G., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Pelletier, L., Rebouissou, S., & Zucman-Rossi, J. (2008) *Hepatology*, 47, 1955–1963.
- Wong, Q.W., Lung, R.W., Law, P.T., Lai, P.B., Chan, K.Y., To, K.F., & Wong, N. (2008) *Gastroenterology*, 135, 257–269.
- Hatziaepostolou, M., Polytaichou, C., Aggelidou, E., Drakaki, A., Poultsides, G.A., Jaeger, S.A., Ogata, H., Karin, M., Struhl, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., & Iliopoulos, D. (2011) *Cell*,



- 147, 1233–1247.
- 40) Meng, Z., Fu, X., Chen, X., Zeng, S., Tian, Y., Jove, R., Xu, R., & Huang, W. (2010) *Hepatology*, **52**, 2148–2157.
- 41) Huang, J., Wang, Y., Guo, Y., & Sun, S. (2010) *Hepatology*, **52**, 60–70.
- 42) Pan, X., Wang, Z.X., & Wang, R. (2011) *Cancer Biol. Ther.*, **10**, 1224–1232.
- 43) Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S. T., & Patel, T. (2007) *Gastroenterology*, **133**, 647–658.
- 44) Vinciguerra, M., Sgroi, A., Veyrat-Durebex, C., Rubbia-Brandt, L., Buhler, L.H., & Foti, M. (2009) *Hepatology*, **49**, 1176–1184.
- 45) Vinciguerra, M., Veyrat-Durebex, C., Moukil, M.A., Rubbia-Brandt, L., Rohner-Jeanrenaud, F., & Foti, M. (2008) *Gastroenterology*, **134**, 268–280.
- 46) Yao, J., Liang, L., Huang, S., Ding, J., Tan, N., Zhao, Y., Yan, M., Ge, C., Zhang, Z., Chen, T., Wan, D., Yao, M., Li, J., Gu, J., & He, X. (2010) *Hepatology*, **51**, 846–856.
- 47) Ying, Q., Liang, L., Guo, W., Zha, R., Tian, Q., Huang, S., Yao, J., Ding, J., Bao, M., Ge, C., Yao, M., Li, J., & He, X. (2011) *Hepatology*, **54**, 2064–2075.
- 48) Poynard, T., Yuen, M.F., Ratziu, V., & Lai, C.L. (2003) *Lancet*, **362**, 2095–2100.
- 49) Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., & Sarnow, P. (2005) *Science*, **309**, 1577–1581.
- 50) Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., & Ørum, H. (2010) *Science*, **327**, 198–201.
- 51) Murakami, Y., Aly, H.H., Tajima, A., Inoue, I., & Shimotohno, K. (2009) *J. Hepatol.*, **50**, 453–460.
- 52) Ishida, H., Tatsumi, T., Hosui, A., Nawa, T., Kodama, T., Shimizu, S., Hikita, H., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N., & Takehara, T. (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412**, 92–97.
- 53) Cheng, J.C., Yeh, Y.J., Tseng, C.P., Hsu, S.D., Chang, Y.L., Sakamoto, N., & Huang, H.D. (2012) *Cell. Mol. Life. Sci.*, [Epub ahead of print]
- 54) Pedersen, I.M., Cheng, G., Wieland, S., Volinia, S., Croce, C. M., Chisari, F.V., & David, M. (2007) *Nature*, **449**, 919–922.
- 55) Sarasin-Filipowicz, M., Krol, J., Markiewicz, I., Heim, M.H., & Filipowicz, W. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 31–33.
- 56) Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., Mendell, J.R., & Mendell, J.T. (2009) *Cell*, **137**, 1005–1017.
- 57) Hagiwara, K., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takahashi, R.U., Takeshita, F., & Ochiya, T. (2012) *Sci. Rep.*, **2**, 314.
- 58) Budhu, A., Jia, H.L., Forgues, M., Liu, C.G., Goldstein, D., Lam, A., Zanetti, K.A., Ye, Q.H., Qin, L.X., Croce, C.M., Tang, Z.Y., & Wang, X.W. (2008) *Hepatology*, **47**, 897–907.
- 59) Ji, J., Shi, J., Budhu, A., Yu, Z., Forgues, M., Roessler, S., Ambs, S., Chen, Y., Meltzer, P.S., Croce, C.M., Qin, L.X., Man, K., Lo, C.M., Lee, J., Ng, I.O., Fan, J., Tang, Z.Y., Sun, H.C., & Wang, X.W. (2009) *N. Engl. J. Med.*, **361**, 1437–1447.
- 60) Kosaka, N., Iguchi, H., & Ochiya, T. (2010) *Cancer Sci.*, **101**, 2087–2092.
- 61) Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., & Lötval, J.O. (2007) *Nat. Cell. Biol.*, **9**, 654–659.
- 62) Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 17442–17452.
- 63) Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Hagiwara, K., Takeshita, F., & Ochiya, T. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 1397–1405.
-