

## 研 究 報 告 書

### 「炎症に伴う microRNA 機能不全が惹起する炎症性発癌の病態解明と制御法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研 究 者: 大塚 基之

#### 1. 研究のねらい

ヒトの臨床、特に消化器系分野では、慢性炎症に続発する癌(悪性腫瘍)が多発することが問題になっている。特に、慢性肝炎・慢性胃炎・潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患に続発する腫瘍がそれに該当すると考えられる。従来、このような炎症続発性腫瘍の発生については、ある種の炎症性サイトカインが原因として挙げられることも多いが、それがなぜ癌化を惹起させるのか詳細な機構は不明なままであった。また、従来から、疾患の原因検索として疾患特異的遺伝子が存在することを前提として それを同定しようとする試みに多くの力が注がれているが、必ずしもすべての疾患で原因遺伝子の異常が同定されているわけではなく、ゲノムシーケンスの結果を見ても、持続炎症に続発して起きる消化器癌では高頻度で特異的な遺伝子異常の集積の報告は乏しい。非コードRNAの一種であるmicroRNAは、細胞内での遺伝子発現を配列依存的に制御しているが、これまでの検討で、microRNAの全般的な発現低下が癌組織でしばしば観察されることが報告されている。私たちは、「microRNA(miRNA)による遺伝子発現抑制機能が、炎症にともなう生体ストレス(TNF $\alpha$ などの炎症性サイトカイン刺激)によって阻害される」ことを、in vitroの実験で明らかにしてきた。そこで本研究では、「慢性炎症に伴う持続的なmicroRNA機能の阻害の結果、microRNAの全般的な発現低下と類似の状態を惹起し、その結果、炎症続発性の癌が惹起されるのでは」という仮説を立てた。この炎症性発癌の病態形成におけるmiRNA機能低下が果たす役割についての検証をするために、まずmicroRNAの発現低下が発癌の原因となっているのかをmicroRNAの成熟に必須の分子であるDicer遺伝子のノックアウトマウスを用いて検討をすすめる。次に、in vivoでmiRNAの機能を観察できるreporter mouseを樹立し、これを用いて炎症性腫瘍の形成過程におけるmicroRNA機能の変化を検討する。さらに、「炎症ストレスによるmicroRNAの機能不全」をキャンセルする化合物をスクリーニングしてその分子機構を解明したうえで上記の仮説のin vivoでの検証に利用する。これらの検討を統合して「持続炎症に伴うmiRNAの機能異常」の結果で生じる疾患の制御法の開発、特に持続炎症に伴って生じる発癌の制御法開発、につなげることを目的とする。

#### 2. 研究成果

##### (1)概要

microRNAの生成に必須の分子であるDicer遺伝子の腸管上皮細胞特異的なノックアウトマウス・ヘテロノックアウトマウス・通常のマウスの3群で大腸における炎症続発性腫瘍の形成能を観察すると、Dicer蛋白の発現量が中程度に低下しているヘテロノックアウトマウスで最も腫瘍形成性が認められる、という結果であった。この時、Dicer蛋白の発現量が中程度に

低下している群では microRNA の生成量も半分程度であった。この結果は、microRNA の発現量(あるいは機能)が通常の半分程度に低下していると、腫瘍形成の原因となることを示唆するものと考えられた。次に慢性炎症を惹起する種々の炎症性サイトカインが、microRNA の機能を低下させることを確認した。これは、炎症性サイトカイン、特に TNF  $\alpha$  によって APOBEC3G 蛋白の分解が亢進し、その結果、microRNA が機能を発揮する際に重要な Ago2 との結合量が減ったうえで、Ago2 関連複合体への microRNA の取り込み量が減ることが一因と考えられた。さらに、大腸での炎症が慢性的に続くと、腸上皮での microRNA 機能が低下することが示された。生体で microRNA の機能を見るためのレポーター遺伝子を組み込んだマウスで大腸炎を惹起すると、炎症持続に伴い腸上皮で microRNA 機能が減弱し腫瘍が形成された。ここに、microRNA の機能を増強する化合物として同定した薬剤(ROCK 阻害剤)を投与すると、腸上皮での microRNA の機能が回復するとともに腫瘍形成も抑制された。これらの結果を総合すると、慢性炎症続発性腫瘍の病態生理として、慢性持続炎症の刺激があると当該臓器での microRNA 機能が低下し、その結果、Dicer のヘテロノックアウトマウスでの microRNA 機能が減弱した状態と類似の状況を呈し腫瘍形成能が増すという事象が背景にあると考えられた。さらに、この制御法として、microRNA の機能を増強する作用のある ROCK 阻害剤は、炎症続発性腫瘍の予防法として効果的である可能性が示唆された。

## (2) 詳細

慢性炎症に伴う腫瘍形成の原因として microRNA の全般的な機能低下があるのかを検討するために、1) microRNA の全般的な発現低下が癌の原因になるのかどうかを Dicer のノックアウトマウスで検討し、2) 炎症性サイトカイン刺激による microRNA 機能の減弱機構を明らかにし、3) microRNA 機能を増強する化合物をスクリーニングしてその機序を解明するとともに、4) マウスでの炎症続発性腫瘍モデルを用いて炎症性腫瘍形成の過程における microRNA 機能の検討と、microRNA 機能増強化合物による腫瘍形成の抑制能を検討した。

### 1) Dicer 遺伝子はヘテロノックアウトで最も腫瘍形成能が高い

Villin promoter で発現する Cre recombinase を用いた Dicer 遺伝子の腸管上皮特異的ノックアウトマウスと AOM-DSS(Azoxymethane-Dextran Sulfate Sodium)による炎症続発性腫瘍形成モデルを用いて、Dicer 遺伝子の欠損による microRNA 成熟不全を介した腫瘍形成能について検討を進めた。その結果、Dicer の遺伝子欠損のアレル数に応じて Dicer 蛋白の発現・microRNA のプロセッシングが進むことが示された。すなわち、Dicer のヘテロノックアウトマウスでは、野生型で発現している Dicer 蛋白量の半分か程度の Dicer 蛋白発現量であり、成熟型の microRNA の発現も、調べた限りでは、ホモノックアウトと野生型の半分か程度の量となっていた。この条件下で、炎症続発性腫瘍を惹起すると、野生型とホモノックアウトマウスで約 10 個程度の腫瘍が検出されたのに対して、ヘテロノックアウトマウスで 20 個弱程度と最も腫瘍が多く形成された(次ページ 図 1)。この結果から、Dicer 遺伝子は「obligate haploinsufficiency」性と呼ばれる、特殊な癌抑制性の機能を持つことが同定された。組織内の各種遺伝子発現を見ると、c-Myc や LIN28B などのいわゆる癌遺伝子の発現は hetero knockout で最も増強されており、p53 などの遺伝子の発現量には野生型・ヘテロ・ホモノックア

ウトで変動が無く、各遺伝子に依存した発現量変化をとることが示唆された。

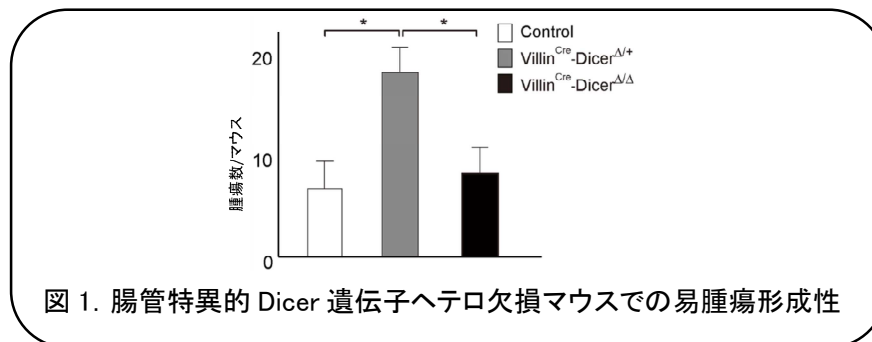


図 1. 腸管特異的 Dicer 遺伝子ヘテロ欠損マウスでの易腫瘍形成性

次に、Dicer のノックアウトによる global な遺伝子発現量変化を正確に定量するために、ヒト大腸癌細胞株の Dicer 遺伝子をノックアウトしたものを Vogelstein lab から供与いただき、そこにテトラサイクリンによる Dicer 蛋白の発現量調節系を組み込んで、野生型とノックアウトの中間程度の Dicer 蛋白発現量を持つ状態を作り、ノックアウト・野生型・中間の 3 者の培養細胞を用いて cDNA アレイに供した。その結果、「中間の発現量を持つ細胞で最も発現量が多くなる、あるいは少なくなる遺伝子群」、「ノックアウトから野生型にかけて単調に発現が増える、あるいは減少する遺伝子群」がそれぞれ抽出された。この結果を踏まえて、今後 in silico で遺伝子群の特徴を抽出し 責任遺伝子群の同定を進めている。いずれにせよ、Dicer 蛋白あるいは全般的な microRNA 量の中間的な減少は、易腫瘍形成の原因になることが示された (PLoS One 2013;8(9):e71969)。

## 2) $\text{TNF}\alpha \cdot \text{IL1}\alpha \cdot \text{IL1}\beta$ は APOBEC3G の分解を促進し Ago2 関連複合体への microRNA の取り込みを抑制する

炎症に関与するサイトカインのうち microRNA 機能に影響を及ぼすサイトカインを各種スクリーニングしたところ、 $\text{TNF}\alpha \cdot \text{IL1}\alpha \cdot \text{IL1}\beta$  が microRNA の機能を減弱させることが確認された。その機構を検討するために、microRNA 経路に関わる蛋白 (Dicer, Ago2, TRBP, MOV10, DND1, APOBEC3G, GW182, TRIM65, HuR) の発現変化を検討したところ、microRNA 機能に関わる  $\text{TNF}\alpha \cdot \text{IL1}\alpha \cdot \text{IL1}\beta$  でのみ発現量が変わる蛋白として APOBEC3G を見いだした。これらの炎症性サイトカインは APOBEC3G 蛋白の発現量を減少させるが、その作用は APOBEC3G のプロモーター活性や mRNA 安定性に関与するのではなく、APOBEC3G 蛋白の分解に関与することが示された。この作用はプロテアソーム阻害剤でキャンセルされるため、ユビキチン-プロテアソーム系の活性化に依存していることが示唆された。APOBEC3G はもともと microRNA と標的 mRNA との相互作用のポイントで働く可能性が報告されていたが、本研究の検討で Ago2 蛋白と結合し、その結合が Ago2 関連複合体 (RISC) への microRNA の誘導に寄与していることが示された。すなわち、 $\text{TNF}\alpha$  で刺激した細胞内での microRNA の Ago2 関連複合体への誘導量はコントロールに比べて減少し、この効果は APOBEC3G の過剰発現でキャンセルされたため、APOBEC3G は microRNA の Ago2 関連複合体への誘導に補助因子的に働いていることが示唆された。ヒト APOBEC3G のマウスでのホモログは APOBEC3 であるが、APOBEC3 のノックアウトのマウス線維芽細胞では microRNA の機能が減弱していること、DSS で炎症を惹起した大腸から単離した腸上皮内では APOBEC3 蛋白が減少しており、Ago2 関連複合体内の microRNA の量も減少していることが示された。これらの結果から、炎症性サ

イトカインのうち TNF  $\alpha$  などは、APOBEC3G 蛋白の発現量を減らし、その結果、Ago2 関連複合体への microRNA の誘導量を減らすことで microRNA の機能を減弱させる作用があることが示された(投稿中)。

### 3) ROCK 阻害剤は ROCK1 の核内移行を誘導し PAIP2 の発現増加を介して microRNA の標的 mRNA の分解を促し microRNA の機能を増強する

microRNA の全体的な機能増強をする化合物 1,280 種類を搭載する化合物ライブラリーを用いて探索したところ、ROCK 阻害剤がヒットした。続く検討によって、ROCK 阻害剤の添加によって、ROCK1 が核内に移行し、かつ 転写因子 HNF4 と結合して、PolyA binding protein interacting protein 2 (PAIP2)のプロモーター領域に働いてその発現を増やすことが示された。PAIP2 は microRNA の標的 mRNA の polyA 長を短縮することでその mRNA の不安定性を高める働きが報告されていたが、実際に、PAIP2 のノックダウン細胞では ROCK 阻害剤のこの効果がキャンセルされた。これらの結果から、ROCK 阻害剤は PAIP2 の発現増強を介して、microRNA 依存的な mRNA の分解を促進し、microRNA の機能を全般的に高める作用があることが示唆された(*Nucleic Acids Res.* 2015;43(15):7577–89)。

### 4) 炎症続発性腫瘍の発生には microRNA 機能の減弱が背景にある

GFP 遺伝子の 3' UTR に microRNA の標的配列を組み込んだコンストラクトを持つ reporter transgenic mouse を作製し、このマウスで AOM-DSS による腸管での炎症性腫瘍を惹起させると、炎症の程度は変わらないものの、腫瘍発生の経過で microRNA の機能が低下することが示唆された。一方、ここに microRNA 機能を増強する上記の ROCK 阻害剤を投与していると、microRNA 機能が回復し、かつ腫瘍形成も抑制された(図 2)。この腫瘍抑制作用は Dicer のノックアウトマウスでは認められず、かつ APC の変異マウスにおける非炎症性の腫瘍形成には作用が見られなかったことから、microRNA 依存性であり、かつ、遺伝子変異に伴う細胞増殖を抑えているわけではないと考えられた。

コントロール



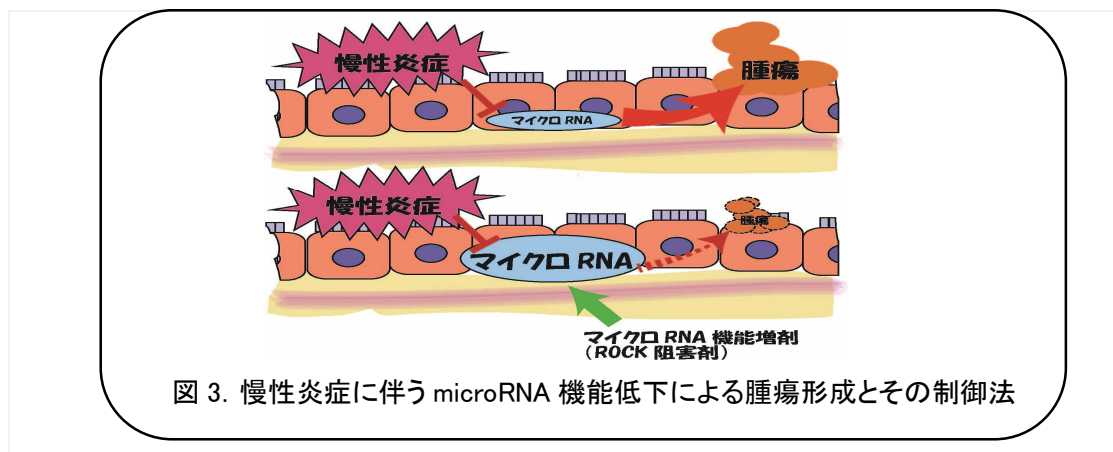
ROCK阻害剤  
投与



図 2. 上段がコントロールマウスの腸、下段が ROCK 阻害剤投与マウスの腸(いずれも AOM-DSS 10 週)

これらの結果は、持続炎症続発性腫瘍の発生には慢性炎症に伴う microRNA 機能の低下が背景の病態として関与しており、それを抑えれば腫瘍形成も抑制されることを示唆するものと考えられた(次ページ 図 3)(投稿中)。





### 3. 今後の展開

#### 1) microRNA 全般の機能低下に伴う腫瘍形成の分子メカニズムについて

microRNA 全般の機能低下(あるいは発現低下)に伴う腫瘍形成メカニズムについて、その責任分子(あるいは責任遺伝子セット)を解明するべく、まず純化した細胞株の系で検討を進める。すでに microRNA の発現低下における遺伝子発現変化についての cDNA アレイの結果は得られているが、そこから腫瘍形成に関わる既知の遺伝子群などとのリンクなどを含め、in silico での解析を進める。

#### 2) 他臓器での炎症続発性腫瘍の発生メカニズムへの演繹について

本研究で見られた炎症続発性腫瘍形成のメカニズムおよびその介入法が、他臓器でも認められるかどうか、まずマウスモデルを用いて検証する。

#### 3) ヒト検体での評価について

本研究で用いたモデルは、ヒトにおいては潰瘍性大腸炎に続発する大腸癌のモデルであるが、実臨床においてはいわゆる大腸ポリープ(腺腫)症例のほうが圧倒的に多いため、将来の臨床研究を念頭において、ヒト大腸ポリープでの microinflammation の有無とその病態において本研究で明らかにした機構が働いているか、ヒト検体を用いて検証する。

それが明らかになれば、ROCK 阻害剤の大腸ポリープ(ひいては大腸癌)発生予防法としての効果を検証する臨床研究を迅速に展開できると考えている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では慢性炎症に続発する腫瘍の発生メカニズムとして、慢性炎症刺激に伴う microRNA 機能の低下があることを示した。炎症性サイトカインの刺激で癌ができるという報告は従来から多々あるが、本研究によってその先の病態生理の一端を明らかにすることができたと考える。それだけでなく、炎症性サイトカインによる microRNA 機能低下のメカニズムとして Ago2 と結合する蛋白の分解促進が起きること、microRNA 機能を増強する可能性のある化合物として ROCK 阻害剤を同定しその分子機構を明らかにしたことで、ROCK1 の従来知られて

いなかった機能を明らかにすることができた。これらの結果は、当初の目的である症例数の多い「慢性炎症を母地とした腫瘍発生」のメカニズムの解明とその制御法の開発につながるだけでなく、microRNA の機能とそれを取り巻く分子機構の解明にも貢献する成果になったと考える。いっぽうで、microRNA 全般の機能低下から腫瘍形成に至る分子機構の解明が、今後注力すべき点として明確になった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

癌組織におけるmicroRNA(miRNA)の全般的な発現低下がしばしば報告されている。本研究者は炎症に伴う生体ストレス(TNF  $\alpha$  などの炎症性サイトカイン刺激)によってmiRNAによる遺伝子発現抑制機能が阻害されることを明らかにしてきたことから、「遺伝子発現を配列依存的に制御するmiRNAの機能を慢性炎症が持続的に阻害し、それによる全般的なmiRNAの機能低下によって炎症続発性の癌が惹起される」という仮説のもとに研究を開始した。そこで、miRNAの成熟に必須のDicer遺伝子を腸管上皮細胞特異的にノックアウト(KO)したマウスを作出し、実験的に炎症続発性の大腸癌を誘導したところ、野生型やホモKOマウスに比べ、Dicer発現量が中等度のヘテロKOマウスで最も腫瘍形成性が高く、c-MycやLIN28Bなどの癌遺伝子の発現も増強されていることを見だし発表した。現在、この成績に基づき純化した細胞株を用いて、責任遺伝子のin silico解析を進めている。TNF  $\alpha$  などの炎症性サイトカインはmiRNA機能に関わるAPOBEC3Gタンパク質の分解を促進することにより Ago2との結合量が減少しAgo2 関連複合体へのmiRNAの取り込み量の減少、慢性炎症によるmiRNAの機能を減弱させることを見いだしている。miRNAの機能を全体的に増強する化合物を探索し、ヒットしたROCK阻害剤による機能増強作用を解析し結果を発表している。また、miRNA機能低下を可視化できるレポーターマウスを作出し、炎症続発性大腸癌を誘導したところ、腫瘍発生の経過でmiRNAの機能が低下すること、ROCK阻害剤を投与するとmiRNA機能が回復し腫瘍形成も抑制されたことから、持続炎症続発性腫瘍の発生にmiRNA機能の低下が背景の病態として関与し、その機能増強により腫瘍形成を抑制できるというデータを取得している。

スケールの大きな構想に基づく研究であり、miRNAや責任遺伝子の詳細は不明ながら、既存ROCK阻害剤のドラッグリポジショニングを視野に入れた臨床医学の研究者らしいアプローチにも好感が持てる。今後の研究の発展と臨床を視野に入れた今後の展開を期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yoshikawa T, Wu JF, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Shibata C, Takata A, Han F, Kang YJ, Chen CY, Shyu AB, Han J, Koike K. ROCK inhibition enhances microRNA function by promoting deadenylation of targeted mRNAs via increasing PAIP2 expression. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(15):7577-89.
2. Yoshikawa T, Otsuka M, Kishikawa T, Takata A, Ohno M, Shibata C, Kang YJ, Yoshida H,

Koike K. Unique haploinsufficient role of the microRNA-processing molecule *Dicer1* in a murine colitis-associated tumorigenesis model. *PLoS One* 2013;8(9):e71969. doi:10.1371/journal.pone.0071969

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

■その他の主要な論文

1. Kang Y, Bang BR, Han KH, Hong L, Shim EJ, Ma J, Lerner R, Otsuka M. Regulation of NKT cell-mediated immune responses to tumors and liver inflammation by mitochondrial PGAM5-Drp1 signaling. *Nat Commun*. 2015;6:8371.
2. Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2015;7(1):1-6.
3. Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J Gastroenterol*. 2014 Feb;49(2):173-84.

■主な学会発表

1. Motoyuki Otsuka, Takeshi Yoshikawa, Kazuhiko Koike  
Inflammation and carcinogenesis of digestive organs  
Functional impairment of microRNAs by chronic inflammation is a cause of inflammation-associated tumorigenesis in mice  
**The 2<sup>nd</sup> JSGE international topic conference** 2013.3.22. Kagoshima
2. 大塚基之  
ノンコーディング RNA に着目した消化器癌の診断・介入法の開発  
**第 12 回 KAMOGAWA Cardiovascular Conference** 2014.10.31. 京都
3. 大塚基之  
炎症を標的とした疾患発症メカニズムの解明  
「慢性炎症が惹起する microRNA 機能不全に伴う肝発癌機構の解明」  
**第 15 回 日本抗加齢医学会総会** 2015.5.29. 福岡