

平成 31 年 4 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05149

研究課題名(和文) 加齢に伴うmicroRNAの機能低下と発癌ポテンシャル増大の分子機構の解明と制御

研究課題名(英文) Impairment of microRNA function and carcinogenetic risk by aging

研究代表者

大塚 基之 (OTSUKA, MOTYUKI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90518945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う発癌リスクの増加の機構を解明するために、microRNAの機能変化に着目して研究をすすめた。ヒト正常線維芽細胞は細胞老化にともない炎症性サイトカインの発現が増加した。特にインターフェロン下流の応答遺伝子の発現がSTATの発現増加と核内移行によって増えてくることを見出した。この現象は、肝臓内では非実質細胞で起きていた。したがって、加齢によって細胞老化が起きると微小な慢性炎症が起き、その結果microRNAの機能が低下して発癌リスクになることが推定された。この現象はmicroRNAの機能を増強する作用をもつ化合物ROCK阻害剤で抑制できる可能性も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う発癌の危険性の増加は、高齢化社会に向けて解決しなければならない課題である。本研究ではその分子機構を解析した。細胞老化に伴って炎症性サイトカインの発現が増え慢性炎症を惹起するが、それがmicroRNAの機能を減弱させ、その結果 易発癌性になることを見出した。microRNA機能を増強する化合物として見出したROCK阻害剤は、高齢に伴う発癌リスクを減らす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To uncover the mechanisms why aging cells are prone to carcinogenesis, we focused on microRNA function during aging. Normal human derived fibroblasts produced inflammatory cytokines by aging. Especially, Interferon responsive genes were upregulated through nuclear localization of the increased levels of STATs. These phenomena happen in the non-parenchymal cells in the human liver. Thus, aging induce chronic inflammation, which impairs the microRNA function, leading to the increased risk of carcinogenesis. Because we found that ROCK inhibitor enhances microRNA function, this compound may suppress the risk of carcinogenesis due to aging.

研究分野：消化器内科学

キーワード：加齢 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初は、消化器癌の発癌機序の解明と制御法について、「非コード RNA の機能攪乱が素因となる発癌」という観点を中心に解析を続けていた。それまでの研究過程において、miRNA の産生不全によって発癌が促進されることを観察し、「miRNA の生理機能が損なわれると易発癌性に傾く」という観点から、主に「miRNA 機能低下と癌」に着目していた。加齢に伴って発癌が増えることはよく知られていることであり、その原因として、「加齢によって、miRNA の機能が減弱し、その結果 易発癌性に傾くのでは」という仮説を立てた。マウスの実験発癌モデルで、それが化学物質による発癌惹起であっても、恒常的活性化型 k-ras 遺伝子のノックインや癌抑制遺伝子 p53 のノックアウトなどの癌関連遺伝子の改変による発癌であっても、ある程度の時間を経ないと癌が見られないということは、加齢に伴う細胞内環境の変化が腫瘍形成における病態生理のうえで重要な働きをしていることが示唆されていた。そこで、これまで研究代表者が従事してきた「miRNA 機能低下を介した慢性炎症性発癌の分子機構と制御」から展開したテーマとして、もうひとつの主要な発癌経路である「加齢に伴う病態、特に発癌の機構」の解明と制御に関わる研究を推進し、加齢に伴う病態の普遍的な分子機構の解明も鑑みながら、これまでの分子標的治療とは異なる視点で 発癌制御につなげるという発想に至った。また、もともと 慢性炎症刺激が microRNA の機能を障害する、ということ、および 老化にともない 老化細胞から慢性炎症に関わるサイトカインが分泌されることから、加齢による慢性炎症による microRNA 機能低下、がキーとなることが想定された。

2. 研究の目的

加齢に伴う種々の生理変化についての解明を進め、特に加齢に伴う慢性炎症刺激とそれに伴う microRNA 機能不全による発癌ポテンシャルの獲得に着目した研究から、加齢に伴う発癌に対する抑止法を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) レポーターマウスを用いた miRNA 機能の変化の検討:

GFP 遺伝子の下流 3' UTR に miRNA の標的配列を組み込んだトランスジェニックマウスについて、GFP の発現量を検討する。この際、標的配列に変異を入れて miRNA による発現制御を受けないコンストラクトを組み込んだマウスをコントロールとする。大腸において、miRNA による遺伝子発現抑制を受けないコントロールマウスと、miRNA 機能レポーターマウスでの GFP の発現量変化を検討する。

(2) 炎症惹起の機構解明:

加齢に伴い炎症性サイトカインが発現することが分かっていたが、その機構をヒト線維芽細胞による細胞老化の系を用いて検討する。

(3) microRNA 機能をリバースする化合物の探索:

炎症にともなう microRNA 機能の減弱をリバースすることが出来れば 加齢に伴う microRNA 機能低下を介した発癌を抑制できるかもしれないと考え、そのような化合物の探索を Drug library を用いて検討する。

(4) その他の分子機構の解明:

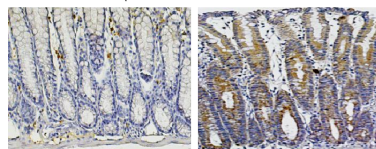
加齢に伴う慢性炎症を介した発癌機構だけでなく、ほかの分子機構があることも想定されるため、そのメカニズムを検討する。

4. 研究成果

(1) レポーターマウスを用いた miRNA 機能の変化の検討:

CMV promoter で drive される GFP 遺伝子の発現コンストラクトの下流の 3' UTR に let7 認識配列を組み込んだレポーターをもつ transgenic mouse を作製した。このレポーターマウスで大腸上皮細胞内の GFP の発現量を検討したところ、TNF で刺激した時は microRNA の機能が減弱し GFP の発現が増えた。すなわち in vitro でみられていた炎症性サイトカイン存在下での microRNA 機能の減弱が、in vivo でも確認できたと考えられた。GFP の発現量変化は凍結切片による観察でも、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学法でも確認され、炎症が惹起された場においては microRNA の機能が減弱することが示唆された

GAP with miRNA response element

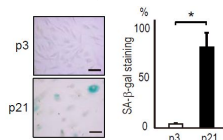


(左)レポーターマウス：通常は microRNA の働きにより GFP 発現は抑制されているが、炎症刺激下では GFP 発現。

(2) 炎症惹起の機構解明

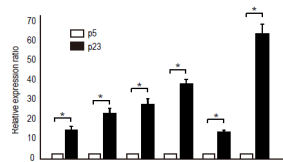
加齢に伴い、炎症性サイトカインの産生分泌が増えることが SASP (senescence-associated

secretory phenotype)として知られているが、本研究ではその関連の現象について 確認をした。すなわち、ヒト由来の正常線維芽細胞を用いて、継代を繰り返すことによる細胞老化を惹起し、



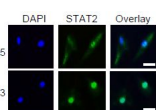
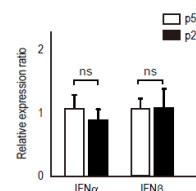
早期継代の細胞と継代晩期の細胞を用いて、まず細胞老化が惹起されているかを確認した。Western blotting を用いて、老化マーカーである p21 や p16 蛋白の発現量増加、SA-beta-gal の染色性によって、細胞老化が惹起されていることを確認した。

そのうえで、cDNA microarray によって、細胞内の遺伝子発現量の変化を網羅的に解析した。



その結果、老化細胞においては、p16 や p21 の発現が増える共に、IL6 をはじめとした炎症性サイトカインの発現が上昇していることが確認された。この現象は独立したサンプルを用いた RT-PCR でも指摘された(左図)。

この解析のなかで、IFN 下流遺伝子の発現が増えているにも関わらず、IFN α および IFN β の発現が増えていない点(右図)が疑問として出てきた。そこで、IFN 応答遺伝子の発現に関わる転写

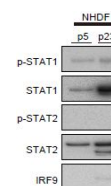


因子である STAT1, STAT2 の細胞内局在を確認してみたところ、確かに核内移行をしていることが判明した(左図)。

IFN が増えていないにも関わらず、STAT が核内移行している点をさらに検討するべく、STAT のリン酸化状態などを見て

みたところ、老化細胞では STAT の非リン酸化体の発現量が増えているにもかかわらず、リン酸化体の量は増えていないことが確認された。

すなわち、老化した細胞では、IFN 自体は増えていないものの、IFN の下流に当たる応答遺伝子の発現は増えており、その発現増加には非リン酸化 STAT の核内移行量の増加が関わっていることが推定された。この変化には STAT の上流にあたる JAK の関与はないことを、shRNA を用いた JAK のノックダウンではキャンセルできないことで確認した。実際のヒト検体で同様のことが起きているかを組織アレイを用いて検討したところ、高齢者由来の肝臓内の STAT1 については星細胞でのみ発現が増えており、実質細胞での発現量の変化は乏しかった。このことは、細胞老化は肝臓内では実質細胞よりも非実質細胞で見られることが確認された。



(3) microRNA 機能をリバーズする化合物の探索

細胞老化をきたした細胞では炎症性サイトカインの発現が増え、また、microRNA 機能が減弱することから、これが加齢関連病態に関わっていることが推定される。そこで、その病態をリバーズするために、減弱した microRNA 機能を回復するような小分子化合物の探索を行った。その結果、ROCK inhibitor が microRNA の機能を増強することをみいだした。1,200 種ほどのスクリーニングから ROCK 阻害剤が Dicer による microRNA の maturation 以降のステップで、microRNA 機能を増強することを見出した。そこでその機序を追及したところ、Ago2-complex に取り込まれる miRNA 量が ROCK 阻害剤の添加で変化することが判明した。すなわち、RISC の免疫沈降体で microRNA 量を測定すると、ROCK 阻害剤は microRNA の RISC への取り込みをふやしていることが判明した。したがって、加齢に伴う慢性炎症性刺激がもたらす microRNA 機能の減弱は、ROCK 阻害剤でリバーズできる可能性が示唆された。実際、炎症性発癌のモデルマウスで ROCK 阻害剤を投与すると、腫瘍の形成が抑制できることが示された。このことから今後、加齢マウスでの自然発症腫瘍モデルに対して ROCK 阻害剤を投与すれば、腫瘍形成が減らせる可能性があることが示唆された。

(4) その他の分子機構の解明：

さらに興味深いことに、IFN シグナル応答遺伝子のひとつでもある RNA 編集酵素 ADAR の発現が老化細胞では増えていることが判明した。もともと ADAR は IFN 応答遺伝子として IFN 投与時に増える蛋白ではあるが、これが加齢性変化の際に増えていることが示された。ADAR 蛋白の異常発現増加が RNA 編集の増加をもたらす、遺伝子変異に依らない RNA 変異に依る加齢関連発癌の発症に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Sekiba K, #Otsuka M, Ohno M, Yamagami M, Kishikawa T, Seimiya T, Suzuki T, Tanaka E, Ishibashi R, Funato K, and Koike K. Pevonedistat, a first-in-class NEDD8-activating enzyme inhibitor, is a potent inhibitor of hepatitis B virus. *Hepatology* in press. doi: 10.1002/hep.30491.
2. Sekiba K, #Otsuka M, Ohno M, Yamagami M, Kishikawa T, Suzuki T, Ishibashi R, Seimiya T, Tanaka E, Koike K. Inhibition of HBV transcription from cccDNA with nitazoxanide by targeting the HBx-DDB1 interaction. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;7(2):297-312. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.10.010.

3. Yamagami M, #Otsuka M, Kishikawa T, Sekiba K, Seimiya T, Tanaka E, Suzuki T, Ishibashi R, Ohno M, Koike K. ISGF3 with reduced phosphorylation is associated with constitutive expression of interferon-induced genes in aging cells. *npj Aging Mech Dis.* 2018;4:11. doi: 10.1038/s41514-018-0030-6.
4. Kishikawa T, #Otsuka M, Suzuki T, Seimiya T, Sekiba K, Ishibashi R, Tanaka E, Ohno M, Yamagami M, Koike K. Satellite RNA Increases DNA Damage and Accelerates Tumor Formation in Mouse Models of Pancreatic Cancer *Mol Cancer Res.* 2018 Aug;16(8):1255-1262. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0139.
5. Sekiba K, #Otsuka M, Ohno M, Kishikawa T, Yamagami M, Suzuki T, Ishibashi R, Seimiya T, Tanaka E, Koike K. DHX9 regulates production of hepatitis B virus-derived circular RNA and viral protein levels. *Oncotarget* 2018; 9(39):20953-20964. doi: 10.18632/oncotarget.25104.
6. Takata A, #Otsuka M, Kishikawa T, Yamagami M, Ishibashi R, Sekiba K, Suzuki T, Ohno M, Yamashita Y, Abe T, Masuzaki R, Ikenoue T, Koike K. RASAL1 is a potent regulator of hepatic stellate cell activity and liver fibrosis *Oncotarget* 2017 May 4;8(39):64840-64852. doi: 10.18632/oncotarget.17609. eCollection 2017 Sep 12. doi: 10.18632/oncotarget.17609.
7. Sekiba K, Yamagami M, #Otsuka M, Suzuki T, Kishikawa T, Ishibashi R, Ohno M, Sato M, Koike K. Transcriptional activation of the MICA gene with an engineered CRISPR-Cas9 system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Apr 29;486(2):521-525. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.076.
8. Yoshikawa T, Wu JF, #Otsuka M, Kishikawa T, Suzuki N, Takata A, Ohno M, Ishibashi R, Yamagami M, Nakagawa R, Kato N, Miyazawa M, Han J, Koike K. Repression of miRNA Function Mediates Inflammation-associated Colon Tumorigenesis. *Gastroenterology* 2017 Feb;152(3):631-643. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.043.
9. Kishikawa T, #Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Ijichi H, Koike K. Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic process via the dysfunction of YBX1. *Nat Commun.* 2016;7:13006. doi: 10.1038/ncomms13006.
10. Kishikawa T, #Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Yamamoto K, Yamamoto N, Kotani A, Koike K. Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients. *JCI Insight* 2016;1(8):e86646. doi: 10.1172/jci.insight.86646.

[学会発表](計6件)

1. 2017.9.1. 第9回RNAi研究会・第4回細胞外小胞学会 シンポジウム (招待講演)
リピーターRNAの異常発現をめぐる膵がんの基礎と臨床. 大塚基之
2. 2016.2.19. 25th conference of the Asian Pacific Association for the Study of Liver (APASL) Tokyo Post Graduate Course B Motoyuki Otsuka miRNA and Liver Disease
3. 2016.5.23. DDW2016 San Diego poster (Mo1475)
Arginine Depletion May Be a Therapeutic Option Against Aggressive Hepatocellular Carcinoma With Reduced Mir122 Levels Motoyuki Otsuka, Takahiro Kishikawa, Takeshi Yoshikawa, Motoko Ohno, Kazuhiko Koike
4. 2017.5.6. DDW2017 Chicago Poster Sa1552
RASAL1 IS A POTENT REGULATOR OF HEPATIC STELLATE CELL ACTIVITIES AND LIVER FIBROSIS Motoyuki Otsuka, Akemi Takata, Kazuma Sekiba, Tatsunori Suzuki, Mari Yamagami, Rei Ishibashi, Takahiro Kishikawa, Motoko Ohno, Tsuneo Ikenoue, Kazuhiko Koike
5. 2017.5.20. The 37th Annual Meeting of the Korean Society of Nephrology Seoul Korea Basic Science Session Regulatory RNA Invited keynote lecture Novel pathological role and clinical usage of repetitive non-coding RNAs in pancreatic cancer Motoyuki Otsuka
6. 2017.9.11. Tumor heterogeneity and Network (THEN) Research Center 2017 Annual Symposium Kyungpook National University Daegu Korea Pathological role and clinical usage of repetitive RNAs in pancreatic cancer Motoyuki Otsuka

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/225kenncrna/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：立石 啓介

ローマ字氏名：(TATEISHI, Keisuke)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 20396948

(2)研究分担者

研究分担者氏名：前田 慎

ローマ字氏名：(MAEDA, Shin)

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 40415956

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。