

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19329

研究課題名(和文)大腸におけるmicroRNA機能異常を介した炎症性発癌の病態解明と制御法開発

研究課題名(英文)Inflammation-associated colon carcinogenesis by microRNA functional impairment

研究代表者

吉川 剛史 (YOSHIKAWA, Takeshi)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：40631685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症に続発する腫瘍形成におけるmicroRNAの意義を検討した。Dicerの発現が半分程度に落ちると易発癌性を呈するが、これはDicer蛋白の量をテトラサイクリンで調節できる系で検討したところ、CEB/P経路のかく乱が原因となっていることが示唆された。マウスの腸管炎症組織での検討で、microRNAの機能に関わるAPOBEC3蛋白の減少が確認され、これによるmicroRNA機能低下をROCK阻害剤でリバースすることで、炎症続発性腫瘍を抑制できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症に続発する腫瘍は様々な臓器組織で見られるので、この制御は重要な課題である。炎症によってmicroRNA機能が減弱することが腫瘍形成に大きくかかわっていることが示唆されていたが、そのメカニズムとしてCEB/P経路が重要であることを見出した。また、microRNA機能を増強する作用を持つROCK阻害剤を用いると、慢性炎症に続発する腫瘍形成を抑制することが出来ることを見出し、今後の炎症続発性腫瘍の予防法として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The biological significances of microRNA functional impairment during chronic inflammation was determined. When Dicer protein is decreased at about half level, it resulted in the higher possibilities of carcinogenesis. To discover the underlying molecular mechanisms, tetracyclin-regulated Dicer expressing cells were established, and using these cells it was found that CEB/P pathway is crucial in the inflammatory-tumorigenesis. ROCK inhibitor reverses these effects. Thus, ROCK inhibitor may be useful for the prevention of inflammation-associated tumorigenesis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：microRNA 炎症発癌

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、「癌と microRNA」をテーマに、特に消化管癌の発症機序に microRNA の発現低下あるいは機能低下があるのではないかと考え、検討を進めていた。それまでに、microRNA の産生に必須の分子である Dicer 遺伝子の腸管上皮特異的ノックアウトマウスの検討で、Dicer 遺伝子の発現における“obligate haploinsufficiency 性”を見いだした(Yoshikawa, *PLoS ONE*. 2013;8(9):e71969)。これは、Dicer 遺伝子の二本あるアレルのうちホモでノックアウトした場合と、ヘテロにノックアウトした場合と、野生型の 3 群で比較検討を行ったところ、ヘテロノックアウトでは Dicer 蛋白の発現量も mature な microRNA の発現量も野生型の半分程度に減少し、ホモノックアウトではそのいずれもがほぼ無くなる状態であったが、その中で最も大腸腫瘍を形成しやすいのは、中間的な発現量を持つヘテロノックアウトだった、というものであった。このことは、Dicer 蛋白あるいは microRNA の発現量(あるいは機能)が何らかの原因で中等程度減少すると、細胞内恒常性が乱れて発癌に傾くという特徴的な癌抑制性を示すものと考えられた。ただし、microRNA 全般の中等量の発現ないし機能減弱からの発癌機構の明確な分子機序はまだ不明だった。いっぽう、microRNA 全般の機能が減弱すると易腫瘍形成性を呈するようになるのであれば、microRNA の機能を増強すれば、易腫瘍形成性を抑えることができるのではないかと、という発想のもと、microRNA を増強する小分子化合物の検索を行った。1,200 種以上の化合物スクリーニングを行い、ROCK 阻害剤がその候補として抽出され、その分子機構の詳細を解析した。ROCK 阻害剤は、ROCK1 と HNF4a (Hepatocyte nuclear factor 4a) との相互作用を誘導し、HNF4a の転写能を増強して PAIP2 (polyA binding protein inhibiting protein2)の転写・発現を誘導し、microRNA の標的 mRNA の polyA 短縮を増強させて不安定化させる結果、標的 mRNA の分解を促進させる作用を示した(Yoshikawa, *Nucleic Acids Res.* 2015;43(15):7577-89)。この結果から、先の microRNA 発現ないしは機能減弱に伴う易腫瘍形成性をはじめとした病態において、ROCK 阻害剤の投与は、その病態を抑制する有望な手段であると考えられた。このような背景の中、1) microRNA 機能減弱から発癌に至る分子機構の解明、2) 慢性炎症刺激による microRNA の RISC 取り込み阻害の分子機構、を解明して 因果関係をさらに明確にするとともに、代表的な大腸癌の発生機序として知られる、良性の腺腫が癌化する経路(adenoma-carcinoma sequence)における microinflammation の microRNA 機能攪乱を介した病態形成への関与について明確にすることを発想した。

2. 研究の目的

microRNA 機能減弱から発癌に至る分子機構の解明、および、慢性炎症刺激による microRNA 機能減弱の分子機構の解明。

3. 研究の方法

(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：

まずヒト大腸癌細胞株の Dicer 遺伝子を遺伝子編集技術を用いてノックアウトする。ここに Dicer 遺伝子の発現量をテトラサイクリンで制御できるコンストラクトを add-back し、Dicer 蛋白の発現量を任意にコントロールできる系を樹立する。これによって、Dicer の野生型とノックアウトとその中間的な発現量を持つ 3 群の細胞株を用いて、まず microRNA の全般的な発現量を検証した後に、それぞれでの遺伝子発現状況を cDNA array で網羅的に解析する。その結果から「中間型で最も発現量が多くなる、あるいは少なくなる遺伝子群」や、「ノックアウトから野生型にかけて単調に発現が増加または減少する遺伝子群」を抽出し、腫瘍形成にかかわる既知の遺伝子群などとのリンクなどを含め、in silico における Gene set enrichment analysis などを含めた「遺伝子群」としての変化を検討する。

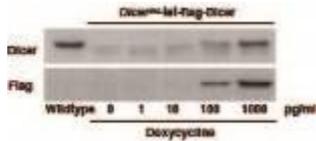
(2) 慢性炎症続発性腫瘍形成過程における変化と rescue :

上記の変化が、慢性炎症続発性腫瘍モデルで実際に惹起されているか、検討する。野生型のマウスに DSS を用いて慢性的な大腸炎を惹起し microRNA 機能減弱状態を生じさせ、その結果 腫瘍が形成される過程で、上記の変化が起きているかを検証する。いっぽう、ROCK 阻害剤によって microRNA 機能を増強し、腫瘍形成を抑制する状態下で、上記の変化が実際に rescue されているかを合わせて検討する。これらの検討を通じて、microRNA の全般的な減弱に伴う細胞内環境変化の詳細と、慢性炎症下での microRNA 機能増強によるそれらの変化のキャンセルを実験的に証明する。

4. 研究成果

(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：

ヒト大腸癌細胞株の Dicer 遺伝子を遺伝子編集でノックアウトしたのち、テトラサイクリンで発現量を制御できる形で Dicer 遺伝子を add-back した。その系を用いて Dicer 蛋白の発現量をコントロールしつつ、全体的な遺伝子発現状況を cDNA array で解析し、Dicer 蛋白の発現量に応じた遺伝子発現変化を検討した。その結果、種々の遺伝子発現が変化していることが判明したが、そのなかで GSEA を用いて、どのような細胞内経路が変動しているかを統合的に解析した。その結果、CEBp 経路の変化があることが示唆された。つまり、Dicer 蛋白が適当量に半減した haploinsufficiency の状態では、CEB/P 経路の活性化・減弱が起きていることが示唆され、それが易発癌性に結びついている可能性が新たに示唆されたことになる。



Dicer タンパクの発現量をドキシサイクリンで制御できる系を確立した。

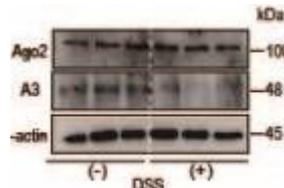


Microarray の結果に基づいた GSEA によって、Dicer 蛋白が半減したときの細胞内シグナル経路のうち最も影響を受けるものとして、CEB/P 経路を同定した。

(2) 慢性炎症続発性腫瘍形成過程における変化と rescue

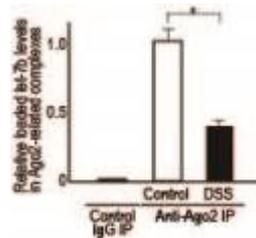
慢性炎症下での microRNA 機能不全がなぜ起きるのか、そのメカニズムを解析するうえで、APOBEC3 に着目した。これは microRNA に関与する細胞性因子のなかで、炎症下で発現が唯一減少していたからである。

マウスの腸管に DSS で慢性炎症を惹起し、その後 組織を回収し western blotting に用いた。その結果 マウスの APOBEC3 蛋白量が減少していることが示された。

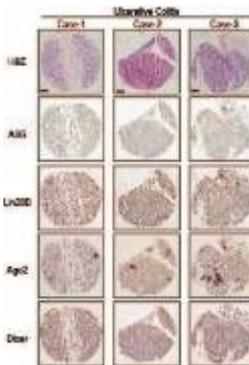


左三つがコントロール、右の三つが DSS で腸上皮に慢性炎症を惹起させた場合の A3 蛋白の発現を western blotting で確認。

その結果、Ago2 を中心とした RISC に microRNA の取り込みが出来なくなり、減少していることが、Ago2 に対する免疫沈降とその中の microRNA 量の定量によって、確認された。

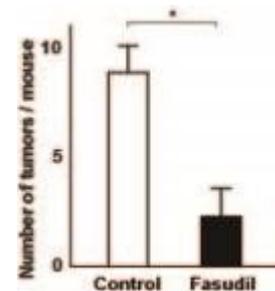


Ago2 に対する抗体を用いて免疫沈降を行った。DSS 腸炎を惹起した組織から免疫沈降したものの中には microRNA の量が減っていることが示された。



さらに、ヒトの組織でも潰瘍性大腸炎由来の組織では APOBEC3 蛋白の発現量が減っていることが左図のように示された。

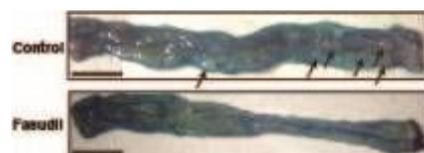
さらに、microRNA の機能を増強する化合物として先に同定していた ROCK 阻害剤を慢性炎症続発性腫瘍モデルに投与したところ、想定通り、microRNA の機能を増強することで炎症続発性腫瘍の発生を抑えることが出来ることを確認した(右図)。これらの結果を統合すると、慢性炎症が惹起されると、microRNA の機能が APOBEC3 の



発現が低下することで減少し、そのために、RISC 内に取り込まれる microRNA 量が減少し、その結果、microRNA の機能が減少する。microRNA の機能が減少すると CEB/P 経路の活性化が起き、その結果、発癌促進作用が惹起され、それによって腫瘍が形成される。microRNA の機能を増強する化合物である ROCK 阻害剤を慢性炎症刺激下で投与すると、減弱した microRNA の機能をリバーズする結果、炎症続発性腫瘍の形成を抑制することが出来る、ということが判明した。

この結果は、持続炎症に伴う腫瘍の形成において、炎症自体を減らすことが出来ない場合、ROCK 阻害剤が炎症続発性腫瘍の形成を抑制できることが示唆された(右図)。

今後、この方法で 慢性肝炎からの肝発癌や慢性腸管炎症からの大腸腫瘍の形成を ROCK 阻害剤で抑制できる可能性が出てきたと考えている。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. 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.
2. 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.
3. 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1件)

1. 2017.10.13. 第25回日本消化器病関連学会週間 シンポジウム13
持続炎症に伴うmicroRNA機能異常が原因となる消化器癌の病態解明 吉川剛史

[その他]

ホームページ等

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

6 . 研究組織

該当なし。

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。唆された。