

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390058

研究課題名（和文） 持続炎症に併発する miRNA 機能減弱が原因となる消化器癌の発癌機構と制御法の探索

研究課題名（英文） Chronic inflammation-induced miRNA functional impairment may cause inflammation-associated tumorigenesis in gastroenterological organs.

研究代表者

大塚 基之 (OTSUKA MOTOYUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90518945

研究成果の概要（和文）：

「炎症性ストレスによる慢性的な『miRNA 機能阻害』によって引き起こされる炎症性発癌」という新規の疾患概念を同定した。さらに、薬剤ライブラリーとレポーター細胞を用いて microRNA の機能を増強する薬剤を同定しその機構をみいだした。この薬剤を炎症性発癌モデルで *in vivo* 投与し腫瘍形成抑制作用を検証した。この結果は、炎症性発癌の新しい病態生理をみいだしたとともに、それに基づいた炎症性発癌の予防法の開発につながる有望な成果となった。

研究成果の概要（英文）：

The novel concept “chronic impairment of microRNA function due to chronic inflammation may cause inflammation-associated tumorigenesis” was identified. Drug library screening revealed a compound which enhances microRNA function. This compound indeed had preventive effects against inflammation-associated tumorigenesis. These results may open a new strategy to prevent inflammation-associated tumorigenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学, microRNA, 炎症発癌

1. 研究開始当初の背景

本研究当初は、世界的な研究の動向をみると、全般的に microRNA の産生が落ちると発癌に傾くという報告がなされていた。そのいっぽうで、炎症性ストレスが細胞や動物組織で起きるとその部位での microRNA の機能が減弱することを研究代表者は *in vitro* の研究成果として結果として得ていたので、その当時得られていた結果を統合して、「炎症に伴

う microRNA 機能の低下が microRNA 産生不全に類似の病態を引き起こし発癌に傾くのでは」、という仮説を立てていた。また、慢性炎症性疾患（慢性肝炎・慢性胃炎・潰瘍性大腸炎、消化器系以外でも間質性肺炎など）では非常に高率に当該臓器の癌が惹起され、これは現在でもいまだに臨床的に大きな問題であって、炎症性発癌の病態解明はこれらの疾患に罹患している人数を鑑みると

この分野の研究の重要性はおのずと明らかであった。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では「炎症性ストレスによる慢性的な『miRNA 機能阻害』によって引き起こされる炎症性発癌」という新規の疾患概念を検証したうえで、その概念に立脚した予防法の開発までつなげることを目的とした。具体的には、その概念を証明する手段としての **microRNA 機能増強コンパウンド**の同定を行ない、そのまま炎症性発癌の予防剤として用いることができないかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **miRNA 反応性 GFP マウス**の樹立：。CMV プロモーターで転写される蛍光蛋白である GFP 遺伝子の 3' UTR に **miRNA122/let7b/miR29b** の標的配列を組み込んだコンストラクトを恒常的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、慢性炎症の過程における **miRNA 機能**について **in vivo** で検証できるようにした。

(2) **microRNA** の機能を増強する薬剤の探索：、薬剤ライブラリーとレポーター細胞を用いて **microRNA** の機能を増強する薬剤を探索した。

(3) 炎症発癌予防効果の検証：この薬剤を **in vivo** モデルに投与することによって、慢性炎症に続発する腫瘍形成を抑制できないか検証するとともに、予防法の開発につなげることをめざした。

4. 研究成果

(1) レポータートランスジェニックマウスを用いて、AOM/DSS による大腸の炎症性発癌モデルの過程での GFP の発現強度を免疫組織染色で検討したところ、持続炎症によって GFP の発現は増強し、慢性炎症に伴って **microRNA** の機能が減弱することが示唆された。

さらにこの結果が特異的であることを示すために **miRNA** の標的配列に変異を入れた mutant レポーターのトランスジェニックも作製し、**miRNA** の機能に依存して GFP の発現が変化していることを検証した。

実際に人工的に TNF- α などのサイトカインを尾静脈から注射することで肝組織の GFP の発現が増強する、すなわち標的組織内での **microRNA** の機能が減弱することをも確認した。

(2)、薬剤ライブラリーとレポーター細胞を用いて **microRNA** の機能を増強する薬剤を探索した結果、ある種の **kinase** が **microRNA** 機能を増強することをみだし、その機構を解析した。その結果、この薬剤は PAIP2 と呼ばれる polyA binding protein に相互作用する分子の発現を増やしてその機能を抑制し、**microRNA** による polyA の短縮を増強する作用があることをみだした。

さらにその上流の因子として、PAIP2 promoter の活性に関わる転写因子 HNF4 の DNA 結合量が増加することをも見出した。現在もまだこの薬剤がどのような機構で HNF4 の DNA 結合量を増加させるのか検討を続けている。

いっぽうで、**miRNA** の標的 mRNA の polyA の短縮効果は northern blotting で確認でき、**miRNA** 機能における HNF4 の重要性を明らかにした。

(3) この薬剤を先の AOM/DSS による炎症性発癌モデルで **in vivo** で投与したところ、確かに腫瘍形成が抑制された。Dicer 遺伝子ノックアウトマウスではその効果は見られなかったことから、その作用は **microRNA** の機能を介していることが示唆された。

いっぽう、Apc の変異マウスでは大腸腫瘍が高率に発生するが、このマウスモデルではこの薬剤の効果は得られなかったことから、この薬剤は単に細胞増殖を増やしているのではなく **miRNA** の機能を変化させることで腫瘍抑制的に働いていることが示唆された。

これらの結果から、慢性炎症では **microRNA** の機能不全状態が起きていること、その結果、**microRNA** 産生不全と同様に腫瘍形成が促進されること、この状態は **microRNA** 機能を増強する薬剤によってキャンセルしうること、この薬剤は慢性炎症に続発する腫瘍形成を抑制する可能性があり臨床的に用いることができる可能性が得られたこと、から将来の臨床を変え得る重要な成果を得たと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件) すべて査読あり。

① Otsuka M et al. (15 人中 11 番目) Histone demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the crosstalk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. *Carcinogenesis*. 2013 in press.

② Otsuka M et al. (12 人中 8 番目) IL28B

minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol.* 2013 in press.

③ Otsuka M et al. (5 人中 3 番目) Transdifferentiation of human fibroblasts into hepatocyte-like cells by defined transcription factors. *Hepatol Int.* in press

④ Otsuka M et al. (22 人中 8 番目) A genome-wide association study of HCV-induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at the MHC region. *J Hepatol.* 2013. In press. doi:pii:S0168-8278(13)00011-1.10.1016/j.jhep.2012.12.024.

⑤ Otsuka M et al. (7 人中 3 番目) Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. *Sci Rep.* 2, 637. 2012. doi:10.1038/srep00637.

⑥ Otsuka M et al. (13 人中 2 番目) MicroRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity by directly targeting DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) expression. *Hepatology.* 57, 162-70. 2012. doi:10.1002/hep.26011.

⑦ Otsuka M et al. (8 人中 2 番目) A miRNA machinery component DDX20 controls NF- κ B via microRNA-140 function. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;420(3):564-9.

⑧ Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 43, 455-8. 2011.

⑨ Kojima K, Takata A, Vadnais 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 alpha-fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun.* 2, 338. 2011.

⑩ Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kojima K, Kishikawa T, Shibata C, Takekawa M, Yoshida H, Omata M, Koike K. Receptor for activated protein kinase C: requirement for efficient microRNA function and reduced expression in

hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* 2011; 6(9): e24539. doi: 10.1371/journal.pone.0024359

[学会発表] (計 3 件)

① Otsuka M. Functional impairment of microRNAs induced by chronic inflammation is a cause of inflammation-associated colon tumorigenesis in mice. The 2nd JSGE International Topic Conference (招待講演). 2013年03月22日. Kagoshima.

② Otsuka M. Functional impairment of microRNAs induced by chronic inflammation is the cause of inflammation-associated colon tumorigenesis. JST-CREST international symposium Frontiers in Immunology & Inflammation. 2013年02月12日. Tokyo.

③ Otsuka M. MicroRNA involvement in Hepatocellular Carcinoma 日本癌学会 International Symposium. 2011年10月4日. Nagoya.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 基之 (オオツカ モトユキ)

東京大学・医学部附属病院消化器内科・助教

研究者番号 : 90518945

(2)研究分担者

立石 敬介 (タテイシ ケイスケ)
東京大学・医学部附属病院消化器内科・助教
研究者番号：20396948

前田 慎

横浜市立大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40415956

(3)連携研究者

なし