

# 持続炎症に伴う発癌の原因としての炎症性サイトカインが惹起する microRNA 機能異常の解析

東京大学医学部大学院 医学系研究科 消化器内科  
大塚 基之

## 1. はじめに

遺伝子を code しない小さなRNAの一種である microRNA (miRNA) は、生体内で 遺伝子の転写産物の安定性や翻訳効率を変化させることで、これまで知られていなかったさまざまな生理的な役割を果たしていることが明らかになってきた。特に哺乳細胞においては miRNA は、主に mRNA の 3'UTR にある 相補的な配列部位に相互作用して、配列依存性に翻訳の抑制や mRNA の分解を促進することによって、遺伝子発現を負に制御することが知られている。申請者はこれまで、すべての miRNA の maturation に必須の分子である Dicer の deficient mouse の結果から、global な miRNA の産生不全は 抗ウイルス作用不全や血管新生不全 さらには 発癌が起きやすいことを明らかにしてきた。いっぽうで、miRNA による標的 mRNA からの翻訳抑制作用および mRNA 分解作用、あるいは siRNA による標的 mRNA の分解作用は、炎症性サイトカインや過酸化刺激などのさまざまな生体ストレスによって、阻害されることも明らかとしてきた。以上の miRNA deficient mouse の結果と *in vitro* でのストレス下での siRNA/miRNA 機能不全の結果をヒトの臨床現場に演繹することにより、以下のような事項が考えられる。

様々な生体ストレス存在下においては、女性不妊(流産)や易感染性(「風邪をひきやすくなる」など)を呈することが経験的に知られている。Dicer deficient mouse における総体としての miRNA 機能の低下についての *in vivo* での結果を併せて考えると、これらの疾患の原因の一部は「生体ストレスに伴う miRNA の機能不全」によって説明できる可能性もあることが想定される。同様に、慢性炎症性疾患などにおいては 持続的に miRNA による遺伝子発現制御機能が損なわれている可能性がある。臨床的に慢性炎症性疾患(慢性肝炎・間質性肺炎・潰瘍性大腸炎など)は高率に当該臓器の癌を惹起するが、生体ストレスによる慢性的な miRNA の機能阻害が炎症性発癌の一因となっている可能性もあると思われる。本研究では「生体ストレスによる miRNA の機能不全」に関わる宿主因子を無作為遺伝子破壊法により網羅的に解析・同定し、その制御を試みることで、生体負荷時の「miRNAの機能異常」の結果で起きうる疾患、特に慢性持続炎症に伴う発癌の制御法の開発につなげることを目的とする。

従来から、疾患の原因探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い。以上の点を鑑みると、特異的な遺伝子変異が無くても「生体ストレスに伴うmiRNAの機能低下」という概念で、病態生理を新たに説明しうる疾患もありうる事が予想される。このような生体ストレス存在下でのmiRNA機能の低下の機序を明確にすることで これらの疾病の新たな理解と、発症の制御法の基盤とする。

## 2. 方法

### **A) miRNA の機能を判定するためのレポーターマウスの作製**

CMV promoter で drive される eGFP の 3' UTR に miRNA122 の response element を組み込んだコンストラクトを恒常的に発現する transgenic mouse を作製し *in vivo* での miRNA の機能を評価する reporter mouse とする。

### **B) miRNAの機能を増強する薬剤の同定**

miRNAの機能をみるためののしフェラーゼコンストラクトをstableに組み込んだ細胞株を樹立し、薬剤ライブラリーを用いて miRNA機能を増強する薬剤を同定する。この薬剤の作用機序を解析するとともに、*in vivo* での miRNA機能増強剤として以下の実験に利用する。

### **C) *in vivo* 持続炎症発癌モデルにおけるmiRNAの機能変化の検証**

すでに確立されている種々の持続炎症を伴って起きる発癌モデル(例えば Dextran Sulfate Sodium による慢性腸炎に伴う大腸癌モデル)において、先の reporter transgenic mouse を用いて その臨床過程において持続炎症に伴い miRNA の機能がどのように変化しているかをGFPの発光強度で検証する。

### **D) *in vivo* 炎症性発癌モデルに対する介入による発癌抑制効果の検定**

上記 B)項 で同定したmiRNA 機能増強薬剤を用いて、C)項で検討した“持続炎症に伴う発癌過程における miRNA の機能変化”を制御することにより、発癌を抑制することができるか検証する。

## 3. 結果

**A) miRNA の機能を判定するためのレポーターマウスの作製:** 上記方法に従って レポーターマウスを作製した。GFP発現強度は免疫組織染色で確認した。

**B)-1)** 293T細胞にCMVプロモーターでdrive されるluciferase遺伝子の3' UTRにmiR122のresponse elementを連結したコンストラクトを入れmiRNA機能を評価できるレポーター細胞を樹立した。この細胞と薬剤ライブラリー(文部科学省がん特定領域 統合がんが配布する化合物ライブラリー)を用いて、miRNA機能を増強する薬剤を探索した。その結果 ある種のkinase阻害剤がmiRNA機能を増強することを見出した。

**B)-2)** この薬剤の作用機構を検討するために、薬剤添加前後でのmiRNAのprocessingの変化・miRNA関連蛋白量の変化・miRNAのRISCへの取り込み量の変化などの検討を行なった。その結果、その薬剤はmiRNAのprocessingには影響は与えないものの、matureなmiRNAのAgo2関連RISCへの取り込み量を変化させることを見出した。

**B)-3)** 薬剤のkinase阻害剤としての作用から上記のmiRNAのRISCへの取り込み効率の変化がどのような機構で引き起こされるのか以降の検討を現在も続けている。

**C) *in vivo* 持続炎症発癌モデルにおけるmiRNAの機能変化の検証:** A)項で作製したレポーターマウスにおいて AOM-DSS法によって炎症続発性の大腸がんモデルの検討を行なった。その結果、炎症の惹起されている腸管粘膜においてGFPの発光が強まり miRNA機能が抑制されていることが示唆された。

**D) *in vivo* 炎症性発癌モデルに対する介入による発癌抑制効果の検定:** 先のAOM-DSS法による炎症性大腸発癌の系において、コントロール群と阻害剤経口投与群に分けて、発癌抑制効果があるかを検証する。現在まで、二群間で炎症には差がないものの、発癌について予期する予防効果が得られている。今後は さらにそれが阻害剤のmiRNA増強効果を介したものであることを証明するために、Dicerのノ

ックアウトマウスにおいてはそのような効果が見られないことを検証することで傍証とすることを考えている。

#### 4. 考察

microRNAの全般的な発現低下が癌化に関与するという事はしばしば言われている。それには転写レベルでの発現低下や miRNAのmaturation processの障害が示唆されているが、miRNAの機能異常が癌化に関与することはあまり言われていない。本研究ではこれまでの実験結果と臨床的な知見から、慢性炎症によるmiRNA機能不全が癌化に関与すると考え、それを検証した。

検証用に用いた薬剤は in vitro の検討で、miRNAのRISCへの取り込みを促進させる作用を持つある種のkinase阻害剤であるが、現在もその詳細な作用機序の解明を続けているところである。

いっぽう その薬剤を用いた炎症発癌モデルのin vivo実験では、予測通り阻害剤を用いたほうが炎症性ポリープの数を抑制することが示された。大事な点は この過程では炎症の程度自体には変化がなかったことから、炎症自体はコントロールができなくても、その帰結としての発癌はmiRNA機能増強によって抑止できる可能性が示された。

現在は、その効果がmiRNA機能に依存しているのかを さらに検討するために、miRNA関連分子のノックアウトマウスを用いた検証を続けている。

#### 5. 発表論文・参考文献

1. Hayakawa Y, Hirata Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hikiba Y, Otsuka M, Ijichi H, Ikenoue T, Tateishi K, Akanuma M, Ogura K, Yoshida H, Ichijo H, Omata M, Maeda S. Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 regulates colitis and colitis-associated tumorigenesis via innate immune responses. **Gastroenterology**. 2010;138(3):1055-67.
2. Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, Lee JD, Yoshino O, Lin S, Han J. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. **J Clin Invest**. 2008;118(5):1944-1954.
3. Otsuka M, Jing Q, Georgel P, New L, Chen J, Mols J, Kang YJ, Jiang Z, Du X, Cook R, Das SC, Pattnaik AK, Beutler B, Han J. Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. **Immunity**. 2007;27:123-34.
4. Kang YJ, Kim SO, Shimada S, Otsuka M, Seit-Nebi A, Kwon BS, Watts TH, Han J. Cell surface 4-1BBL mediates sequential signaling pathways 'downstream' of TLR and is required for sustained TNF production in macrophages. **Nat Immunol**. 2007;8:601-9.