

論文の内容の要旨

論文題目

炎症に伴う microRNA 機能不全を一因とした大腸腫瘍発生の病態解明と制御法の開発

氏名 吉川 剛史

要旨

序文

慢性炎症は腫瘍発生の大きな背景要因であり、さまざまな臓器において慢性炎症と腫瘍発生との関係が明らかにされている。臨床的にも慢性炎症性疾患は腫瘍発生の危険因子である。しかし、慢性炎症と腫瘍発生の関連についての分子機構はいまだ解明されておらず、臨床的な炎症に伴う腫瘍発生の予防法はいまだ明らかにされていない。

microRNA (miRNA) は 22 塩基ほどの 1 本鎖 RNA で内在性の non-coding RNA の一種であり、メッセンジャーRNA (mRNA) の 3'UTR に結合し、mRNA の分解や翻訳抑制を行う。各臓器に特異的に発現する miRNA が存在し、細胞増殖、アポトーシス、発生分化、代謝等に関与している。miRNA は腫瘍に抑制的に関与するものと腫瘍に促進的に関与するものの両方が報告されているが、癌における miRNA は広範に減少しており、全般的な miRNA が減少することにより、腫瘍発生に促進的に働くことが報告されている。また、miRNA による mRNA 制御は可逆性であり、細胞ストレスにより解除されることが報告されている。これらの結果より、慢性炎症に伴う全般的な miRNA の機能阻害が炎症に伴う腫瘍発生に関与するのではないかという仮説をたてて、検証することとした。

本研究では *in vitro*、*in vivo* において炎症性ストレスによる miRNA 機能の変化を解析した。次に薬剤ライブラリーを用いて、miRNA の機能を増強する薬剤として Rho-associated protein kinase (ROCK) 阻害剤を同定し、その分子機構を解明した。さら

にこの薬剤をマウス大腸炎症性腫瘍発生モデルに投与することにより、持続炎症に伴って減弱した miRNA 機能を回復することで、炎症に伴う大腸腫瘍発生を抑制することができるかどうかについて検証した。

結果

miRNA のレポーターコンストラクトを用いて、炎症性サイトカインによるストレスにより miRNA 機能が抑制されることを示した。その作用は Dicer ノックアウト細胞では認められなかったため、その効果は Dicer 依存性、すなわち miRNA 依存性であることが示された。実際の miRNA 標的遺伝子の発現についても同様に、炎症性ストレスにより発現が上昇した。

In vivo における炎症性ストレス下において miRNA 機能が抑制されるかを検討するため、miRNA 機能を評価するためのレポータートランスジェニックマウスを作製した。このマウスは let-7b、miRNA-122、miRNA-29b の機能によって GFP 発現量が変化する。このマウスに azoxymethane (AOM) と dextran sulfate sodium (DSS) を投与し、大腸炎症性腫瘍発生モデルにおける miRNA 機能の変化を検討した。免疫染色で AOM と DSS 投与後の大腸の GFP の発現が増強していたため、腸炎による炎症性ストレスで miRNA 機能が抑制されていることが示唆された。また、腸炎による炎症に伴う全般的な miRNA 機能の減弱と類似した状況として、全般的な miRNA の発現が低下した Dicer deficient mice を用いて検討したところ、大腸炎症性腫瘍発生モデルにおいて腫瘍発生数が増加していた。これらの結果から、炎症性ストレスによる全般的な miRNA 機能の減弱が、炎症に伴う大腸腫瘍発生と関連していることが示唆された。

miRNA の機能を増強する薬剤として Rho-associated protein kinase (ROCK) 阻害剤を同定した。ROCK 阻害剤の miRNA 増強効果の作用機序は、miRNA 量を増加させることではなく、miRNA 標的 mRNA の polyA 短縮と mRNA の分解を促進することであった。さらに ROCK 阻害剤の polyA 短縮と mRNA の分解の促進作用は、

Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2 (PAIP2) プロモーター活性を増強して PAIP2 の発現を増加させることによりもたらされることが示唆された。

慢性炎症による全般的な miRNA の機能低下が炎症に伴う大腸腫瘍発生に関与し、また ROCK 阻害剤は炎症性ストレスにより抑制された miRNA 機能低下を少なくとも部分的には回復することを示した。そこで ROCK 阻害剤をマウス大腸炎症性腫瘍発生モデルに投与することにより、炎症に伴う大腸腫瘍発生の抑制ができるかを検討した。AOM と DSS に加えて ROCK 阻害剤を投与した後の GFP の発現は ROCK 阻害剤非投与群と比較して低下しており、炎症により低下した miRNA 機能が回復していることが確認された。さらに炎症の度合いはほぼ同等であったが、ROCK 阻害剤投与群の大腸腫瘍発生数が著明に減少していた。加えて Dicer deficient mice の大腸炎症性腫瘍発生モデルに ROCK 阻害剤を投与しても、ROCK 阻害剤非投与群と比較して腫瘍数は変わらなかったため、ROCK 阻害剤の効果は Dicer 依存性、つまり miRNA 依存性であることが示唆された。また、自然に小腸と大腸に腫瘍が発生する $APC^{\Delta14/+}$ マウスに ROCK 阻害剤を投与したところ、コントロール群と ROCK 阻害剤投与群で腫瘍発生数は変わらなかったため、ROCK 阻害剤は miRNA と関連のない腫瘍を抑制する効果はないことが示唆された。以上のことから ROCK 阻害剤は炎症性ストレスにより機能が低下した miRNA の機能を回復することにより、炎症に伴う大腸腫瘍発生を抑制する効果があることが示唆された。

考察

腫瘍で発現が増加している miRNA がいくつも報告されているが、全般的な miRNA の量の減少は腫瘍発生を促進する方向に働く。本研究では全般的な miRNA 機能の抑制は、全般的な miRNA 量の減少と同様に大腸腫瘍発生に関与していることを示した。また miRNA の機能低下は慢性炎症による細胞ストレスでも引き起こされることを示した。炎症に伴う腫瘍発生という概念は臨床でも受け入れられており、炎症の腫瘍へ

の直接の関係は証明されていないが、炎症性微小環境は全ての腫瘍に不可欠な要素であることが明らかになっている。今回は大腸炎症性腫瘍発生モデルで検討をしたが、他の臓器でも関与している可能性があるため、検討する必要があると考えられる。

miRNA の機能を増強する薬として ROCK 阻害剤を同定した。Dicer ノックアウト細胞においては ROCK 阻害剤の効果が認められず、miRNA 結合部位に変異を導入したコンストラクトでは、ROCK 阻害剤投与後も miRNA による polyA 短縮効果の亢進が認められなかった。また Dicer deficient mice の炎症性腫瘍発生モデルに ROCK 阻害剤を投与しても腫瘍発生には影響がなかった。さらに APC^{Δ14/+}マウスに ROCK 阻害剤を投与しても腫瘍発生には影響がないことから、ROCK 阻害剤には miRNA とは関連のない発癌抑制効果は認めないことが示唆された。以上より今回の作用が miRNA に依存していることが示され、ROCK 阻害剤によって miRNA 機能が増強し、炎症に伴う大腸腫瘍発生が ROCK 阻害剤によって抑制されることの特異性が示された。

以上まとめると、持続炎症により miRNA の機能が抑制されることが示され、慢性炎症による全般的な miRNA の機能低下は、炎症に伴う大腸腫瘍発生に関与することが示唆された。また ROCK 阻害剤は PAIP2 発現増加を介して miRNA 標的 mRNA の polyA 短縮を促進し mRNA 分解を亢進することにより miRNA 機能を増強するが、その効果により炎症に伴う大腸腫瘍発生を予防できる可能性があることがわかった。