

論 文 内 容 要 旨

題目 *MicroRNA-449a* deficiency promotes colon carcinogenesis

(マイクロ RNA449a の欠損は大腸での腫瘍形成を促進する)

著者 Masanori Niki, Kohei Nakajima, Daichi Ishikawa, Jun Nishida,
Chieko Ishifune, Shin-ichi Tsukumo, Mitsuo Shimada, Shinji
Nagahiro, Yoshinori Mitamura & Koji Yasutomo

平成 29 年 9 月 6 日発行 Scientific Reports 第 7 巻
article number:10696 に発表済

内容要旨

マイクロ RNA は約 22 塩基対からなる non-coding 本鎖 RNA であり、ターゲットとなる遺伝子の mRNA と結合し、その遺伝子の発現を抑制するとされ、細胞の増殖、分化、発達、細胞死に関与しており、さらには癌の誘導因子または抑制因子として腫瘍形成に関与するとの報告がある。Notch シグナルもまた、細胞の増殖、分化、細胞死に関与しており、Notch シグナルの異常がリンパ系悪性腫瘍に関与する報告もある。

これまでに Notch シグナルとマイクロ RNA は血球系細胞の分化成熟、腫瘍形成に関与していることを示す報告は多数あるが、Notch シグナルとマイクロ RNA の関連についての報告はほとんどなく、今回我々は Notch シグナルによって制御されるマイクロ RNA について研究した。

マウス T 細胞に Notch1 の細胞内ドメインを強発現させ、それにより発現変動するマイクロ RNA をマイクロ RNA アレイで解析したところ、miR449a は最も発現が増加しており、miR449a はこれまでに血球系細胞の分化との関わりにほとんど報告がなく着目した。また、相互関係をさらに調べるために、Notch シグナルの重要因子である Rbpj の欠損マウスと野生型マウスにおける T cell での miR449a の発現を調べたところ、Rbpj 欠損マウスで miR449a 発現が低下しており、Notch シグナルは miR449a の上流での制御因子であることが分かったが、直接的な制御かどうかを調べるために抗 Rbpj 抗体を使用したクロマチン免疫

沈降を行ったが、有意な差はなく、NotchシグナルによるmiR449の発現は直接的ではなく、間接的な制御であることが示唆された。

miR449aの生体内での役割を調べるため、miR449a欠損マウスを樹立した。我々の予想とは反対に、miR449a欠損マウスでは、Notchシグナルによって制御されているとされる胸腺、脾臓のT cellの分化や、脾臓でのCD8陰性樹状細胞やmarginal zone B cellの割合は、野生型マウスと変わらず、これらの結果からmiR449aの欠損はNotchシグナルに制御される免疫細胞の分化、発達に影響しないことが示唆された。

また、miR449aの発現をreal-time PCRで様々な臓器で調べたところ、胸腺と肺では発現が最も高く、その次に脳と大腸で高かった。既報では、miR449aは前立腺癌、乳癌、肺癌、胃癌などの腫瘍形成と関与があるとされており、今回、大腸でのmiR449aの発現があることから、大腸癌における腫瘍形成に着目した。マウス大腸癌誘発モデルとして、アゾキシメタンとDSSを用い、miR449aの欠損の影響を調べた。腫瘍は野生型とmiR449a欠損マウスの両群で認めしたが、miR449a欠損マウス群が有意に腫瘍の数が多く、腫瘍径も大きかった。このモデルでの大腸上皮の増殖を調べるために細胞増殖の活性を示すKi67を用いた免疫染色をしたところ、miR449a欠損マウスで有意に大腸基底膜上に染色される細胞が多数あり、miR449aは大腸上皮の増殖を制御することにより腫瘍抑制に関与することが示唆された。

このmiR449aと大腸癌の関係について当院での大腸癌患者76名で調べたところ、miR449aの発現は大腸癌組織と正常大腸組織に差はなかったが、miR449aの発現が高いと癌の深達度が深くなり、より未分化で腫瘍径も大きくなることが示された。また、全生存期間にはmiR449の発現量と相関がなかったが、無病生存期間では、発現量が高いと生存期間が延長する結果となった。以上から、miR449aの発現と大腸癌の進行には負の相関があることが示された。

次に、miR449aの大腸腫瘍形成における標的遺伝子の同定のために、miR449a欠損マウスと野生型マウスでの上部・下部結腸でのmRNAの増減をDNAマイクロアレイで調べた。既報で大腸癌と関連がある遺伝子の中で*Mih1*の発現がmiR449a欠損マウスの上部・下部結腸ともに低下しており、real-time PCRでも同様の結果が示された。*Mih1*は大腸癌の腫瘍抑制因子として知られており、大腸癌患者の癌組織のmiR449aの発現との関係を調べたところ、正の相関がみられた。以上からmiR449aは*Mih1*の発現を制御することで大腸癌発生に関与していることが示唆された。

今回、miR449aが*Mih1*の発現を制御する経路は解明できていないが、miR449aが*Mih1*の発現を増加させて、癌の発症や進行を制御することが示唆された。腫

様式 (8)

瘍形成における miR449a と *Mih1* のさらなる解明のために、miR449a 欠損マウスで *Mih1* を過剰発現させたモデルでの解析や、miR449a の *Mih1* の制御経路の解明が必要不可欠である。また、Notch シグナルは大腸癌を含めた様々な癌で腫瘍形成に関与する報告もあり、今回示した Notch シグナルによって発現した miR449a は、Notch シグナルで誘導された腫瘍形成促進遺伝子を抑制するための自己防衛シグナルとして働きがあるのかもしれない。この研究のさらなる解明により、miR449a が大腸癌の治療標的となり、また進行を示すマーカーとなり得る可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1366 号	氏名	仁木 昌徳
審査委員	主査 高山 哲治 副査 福井 清 副査 井本 逸勢		

題目 *MicroRNA-449a* deficiency promotes colon carcinogenesis
(マイクロ RNA449a の欠損は大腸での腫瘍形成を促進する)

著者 Masanori Niki, Kohei Nakajima, Daichi Ishikawa, Jun Nishida, Chieko Ishifune, Shin-ichi Tsukumo, Mitsuo Shimada, Shinji Nagahiro, Yoshinori Mitamura, Koji Yasutomo
平成 29 年 9 月 6 日発行 Scientific Reports 第 7 巻
article number:10696 に発表済
(主任教授 三田村 佳典)

要旨 Notch シグナルは種々の細胞の分化や増殖に関与することが知られており、申請者らはこれまで Notch シグナルが T 細胞の分化に重要な役割を果たすことを報告した。一方、microRNA (miRNA) は約 22 塩基からなる non-coding RNA であり、標的遺伝子を制御することにより細胞の増殖、分化、細胞死等に関与する。これまで、miRNA が Notch シグナルを制御することが報告されているが、逆に Notch シグナルが miRNA を制御するかどうかは検討されていない。そこで申請者らは、まず初めにマウス T 細胞に Notch1 の細胞内ドメインを遺伝子導入してシグナルを活性化し、miRNA の発現を網羅的に解析した。結果的に *miR-449a* の過剰発現を認めたため、そのノックアウト (KO) マウスを作製し、各種免疫細胞に対する効果を検討した。さらに、*miR-449a* は大腸に発現していること、また腫瘍化に関与することが報告されていることから、その大腸発癌に対する効果を検討した。得られた結果は以下の通りである。

- 1) Notch1 の細胞内ドメインを遺伝子導入したマウス T 細胞の miRNA アレイ解析では *miR-449a* が過剰発現しており、この結果は realtime PCR により確かめられた。Notch シグナルのエフェクターである *Rbpj* を KO すると、*miR-449a* 発現は抑制された。
- 2) *miR-449a* KO マウスを作製し、各種免疫細胞の分化や増殖を調べたが、野生型マウスに比べて有意な変化を認めなかった。
- 3) *miR-449a* KO マウスに azoxymethane を投与したところ、大腸腫瘍の個数及び大きさは、いずれも野生型マウスに比べて有意に増加した。
- 4) 大腸癌患者 76 例における *miR-449a* 発現を調べたところ、その低値群では高値群に比べて癌の深達度が深く、腫瘍径が大きく、生存期間が有意に短かった。
- 5) *miR-449a* KO マウスでは *Mlh1* の発現が抑制されており、ヒト大腸癌組織においても *miR-449a* と *Mlh1* 発現は関連した。

以上の結果より、*miR-449a* は *Mlh1* の発現を制御することで大腸発癌に関与することが示唆された。また、*miR-449a* が大腸癌の有効なバイオマーカーに、さらには治療標的になり得ることが示唆された。本研究は、今後の大腸癌研究の発展に大きく寄与するものであり、学位授与に値すると判定した。