

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」  
平成22年度採択研究代表者

|                |
|----------------|
| H23 年度<br>実績報告 |
|----------------|

浅原 弘嗣

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授  
(独立行政法人国立成育医療研究センターシステム発生・再生医学研究部・部長)

RNA 階層における炎症の時間軸制御機構の解明

## §1. 研究実施体制

### (1)「浅原」グループ

① 研究代表者:浅原 弘嗣 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科、教授)

#### ② 研究項目

- ・miRNA ターゲット同定システム開発
- ・miR-146 の成熟における時間軸
- ・miRNA 非依存的な炎症制御スクリーニング

### (2)「高田」グループ

① 主たる共同研究者:高田 修治 (独立行政法人国立成育医療研究センター 研究所 システム発生・再生医学研究部、部長)

#### ② 研究項目

- ・miRNA の網羅的同定システム開発

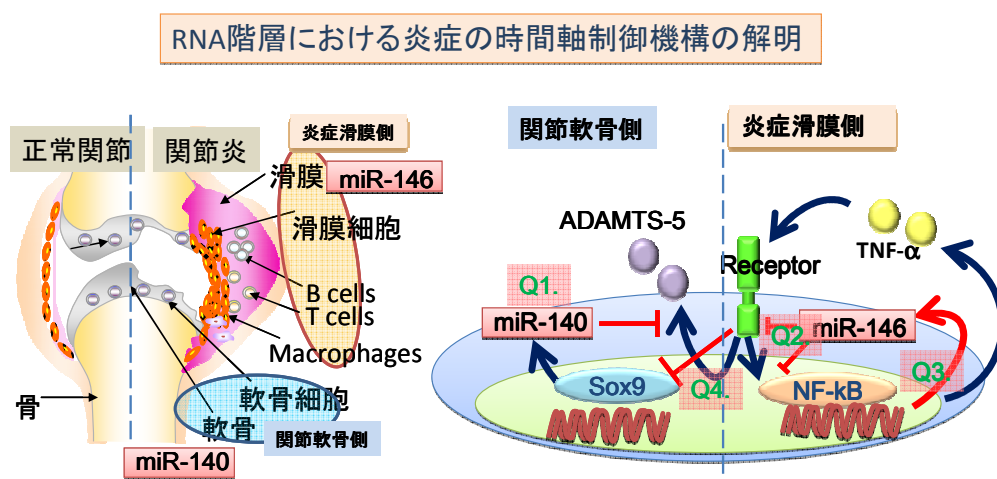
## §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### \* 研究のねらい

変形性関節症、関節リウマチなどの関節疾患では慢性炎症による軟骨組織の破壊により、患者は激痛を被り、日常生活における運動機能が著しく低下する。超高齢化社会が進行する日本においては患者数が今後も増加する傾向にあるが、未だこの炎症の分子病態は不明の点が多く、基礎・臨床研究に向けての新しい展開が急務とされている。

我々は、最近転写後調節に重要な機能をもつことが発見されたノンコーディング RNA の一つマイクロ RNA (miRNA) に注目し、関節炎においてその炎症を抑制する時空間特異的な miRNA、miR-140 と miR-146 の重要な機能を報告してきた (Miyaki et al, Genes Dev 2010, Yokoyama et al, Dev Cell 2009, Nakasa et al, Arthritis Rheum 2008)。本研究では、これらの発見を基盤として、新しい研究手法を確立、導入することで、RNA 階層における炎症の時空間軸制御分子メカニズムを明らかにすることを目標とする。すなわち、I) 時間軸および組織特異的な miRNA の網羅的同定、II) miRNA のターゲットの同定、III) miRNA の発現制御機構の解明、IV) 全遺伝子発現における miRNA 依存的または非依存的な転写後調節機構の関与およびその程度の解析等が重要な課題としてあがっている。本研究は以上の4つの問題に対し、複数の新しい研究技術を開発し、それらをシステムとして構築、稼働させることによって、関節炎をモデルにその時空間軸がどのように制御されているか、転写後ネットワークを包含して解明し、炎症性疾患の治療に応用する基盤を作ることを目標とする。



関節炎において組織を守るmiRNA: miR-140と、炎症を抑制するmiRNA; miR-146を同定

miR-146: 炎症滑膜側で、炎症シグナル収束を担う

miR-140: 関節軟骨側で、炎症により惹起される組織障害性因子を抑制し、恒常性を維持

- Q1. miRNAの網羅的同定
- Q2. miRNAのターゲット同定
- Q3. miRNAの発現調節メカニズム
- Q4. miRNA非依存的なRNA調節機構の解析

## \*研究成果

### I) 時間軸および組織特異的な miRNA の網羅的な同定

リウマチ検体および TNF- $\alpha$  刺激した A549 細胞から RNA を抽出し、miRNA の網羅的な同定を次世代シーケンサーにより行った。

軟骨細胞で発現する miRNA を同定するために、軟骨細胞のマスター転写因子である SOX9 を過剰発現した軟骨細胞を用いた miRNA のマイクロアレイを行った。その結果、既に報告のある miR-140 とともに、新しい miRNA を同定した。この miRNA に軟骨細胞で高発現し、これらを軟骨細胞で過剰発現させると炎症性サイトカインの IL-6 や IL-1 $\beta$  が抑制されることを見出した。

### II) miRNA のターゲットの同定

miRNA のターゲットをスクリーニングするシステムとして、ルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR 部分に約 5000 遺伝子の全長配列を挿入したレポーターベクターライブラリーと miRNA の発現ベクターを用いたルシフェラーゼアッセイシステムを構築し、miR-146a のターゲット遺伝子の同定を試みた。その結果、いくつかの候補遺伝子を同定し、現在これらについて詳細な解析を行っている。

### III) miRNA の発現制御機構の解明

軟骨細胞で発現し、過剰発現で関節炎を抑制する効果のある miR-140 の発現を調節する約 700bp のゲノム配列を細胞ベースのルシフェラーゼアッセイおよびトランスジェニックマウスによる *in vivo* の解析により同定した。<sup>1)</sup>

### IV) miRNA 非依存的な転写後調節機構

炎症性サイトカインである IL-6 を転写後調節する新たな miRNA 非依存的因子を同定するために、ルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR に IL-6 の 3'UTR を挿入したレポーターベクターを作製し、約 6000 個の発現ベクターライブラリーを用いたルシフェラーゼアッセイシステムによりスクリーニングを行った。その結果、このレポーター活性を低下させる遺伝子がいくつか見つかった。そのうちの 1 つのジンクフィンガータンパク質は、過剰発現により IL-6 の mRNA 分解を促進し、ノックダウンでは IL-6 の mRNA 量の増加を認め、IL-6 を転写後調節する新たな遺伝子である可能性が示された。

## \*今後の展望

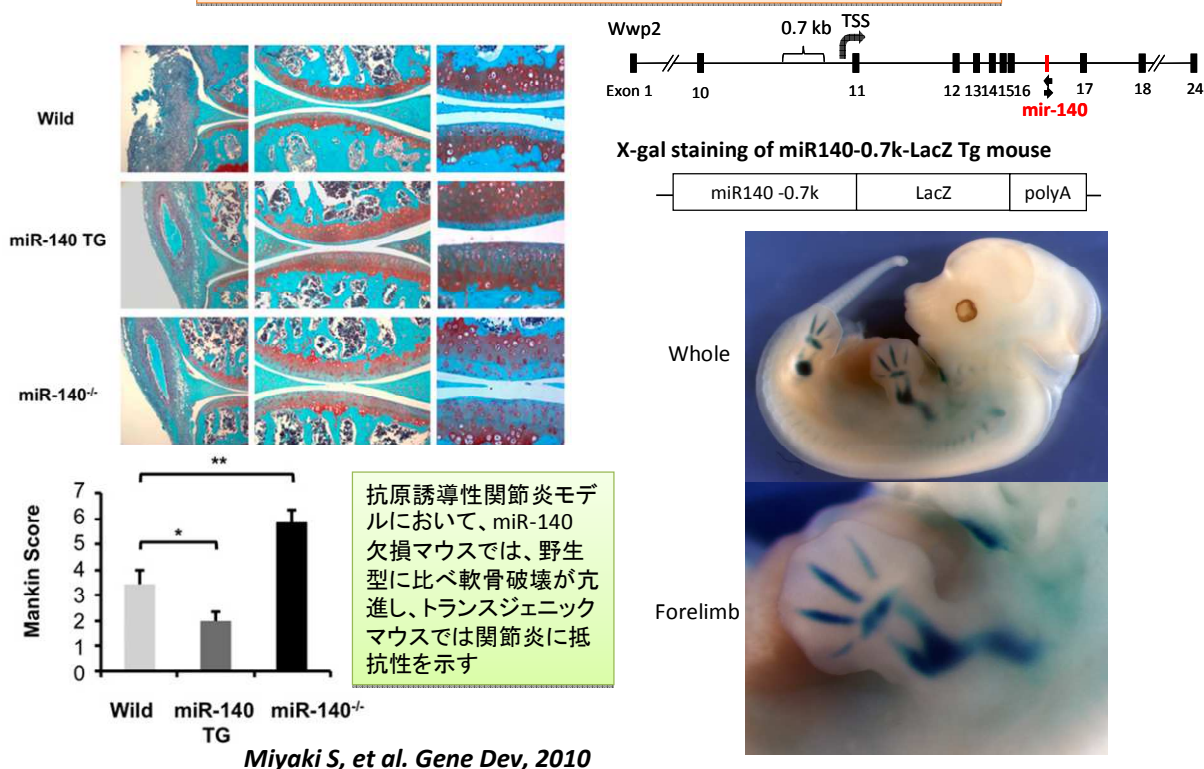
炎症に関与する新たな miRNA の同定は、現在行っている次世代シーケンサーを用いたデータの解析を進め、培養細胞レベルおよび個体レベルで炎症における miRNA の発現について検証していく。miR-455 についてはノックアウトマウスの作製・解析を行い、関節炎での機能について個体レベルで調査する。miR-146a のターゲット遺伝子の同定は、ターゲット候補遺伝子の miR-146a が作用するシーケンスを point mutation レポーターを用いた解析により明らかにする。また miR-146a ノックアウトマウスを作製し、関節炎モデルでの miR-146a の影響とターゲット候補遺

伝子の発現を調査する。miRNA 非依存的な転写後調節機構については、IL-6を転写後調節している可能性があるジンクフィンガータンパク質のノックアウトマウスを作製し、炎症における機能について *in vivo* で調査する。これらの研究を通じて、炎症に関わる miRNA の同定、そのターゲット遺伝子および発現制御機構の解明、さらに miRNA 非依存的な転写後調節機構の解明を行い、炎症における転写後調節ネットワークを明らかにし、それらのデータをもとに関節リウマチなどの慢性炎症疾患患者検体を用いた解析を行い、慢性炎症の発症機序の解明を目指す。

また、TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインの異常な産生が慢性炎症の原因の一つであると考えられるが、我々は、これら遺伝子のプロモーター・エンハンサーを特異的に単離する技術を開発し、慢性炎症においてこれらプロモーター・エンハンサーに結合している転写関連因子やノンコーディング RNA などの同定を行い、慢性炎症における異常な発現誘導の原因を調査する。

### miRNAの発現調節メカニズム

#### miR-140 上流0.7kb領域に軟骨特異的なエンハンサーを同定



### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokoyama S, Sato T, Barrionuevo F, Akiyama H, Scherer G, Takada S, Asahara H. L-Sox5 and Sox6 enhance chondrogenic miR-140 expression by strengthening dimeric Sox9 activity. *J Biol Chem.* (in revision)
2. Watanabe T, Oyama T, Asada-Miyaki M, Harada D, Katsube K, Suzuki Y, Sugano S, Karsenty G, Komori T, Kitagawa M, Asahara H. MAML1 regulates the transcriptional activity of Runx2 in a Notch-independent manner and plays a role in osteoblast differentiation and bone development. *Plos Genet.* (in revision)