

「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

H24 年度 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

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)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>

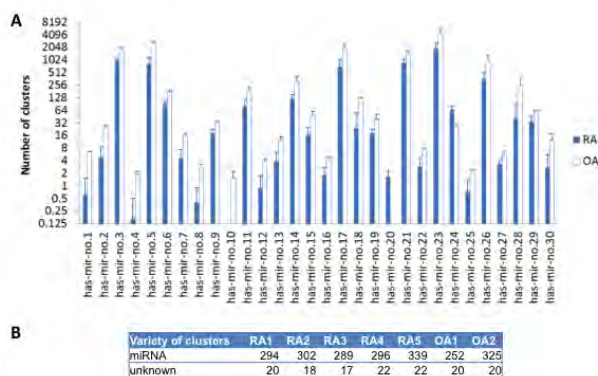
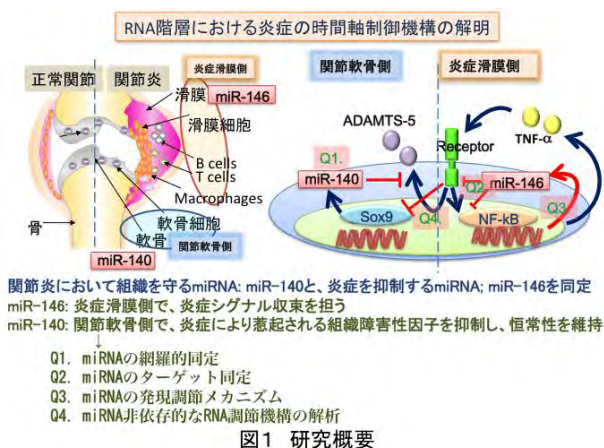
我々は、最近転写後調節に重要な機能をもつことが発見されたノンコーディング RNA の一つマイクロ RNA (miRNA) に注目し、関節炎においてその炎症を抑制する自空間特異的な miRNA、miR-140 と miR-146 の重要な機能を報告してきた。本研究では、これらの発見を基盤として、新しい研究手法を確立、導入することで、RNA 階層における炎症の時空間軸制御分子メカニズムを明らかにすることを目標に、I)時間軸および疾患特異的な miRNA の網羅的な同定、II) miRNA のターゲットの同定、III) miRNA の発現制御機構の解明、IV) miRNA 非依存的な転写後調節機構の解明を行っていく (図 1)。

### <研究成果>

#### I) 次世代シーケンサーを用いた炎症の時空間軸及び疾患特異的な miRNA の網羅的な同定

平成 24 年度は関節リウマチ (RA) および変形性関節症 (OA) 由来滑膜組織と血球系細胞株である THP-1、関節炎の主体となる関節滑膜細胞の炎症性サイトカイン刺激後時間軸における miRNA の発現変動および RNA エディッシングを次世代シーケンサーにて解析した。これまでに RNA エディッシングについては検出されていない。RA/OA 滑膜の miRNA 発現比較では、RA 滑膜において発現が有意に亢進または低下している miRNA がいくつか得られた (図 2 A)。また、新規の miRNA と考えられる配列も得られている (図 2 B)。これらのデータと比較するための滑膜におけるサイトカインなどの mRNA 発現などを測定中である。TNF $\alpha$  刺激を行った THP-1 については炎症性 miRNA である miR-146a を中心にクラスター解析を行った。また、炎症性サイトカイン刺激実験のための滑膜細胞は収集した滑膜より分離し、IL-1 $\beta$  刺激後経時的に RNA を取得し、miRNA シーケンスを行った。

また、TALEN 技術を用いた新たなノックアウトマウス作製法の開発を行った。TALEN は DNA 結合配列をカスタマイズすることが可能な人工 DNA 結合タンパク質にヌクレアーゼを付加したもので、目的のゲノム配列を切断できる。この TALEN mRNA を受精卵にイ



A: RA/OA滑膜におけるmiRNA発現比較において有意差があったもの  
B: 各滑膜サンプルにおいて検出されたmiRNAと未知のmiRNAの種類数

図2 次世代シーケンサーを用いた関節リウマチmicroRNA解析

ンジェクションし、マウスを作製することで ES 細胞での相同組み換えを介さずにノックアウトマウスを作製することが可能となる。我々は、miR-146a と、滑膜組織で高発現していた miR-10a/b 遺伝子に対する TALEN を用いて、それぞれの miRNA の変異マウスを作製することに成功した。今後はこの技術を用いて上記高速シーケンサーによる解析により同定した miRNA の個体レベルでの機能解析を行っていく。

## 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、既知の標的遺伝子である TRAF6 と 1 つの新たな標的候補を同定した。また、TRAF6 には miR-146a の標的配列が 3'-UTR に 2 つ存在するが、片方に変異を導入すると miR-146a による活性低下が見られなくなることが分かり、複数箇所への miRNA の結合が発現抑制に重要である可能性が示された。

## 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 の発現を調節するゲノム領域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。さらに Sox5、Sox6 および Sox9 がこのゲノム領域を制御していることを明らかにした<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増加させる遺伝子として RNA 結合タンパク質が見つかった。そのタンパク質は過剰発現により IL-6 の mRNA を安定化し、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。

### <今後の見通し>

炎症に関与する新たな miRNA の同定は、次世代シーケンサーを用いたデータの解析を進め、細胞および個体レベルで炎症における miRNA の機能について検証していく。miR-146a の標的遺伝子の同定は、TRAF6 の解析から、標的遺伝子の複数箇所に miRNA が結合することが重要である可能性が示され、miR-146a と同期して発現する他の miRNA との協調的な働きが重要であるという仮説について検討を行う。また、IL-6 を転写後調節している可能性がある RNA 結合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。また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 TALEN 技術を用いて、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、発現制御を行う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。

### §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**. 22;287(26):22206-15. 2012 doi: 10.1074/jbc.M112.343194.
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**. 9(1):e1003132. 2013. doi: 10.1371/journal.pgen.
3. Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MicroRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- $\kappa$ B activity by directly targeting DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) expression. **Hepatology**. 57(1):162-70. 2013. doi: 10.1002/hep.26011.
4. Matsukawa T, Sakai T, Yonezawa T, Hiraiwa H, Hamada T, Nakashima M, Ono Y, Ishizuka S, Nakahara H, Lotz MK, Asahara H, Ishiguro N. MicroRNA-125b Regulates the Expression of Aggrecanase-1 (ADAMTS4) in Human Osteoarthritic Chondrocytes. **Arthritis Res Ther**. 15(1):R28. 2013.
5. Nakahara H, Hasegawa A, Otabe K, Ayabe F, Matsukawa T, Onizuka N, Ito Y, Lotz M, and Asahara H. Transcription factor Mohawk and the pathogenesis of human anterior cruciate ligament degradation. **Arthritis Rheum**. (in revision)

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)