

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19439

研究課題名(和文) アレルギー疾患におけるヒト上皮細胞microRNAの役割

研究課題名(英文) The role of miRNA in airway epithelial cells

研究代表者

五十嵐 ありさ (Igarashi, Arisa)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・(非)研究員

研究者番号：60572998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：喘息発症に重要な遺伝子IL-33を制御するmiRNAを同定するため、気道上皮細胞におけるmiRNAの発現について検討を行った。

その結果、IL-33を直接制御する新たなmiRNAは同定できなかったが、IL-33デコイ受容体sST2の発現を制御するmiR-29を見出した。さらにmiR-29はIFNAR1の発現も抑制し、Exosomeを介して細胞外に産生された。以上のことから、miR-29は気道上皮細胞のsST2およびIFNAR1の発現制御を介して、IL-33依存性的アレルギー炎症および気道のウイルス感染を起因とする喘息発症の分子機序に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify miRNAs that regulate expression of IL-33, an important cytokine gene for asthma development, expression of miRNAs in human airway epithelial cells was investigated. Consequently, although a novel miRNA directly controlling IL-33 expression could not be identified, miR-29 was found to regulate epithelial expression of both soluble ST2 (sST2), a decoy receptor for IL-33, and IFNAR1, a type 1 interferon receptor. Furthermore, I found that miR-29 is produced extracellularly via exosomes secreted by airway epithelial cells. These results suggest that miR-29 may be involved in the IL-33-dependent molecular mechanisms of asthma development, triggered by respiratory viral infection, via regulation of sST2 and IFNAR1 expression in the airway epithelial cells.

研究分野：アレルギー

キーワード：microRNA 上皮細胞 喘息

### 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は、細胞内に内在する長さ 18-24 塩基程度の small RNA であり、他の遺伝子発現を調節する機能を有する非翻訳性 RNA の一種として、細胞の発生・分化・増殖など細胞機能の根幹に関わっている。特にがん研究分野における進展は目覚ましく、疾患特異的な miRNA が数多く同定され、診断・治療に役立つ臨床実用化に向けての応用研究が精力的に進められているが、喘息に関与する miRNA については知見が限られており、喘息発症に決定的な役割をはたす miRNA は同定されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの様々な手法 (遺伝子改変マウスを含めた動物実験、喘息患者検体を用いた臨床研究、さらにゲノムワイド関連解析など) による研究から、その発現や機能が喘息発症に決定的な役割を果たすことが既に判明している遺伝子群 (IL-33 や TSLP) の発現を制御する miRNA の同定を目指す。

我々は既に構築していた mRNA と miRNA 発現の相関を検索できるデータベースにより、IL-33 や TSLP の mRNA 発現と有意な相関がある候補 miRNA を見出していた。本研究ではこれらの miRNA の機能評価を行い、真に IL-33 や TSLP 発現制御に決定的な miRNA を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ① 候補 miRNA の抽出

予備調査において IL-33 や TSLP の mRNA 発現と有意な相関があった miRNA を候補として抽出した。次に、気道上皮細胞に候補 miRNA を過剰発現させ、標的遺伝子 (IL-33, TSLP) の発現変動を qPCR により測定した。また、過去の報告から IL-33 または sST2 の発現制御に関与すると考えられる miRNA の候補についても抽出した。

#### ② 刺激による反応性の確認

sST2 の発現を制御する可能性のある miRNA の機能を評価するため、sST2 の発現が変動する条件の検討を行った。気道上皮細胞培養株 (BEAS-2B) を IL4, TNF $\alpha$  または IL4+TNF $\alpha$  で刺激し、培養上清中に産生される sST2 を、ELISA を用いて検出した。また、細胞および Exosome 中 miRNA を qPCR により測定した。

#### ③ 強制発現・ノックダウンによる評価

BEAS-2B において miRNA を過剰発現またはノックダウンさせ、②において最も sST2 の発現が誘導された刺激条件 (IL4+TNF $\alpha$ ) で刺激を行い、Western blotting または ELISA により標的遺伝子のタンパク発現量を確認した。

### 4. 研究成果

#### ① 候補 miRNA の抽出

IL-33 および TSLP と相関を示す miRNA として、hsa-miR-548c-5p と hsa-miR-3666 を候補として選択した。各 miRNA を気道上皮細胞に過剰発現させ、IL-33, TSLP の発現を qPCR/qPCR により測定したが、その発現量に変化は見られなかった。

また、過去の報告から IL-33 のデコイレセプターである sST2 を標的遺伝子とする miRNA として has-miR-29 (miR-29) を候補として選択した。

#### ② 刺激による反応性の確認

miR-29 の機能を評価するため、sST2 の発現が誘導される条件の検討を行った。その結果、IL4+TNF $\alpha$  で刺激した時、最も高く sST2 が産生された (図 1)。この時、細胞及び培養上清中に産生される Exosome 中の miR-29 を qPCR により測定した結果、刺激後 48 時間で、miR-29a の発現量が未刺激と比較して有意に増加した (図 2)。

さらに、Exosome 中からも miR-29 が検出された。Western blotting により Exosome の量を比較した結果、サイトカイン刺激により産生される Exosome の量が増加することが明らかとなった (図 3)。

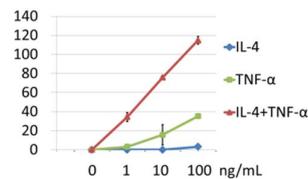


図1 サイトカイン刺激による培養上清中sST2濃度

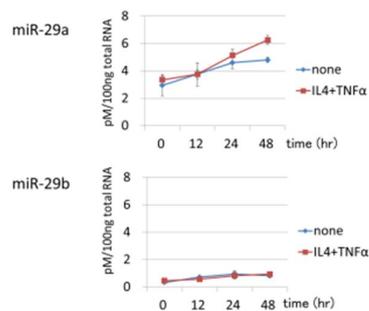


図2 サイトカイン刺激におけるmiR-29の経時的変化

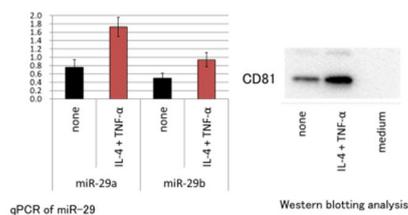


図3 Exosome中に含まれるmiR-29濃度 ExosomeのWestern blotting analysis

### ③ 強制発現・ノックダウンによる評価

気道上皮細胞をサイトカイン IL4+TNF $\alpha$  で刺激すると、sST2 の発現が上昇する。この時 miR-29 の特異的 Inhibitor により miR-29 の発現を抑制したところ、sST2 発現はさらに上昇した。また、miR-29 を過剰発現することにより sST2 の発現上昇は抑制された。このことから、miR-29 がサイトカイン刺激により誘導された sST2 の発現を抑制する働きがあることが明らかとなった。一方、受容体タンパク ST2 の発現は抑制しておらず、さらに、miR29 は上皮細胞において IFNAR1 の発現も抑制した。(図 4)。

これらのことから、miR29 の発現上昇は、IL-33 のシグナルを増強する働きがあると考えられる。

一方、miR29 は上皮細胞において IFNAR1 の発現も抑制した。このことは、ウイルス感染において miR29 がウイルスの増殖を助ける働きも持つことを示唆する。このことは、未だ詳細が明らかではないウイルス感染とアレルギー疾患との関係を解明する手がかりとなる可能性も考えられる。

以上のことから、本研究において、上皮細胞の microRNA が sST2 の発現制御を介して IL-33 のシグナルを制御し、またウイルス感染に関わる遺伝子 IFNAR1 にも影響を及ぼし、喘息発症に関与している可能性が示唆された。

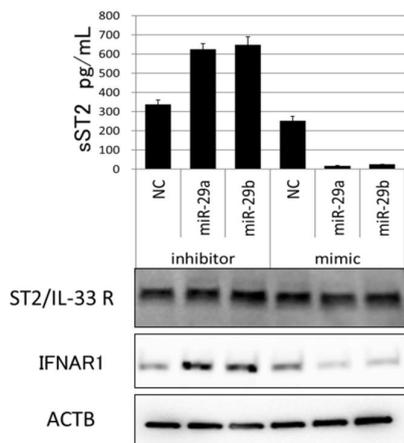


図4 気道上皮細胞のsST2, ST2/IL-33R, IFNAR1発現におけるmiR-29の影響

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

Y. Ito, A. Inoue, T. Seers, Y. Hato, A. Igarashi, T. Toyama, K. D. Taganov, M. P. Boldin, and H. Asahara, "Identification of targets of tumor suppressor microRNA-34a using a reporter library system," vol. 114, no. 15, pp. 1-6, 2017., 査読有

DOI: 10.1073/pnas.1620019114.

M. Sakaki, Y. Ebihara, K. Okamura, K. Nakabayashi, A. Igarashi, K. Matsumoto, K. Hata, Y. Kobayashi, and K. Maehara, "Potential roles of DNA methylation in the initiation and establishment of replicative senescence revealed by array-based methylome and transcriptome analyses," pp. 1-22, 2017., 査読有  
DOI: [10.1371/journal.pone.0171431](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171431).

T. Takeda, H. Unno, H. Morita, K. Futamura, M. Emi-Sugie, K. Arae, T. Shoda, N. Okada, A. Igarashi, E. Inoue, H. Kitazawa, S. Nakae, H. Saito, K. Matsumoto, and A. Matsuda, "Mechanisms of allergy and clinical immunology Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation," J. Allergy Clin. Immunol., vol. 138, no. 5, p. 1395-1403.e6, 2017., 査読有  
DOI: [10.1016/j.jaci.2016.01.032](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.01.032).

H. Tsumura, M. Ito, M. Takami, M. Arai, X. Li, T. Hamatani, A. Igarashi, S. Takada, K. Miyado, and A. Umezawa, "Conditional deletion of CD98hc inhibits osteoclast development," Biochem. Biophys. Reports, vol. 5, pp. 203-210, 2016., 査読有  
DOI: [10.1016/j.bbrep.2015.11.023](https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.023).

Y. Katoh-Fukui, M. Igarashi, K. Nagasaki, R. Horikawa, T. Nagai, T. Tsuchiya, E. Suzuki, M. Miyado, K. Hata, K. Nakabayashi, K. Hayashi, Y. Matsubara, T. Baba, K. Morohashi, A. Igarashi, T. Ogata, S. Takada, and M. Fukami, "Testicular dysgenesis/regression without campomelic dysplasia in patients carrying missense mutations and upstream deletion of SOX9," Mol. Genet. Genomic Med., vol. 3, no. 6, pp. 550-557, 2015., 査読有  
DOI: [10.1002/mgg3.165](https://doi.org/10.1002/mgg3.165).

[学会発表] (計 2 件)

- ① Arisa Igarashi, "MicroRNA-29 suppresses cytokine-mediated production of soluble IL-33 receptor, sST2, by bronchial epithelial cells", AAAAI/WAO Joint Congress, 2018
- ② 五十嵐ありさ、「MicroRNA-29 は気道上皮細胞の IFNAR1 発現および sST2 産生を抑制する」、第 67 回日本アレルギー学会学術大会、2018

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 ありさ (IGARASHI, Arisa)  
国立成育医療研究センター研究所・免疫ア  
レルギー・感染研究部・研究員  
研究者番号：60572998

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

岡村 浩司 (OKAMURA, Kohji)  
松田 明生 (MATSUDA, Akio)  
松本 健治 (MATSUMOTO, Kenji)