

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08895

研究課題名(和文) 長鎖非コードRNA (lncRNA) の機能制御による新たな炎症制御法の創成

研究課題名(英文) The emerging roles of long noncoding RNA in inflammatory diseases.

研究代表者

関亦 正幸 (SEKIMATA, Masayuki)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80250190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症などの全身性炎症反応症候群は過剰なサイトカイン産生を原因とする致死性疾患であるが、有効な治療法は確立されていない。そこで、研究代表者は気管支喘息の原因サイトカインであるインターロイキン(IL-9)に着目し、IL-9遺伝子のサイレンサー領域から転写される長鎖非コードRNA (lncRNA) を同定した。この新規 lncRNA は、細胞核内で lncRNA-タンパク質複合体として染色体DNAに作用することでIL-9遺伝子の転写抑制に関与していることを解明した。この lncRNA-タンパク質複合体の機能を改変する技術を利用し、過剰なサイトカイン産生を調節する新たな炎症制御法の創成を推進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症などの全身性炎症反応症候群は、病原体感染を契機とした過剰なサイトカイン産生を主因とする致死性疾患であるが、有効な治療法は確立していない。研究代表者は、サイトカイン遺伝子近傍のサイレンサー領域から転写される lncRNA が、タンパク質複合体として染色体DNAの構造変換を制御することでサイトカイン産生を調節するレギュレーター機能を有していることを解明した。本研究成果は、タンパク質情報をコードしていない lncRNA の機能解明が世界的にも進んでいないことから学術的意義があるばかりか、lncRNA によるサイトカイン産生調節能力を活用した新規治療法の開発に繋がることから社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Systemic inflammatory response syndrome such as sepsis is a fatal disease caused by enhanced proinflammatory cytokine production, and effective therapeutics are not currently available. Here, we focused on the proinflammatory cytokine interleukin-9 (IL-9) that is thought to be implicated in the pathogenesis of human severe bronchial asthma. We identified a novel long noncoding RNA (lncRNA) that is transcribed from the IL-9 silencer element we previously discovered. Moreover, we revealed that the lncRNA is associated with several specific nuclear proteins and the formation of lncRNA-protein complex is the molecular mechanism responsible for transcriptional repression through directly acting on the specific genomic DNA regions. Finally, we aimed to develop an effective and novel therapeutic strategy for inflammatory disorders through the employment of the modified function of lncRNA-protein complex.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：長鎖非コードRNA サイトカイン 炎症 エピジェネティクス 転写制御 免疫細胞

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症などの全身性炎症反応症候群は、過剰なサイトカイン産生で重症化する致死性の高い疾患である。しかし、どのような機構で免疫系が過剰な反応を示し、大量のサイトカインを一気に放出するのか詳細についてはよく分かっていない。そのため有効な治療法が確立していないのが現状である。以上の理由から、サイトカイン産生を転写レベルで抑制できる安全で有効な治療法の開発が期待されている。研究代表者は、サイトカイン産生を適正に保つために、タンパク質の遺伝情報を持たない長鎖非コード RNA ( lncRNA : long noncoding RNA ) に着目し、この lncRNA による遺伝子発現調節機能を利用した新たな炎症制御法の創成を目指し研究を開始した。そこで、ヒト気管支喘息重症化の原因サイトカインであるインターロイキン 9 ( IL-9 ) に着目した。これまでの先行研究で、IL-9 遺伝子の下流 6 kb の非コード DNA 領域にサイレンサーを同定し、このサイレンサーは IL-9 遺伝子プロモーターに作用して転写を抑制できることを見出した。しかも、このサイレンサー領域からはタンパク質情報をコードしない lncRNA が転写されていることを世界に先駆け突き止めた。IL-9 サイレンサーの持つ転写抑制機能を、この lncRNA が担っている可能性がある。そこで本研究では、IL-9 遺伝子座から転写される lncRNA の実体解明を進めることで、lncRNA による IL-9 遺伝子発現調節機能を利用した新たな炎症制御法の創成を目指して研究を推進した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、サイトカイン産生を遺伝子の転写レベルで適正に保つために、タンパク質の遺伝情報を持たない lncRNA による遺伝子発現調節機能を利用した新たな炎症制御法の創成を目指すことにある。lncRNA は、いわゆる一般的な遺伝子から転写されてタンパク質の遺伝情報をコードしている mRNA とは異なり、タンパク質の情報を持たないことからその機能はよく分かっていない。lncRNA は mRNA よりも存在数が多いと推測されているが、転写量が少ないことや、どの染色体 DNA 領域から転写されているか未確定であることから、機能の解明がほとんど進んでいないのが現状である。しかし、lncRNA の機能異常が様々なヒト疾患発症に關与する可能性が示唆されていることから、lncRNA の機能解明は学術的・社会的に期待されている喫緊の研究課題である。本研究は、lncRNA による IL-9 転写抑制機構の実体解明を進めることで、lncRNA の機能改変に立脚した新しい炎症制御法の創成を目指すことを研究の目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究目的を達成するため以下の 2 つの手順方法により研究を実施した。( 1 ) lncRNA による IL-9 転写抑制機構の実体解明と、( 2 ) lncRNA の機能改変に立脚した新規炎症制御法の創成を達成するための実験システムの構築を進めた。

### ( 1 ) lncRNA による IL-9 転写抑制機構の実体解明

#### 完全長 lncRNA の塩基配列の決定

lncRNA の機能解明には、IL-9 サイレンサーから転写される正確な RNA 塩基配列の情報が必要である。そこで、RACE ( Rapid Amplification of cDNA End ) 法により完全長 lncRNA の塩基配列を解読し、染色体 DNA 上のどの部分が RNA として転写されるのか( 転写開始点と終結点、

lncRNA のサイズ) を決定する。

#### lncRNA 結合タンパク質の同定

タンパク質をコードしていない lncRNA は、特定の結合タンパク質と複合体を形成して機能しすると推定されることから、これらの lncRNA に結合するタンパク質をプルダウン精製法にて単離し、LC-MS/MS 法による質量分析で結合タンパク質を決定する。

#### lncRNA の発現状態の解析

ヘルパーT (Th) 細胞分化過程のどの時期に lncRNA が転写され、機能しているのかを明らかにするために、マウス脾臓より調製した Th 細胞の初代培養細胞を用いて、RT-PCR 法で lncRNA の発現時期と発現量を決定する。この解析により、どの Th 細胞分化シグナルの下流で lncRNA 自体が転写され機能しているか明らかにする。

#### lncRNA 欠損ゲノム編集マウスの作製と表現型解析

lncRNA のマウス個体レベルでの機能を明らかにする目的で、lncRNA を含む IL-9 サイレンサー領域を欠損させたマウスをゲノム編集技術で作製する。作製したマウスの脾臓より調製した Th 細胞の初代培養細胞を用いて IL-9 遺伝子の発現を解析する。

#### 次世代シーケンサーを用いた lncRNA-タンパク質複合体の作用機序の解析

lncRNA-タンパク質複合体が細胞の核内で、どのようなメカニズムで IL-9 遺伝子自体に作用し、IL-9 の転写調節に関与しているのかを明らかにするため、NGS を用いた CHART 法での解析を進めている。CHART 法では、Th 細胞を直接ホルマリンで処理することで、lncRNA-タンパク質複合体と染色体 DNA の三者が会合した状態で固定できる。この三者会合体を NGS で解析することで、lncRNA-タンパク質複合体が染色体 DNA のどの領域に標的として結合し、転写抑制に関与しているか作用機序を解明できる。

## ( 2 ) lncRNA の機能改変に立脚した新規炎症制御法の創成

#### 転写活性測定用レポーターベクターの作製

lncRNA の転写抑制活性を測定するために、高感度のレポーターベクターと導入細胞が必要となる。ルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子や GFP 遺伝子をレポーターとして、マウス IL-9 プロモーター下流に組込んだ活性測定用ベクターを作製する。これらのベクターに lncRNA を含む DNA 配列を挿入することで、転写抑制活性を定量化・可視化するベクターシステムをさらに構築する。

#### 活性測定用レポーター細胞の樹立と低分子化合物のスクリーニング

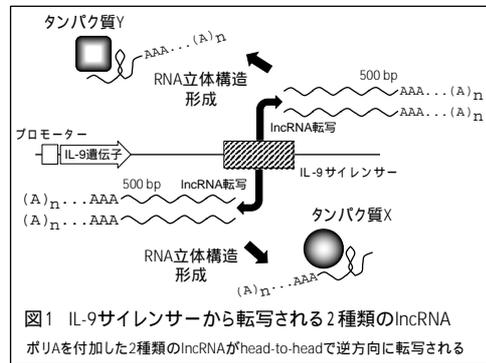
作製した各種レポーターベクターを安定導入したマウス T 細胞株を樹立して、ハイスループットな低分子化合物のスクリーニング系の構築を進める。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) lncRNA による IL-9 転写抑制機構の実体解明

## 完全長 lncRNA の塩基配列の決定

RACE ( Rapid Amplification of cDNA End ) 法により完全長 lncRNA の塩基配列を解読し、染色体 DNA 上のどの部分が RNA として転写されるのか( 転写開始点と終結点、lncRNA のサイズ ) を決定した。その結果、約 500bp のポリ A を付加した 2 種類の RNA が 5'側と 3'側の両方向に head-to-head で転写されていることを解明した ( 図 1 )。



## lncRNA 結合タンパク質の同定

タンパク質をコードしていない lncRNA は、特定の結合タンパク質と複合体を形成して機能しすると推定されることから、これらの lncRNA に結合するタンパク質をプルダウン精製法にて単離し、LC-MS/MS 法による質量分析で結合タンパク質を決定した。その結果、エピジェネティクス修飾と RNA 結合に関わる分子群を lncRNA 結合タンパク質の候補分子として同定できた ( 未発表データ )。

## lncRNA の発現状態の解析

ヘルパーT ( Th ) 細胞分化過程のどの時期に lncRNA が転写され、機能しているのかを明らかにするために、マウス脾臓より調製した Th 細胞の初代培養細胞を用いて、RT-PCR 法で lncRNA の発現時期と発現量を決定した。この解析により、どの Th 細胞分化シグナルの下流で lncRNA 自体が転写され機能しているか明らかにした。その結果、IL-9 を発現していない Th1 細胞において IL-9 lncRNA の発現が見られ Th9 細胞では全く発現が見られなかった。以上の結果より、IL-9 lncRNA は Th1 細胞において強い転写抑制装置として機能していることを解明した。

## lncRNA 欠損ゲノム編集マウスの作製と表現型解析

lncRNA のマウス個体レベルでの機能を明らかにする目的で、lncRNA を含む IL-9 サイレンサー領域を欠損させたマウスをゲノム編集技術で作製した。作製したマウスの脾臓より調製した Th 細胞の初代培養細胞を用いて IL-9 遺伝子の発現解析を行なったところ、Th9 細胞で IL-9 の強い発現増強が見られた。以上の結果より、lncRNA は Th9 細胞において、IL-9 の発現を適正に維持する転写抑制機能を有していることが判明した。

## 次世代シーケンサーを用いた lncRNA-タンパク質複合体の作用機序の解析

NGS を用いた CHART 法での解析を進めている。CHART 法では、Th 細胞を直接ホルマリンで処理することで、lncRNA-タンパク質複合体と染色体 DNA の三者が会合した状態で固定できる。この三者会合体を NGS で解析することで、lncRNA-タンパク質複合体が染色体 DNA のどの領域に標的として結合し、転写抑制に関与しているか作用機序を解明できる。解析の結果、lncRNA-タンパク質複合体は、細胞分化に応答し特定の染色体 DNA を標的として結合することが判明した。現在、IL-9 遺伝子から遠位のサイレンサーがどのような分子機構で転写調節に関与できるのか解析を進めている。

## ( 2 ) lncRNA の機能改変に立脚した新規炎症制御法の創成

### 転写活性測定用レポーターベクターの作製

lncRNA の転写抑制活性を測定するための高感度のレポーターベクター(ルシフェラーゼ(Luc)遺伝子や GFP 遺伝子)と導入樹立細胞を構築した(図2)。これらのベクターに lncRNA を含む DNA 配列を挿入することで、転写抑制活性を定量化・可視化するベクターシステムをさらに構築した。その結果、lncRNA 依存的に転写抑制が定量化できる安定樹立細胞株の構築に成功した。現在、ハイスループットな低分子化合物のスクリーニングのための準備を進めている。これにより lncRNA 複合体の機能を阻害・活性化する化合物をし、化合物の作用機序や細胞毒性を解析することで安全かつ効率的な炎症制御法の創成を目指す。

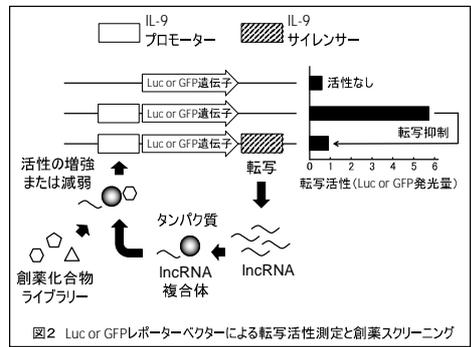


図2 Luc or GFPレポーターベクターによる転写活性測定と創薬スクリーニング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murakami-Sekimata Akiko, Sekimata Masayuki, Sato Natsumi, Hayasaka Yuto, Nakano Akihiko	4. 巻 30
2. 論文標題 Deletion of PIN4 Suppresses the Protein Transport Defects Caused by sec12-4 Mutation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbial Physiology	6. 最初と最後の頁 25 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000509633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekimata Masayuki, Yoshida Daiki, Araki Akemi, Asao Hironobu, Iseki Ken, Murakami-Sekimata Akiko	4. 巻 202
2. 論文標題 Runx1 and ROR $\alpha$ Cooperate to Upregulate IL-22 Expression in Th Cells through Its Distal Enhancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3198 ~ 3210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayashi Manabu, Machida Takeshi, Ishida Yumi, Ogata Yusuke, Omori Tomoko, Takasumi Mika, Endo Yuichi, Suzuki Toshiyuki, Sekimata Masayuki, Homma Yoshimi, Ikawa Masahito, Ohira Hiromasa, Fujita Teizo, Sekine Hideharu	4. 巻 203
2. 論文標題 Cutting Edge: Role of MASP-3 in the Physiological Activation of Factor D of the Alternative Complement Pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1411 ~ 1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関亦明子、推名裕美、牧野貴大、関亦正幸
2. 発表標題 マウス胎児顎下腺上皮細胞の無血清培養の試みにおける増殖因子と低分子化合物の検索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会、福岡
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	関亦 明子  (SEKIMATA Akiko)  (50321823)	山形大学・医学部・准教授   (11501)	
研究 分担者	伊関 憲  (ISEKI Ken)  (70332921)	福島県立医科大学・医学部・教授   (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------