

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：37128

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16425

研究課題名(和文)放射線誘発線維症における非コードRNAを介した作用機序の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Involvement of non-coding RNA in radiation induced fibrosis and application of its treatment

研究代表者

矢野 博之 (Yano, Hiroyuki)

純真学園大学・放射線技術科学科・講師

研究者番号：50448552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線誘発線維症(RIF)は、コラーゲン等の細胞外マトリックス構成因子の過剰な蓄積の結果と考えられている。今回の研究では、コラーゲン線維の大きさを制御するV型コラーゲンへの放射線の影響について調べた。その結果、放射線照射したマウス線維芽細胞において、転写レベルおよびmiR-29を介した転写後のレベルでV型コラーゲンの発現が増加することが分かった。さらに、線維化促進因子であるCTGFに対しても放射線による線維化形成においてmiR-26が抗線維化因子として重要な役割を担うことが分かった。これらの結果は、RIFにおける治療ターゲットとしてのmiR-29及びmiR-26の潜在的な可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線誘発線維症(RIF)に関して、ECM構成因子であるコラーゲンの転写後の発現調節について調べた結果、非コードRNAであるmiR-29が直接作用すること、そしてmiR-26に関しては線維化促進因子であるCTGFを介して作用することが分かった。線維化の治療標的の一つとしてTGF- β があるが、TGF- β は線維化以外にも抗炎症作用等、生体において重要な役割を担い、副作用を考慮して治療標的とすることは困難である。したがって、本実験で明らかにしたmiR-29やmiR-26による転写後のコラーゲンの発現調節を標的とできれば、RIFに対するより安全な治療薬の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Radiation-induced fibrosis (RIF) is thought to be the result of the excessive accumulation of collagen and other extracellular matrix components. In the present study, we investigated the effects of radiation on type V collagen, which regulates the size of collagen fibrils. The expression of type V collagen is increased in irradiated mouse fibroblasts at the level of transcription and miR-29-mediated post-transcriptional regulation of expression. In addition, we found that miR-26 acts as a negative regulator of CTGF, a profibrotic factor. These results indicate the potential utility of miR-29 and miR-26 as therapeutic targets in RIF.

研究分野：放射線管理

キーワード：放射線誘発線維症 コラーゲン miRNA

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は、肺がん等に対する非外科学的治療法の最も重要な方法の一つである一方、放射線治療の有効性は放射線誘発線維症(Radiation Induced Fibrosis: RIF)によって大幅に制限される。臨床において、RIFは腫瘍に照射できる放射線量を制限する重要な要因の一つであり、患者の長期的な生活の質に悪影響を及ぼすことが懸念されている。RIFはコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質の過剰な蓄積を特徴とし、その後、瘢痕組織が形成され、最終的に致命的な呼吸不全につながるため、深刻な合併症の一つと考えられている。従って、RIFの根底にある遺伝子発現メカニズムを明らかにし、線維化の発生と進行を予防および軽減するための適切な処置法を見つけることは大変重要である。しかし、RIFプロセスを促進する遺伝子発現メカニズムおよび細胞内シグナル伝達経路に関して、まだ十分に解明されていない。

コラーゲンは細胞外マトリックスの主要な構成成分の一つであり、生体内の組織の形態や機能に重要な役割を持つ。これまでに28種類のコラーゲン分子と45種類のコラーゲン遺伝子が発見されており、それらはプロコラーゲン分子をコードする。I型コラーゲンは細胞外マトリックスの主要な因子である線維性コラーゲンである。V型コラーゲンは量的に少ないマイナーな線維性コラーゲンであるが、生体内のI型コラーゲンが発現する広大な組織で共発現している。さらに、V型コラーゲンはI型コラーゲンの発現が豊富な線維の中に取り込まれて、コラーゲン線維の直径を制御する重要な機能を持つと考えられている。

線維化プロセスにおいて、サイトカイン TGF- β が線維芽細胞の増殖の促進やコラーゲン産生の誘導等、病理学的プロセスにおいて重要な役割を示し、様々な臓器線維症の重要な促進因子として機能する。以前、我々は放射線照射によりI型コラーゲンの発現が増加し、この発現増加にTGF- β /Smadシグナル伝達経路が関わることを報告した。しかし、コラーゲン線維の大きさを制御するV型コラーゲンへの放射線の影響に関しては十分に解明されていない。さらに、TGF- β の応答因子であるCTGF(Connective Tissue Growth Factor)についてもRIFプロセスにおけるその作用はまだ報告が少ない。

近年、DNAからの転写産物のうちタンパク質の情報をコードしないncRNA(non-coding RNA: 非コードRNA)である約20塩基対の短鎖RNA - miRNA(microRNA)が、標的とするmRNAに特異的に結合することで翻訳の抑制やmRNAの分解を起し、転写後の遺伝子発現を負に調整すると報告されている。臓器線維症においてもmiRNAの作用に関する研究がさかに行われ、様々なmiRNAが臓器線維症に関わる因子として報告されており、RIFプロセスに関わるコラーゲン遺伝子の転写後の発現調節においても各種miRNAが作用すると考えられる。

2. 研究の目的

RIFに関連する遺伝子発現調節機構に関してさらなる知見を得るために、本研究では、まずV型コラーゲンについて、放射線照射による転写レベル及び転写後レベルでの遺伝子発現調節を調べた。次に、TGF- β の応答因子であるCTGFについて、RIFプロセスにおけるその作用機序を調べた。

3. 研究の方法

(1) 放射線照射によるV型コラーゲンの転写レベル及び転写後レベルでの遺伝子発現調節

放射線照射したNIH-3T3細胞からRNAを抽出してcDNAを合成し、real-time PCRにより放射線によるV型コラーゲン遺伝子の発現変動を測定した。次にルシフェラーゼ・アッセイにより、Col5a1プロモータをルシフェラーゼ遺伝子の5'末端側に導入した場合のルシフェラーゼ活性を測定し、転写レベルでの放射線の影響を調べた。さらに、Col5a1 3'UTRをルシフェラーゼ遺伝子の3'末端側に導入した場合のルシフェラーゼ活性を測定し、転写後レベルでの放射線の影響を調べた。

(2) RIFプロセスにおけるCTGFの作用機序と機能解析

real-time PCRにより放射線によるCTGFの発現変動を測定した。さらに、放射線によるコラーゲンの発現増加に与えるCTGFの機能について調べるために、CTGFをknockdownした場合の放射線によるコラーゲンの発現変化をreal-time PCR及びELISAにて測定した。次にルシフェラーゼ・アッセイにより、CTGFプロモータをルシフェラーゼ遺伝子の5'末端側に導入した場合のルシフェラーゼ活性を測定し、転写レベルでの放射線の影響を調べた。さらに、CTGF 3'UTRをルシフェラーゼ遺伝子の3'末端側に導入した場合のルシフェラーゼ活性を測定し、転写後レベルでの放射線の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 放射線照射による V 型コラーゲンの転写レベル及び転写後レベルでの遺伝子発現調節

real-time PCR により NIH-3T3 細胞における V 型コラーゲンの発現を測定した結果, Col5a1 および Col5a2 の発現は放射線照射により増加した。一方, Col5a3 については, 放射線による発現変化はみられなかった。次にルシフェラーゼ・アッセイの結果, Col5a1 遺伝子の転写開始点から上流 231bp までの基本転写活性領域のルシフェラーゼ活性が放射線により増加した。これらの結果は, Col5a1 の発現が放射線により転写レベルで増加することを示している。

次に, ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Col5a1 の 3'UTR 領域を導入した場合のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果, Col5a1 3'UTR 活性は大きく減少した一方, 放射線照射により増加した。さらに, Col5a1 の転写活性と 3'UTR 活性の関係を調べるために, Col5a1 の転写領域と 3'UTR の両方を導入した場合のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果, 全体的にルシフェラーゼ活性が低下したが, 放射線照射による増加は大きくなった。これらの結果は, 放射線による Col5a1 の発現変化について, 転写活性の変化と併せて 3'UTR 活性も放射線により影響をうけることを示している。

以前, 我々は I 型コラーゲンの 3'UTR 領域において miR-29 が特異的に結合し, miR-29 が I 型コラーゲンの発現を負に制御することを報告した。従って, 本実験でも V 型コラーゲンに対する miR-29 による負の発現調整について調べた。Col5a1 の 3'UTR 領域で miR-29 が結合する 3ヶ所の配列に変異を加えた変異型のコンストラクトを用いて, ルシフェラーゼ・アッセイを行った。その結果, 変異を加えていない野生型に比べて変異型でのルシフェラーゼ活性の値は全体的に高く, 野生型及び変異型共に放射線により増加した。次に, NIH-3T3 細胞に miR-29 mimic をトランスフェクションして miR-29 の発現を増加させた場合, Col5a1 の発現量は, 大きく減少した一方, miR-29 inhibitor により miR-29 の発現を阻害させると Col5a1 の発現量は増加した。

以上の結果より, 放射線照射したマウス線維芽細胞において, 転写レベルおよび miR-29 を介した転写後の発現調整のレベルで, Col5a1 の発現が増加することが分かった。さらに, 放射線による線維化形成において miR-29 が抗線維化因子として重要な役割を担うことが分かり, これらの結果は, RIF における治療ターゲットとしての miR-29 の潜在的な可能性を示している。

(2) RIF プロセスにおける CTGF の作用機序と機能解析

放射線照射した NIH-3T3 細胞について, CTGF の発現の変化を real-time PCR, western blot にて, プロモータ活性の変化をルシフェラーゼ・アッセイにて測定した。その結果, mRNA 発現レベル及びタンパク発現レベル共に放射線により CTGF の発現が増加したが, TGF- β /Smad3 シグナル経路を阻害すると, この発現増加は抑制された。また, CTGF の転写活性についても放射線により増加した一方, Smad3 との結合領域に変異を加えると放射線による増加が抑制された。次に, CTGF の発現を knockdown した場合のコラーゲンの発現を測定した結果, 放射線によるコラーゲンの発現増加が緩和された。また, ルシフェラーゼ・アッセイにより, CTGF の 3'UTR の活性, そして同領域における miRNA との結合が考えられる配列に変異を加えた場合の 3'UTR の活性を調べた。その結果, CTGF 遺伝子の 3'UTR 活性は, 放射線により増加したが, miR-26 結合部位に変異を加えると, この増加が抑制された。さらに, miR-26 mimic により miR-26 の発現を増加させた場合, CTGF の発現に加えて放射線によるコラーゲンの発現増加が緩和された。

以上の結果より, マウス線維芽細胞において, 放射線により CTGF の発現が増加し, この発現増加は TGF- β /Smad3 シグナル経路を介することが分かった。さらに, miR-26 が転写後の CTGF の発現調節に関与し, 放射線照射によるコラーゲンの発現増加を緩和させることが分かり, miR-26 についても RIF における治療ターゲットとして潜在的な可能性を示していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yano Hiroyuki, Hamanaka Ryoji, Zhang Juan Juan, Yano Mami, Hida Mariko, Matsuo Noritaka, Yoshioka Hidekatsu	4. 巻 60
2. 論文標題 MicroRNA-26 regulates the expression of CTGF after exposure to ionizing radiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiation and Environmental Biophysics	6. 最初と最後の頁 411 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00411-021-00915-9	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 矢野博之 濱中良志 樋田真理子 松尾哲孝 吉岡秀克	4. 巻 52
2. 論文標題 放射線誘発線維症における非コードRNAの関与	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 512-514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Hiroyuki YANO, Mami YANO, Hidekatsu YOSHIOKA	4. 巻 13
2. 論文標題 Regulation of the pro-1(V) collagen gene (Col5a1) following ionizing radiation at the transcriptional and post-transcriptional levels.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Junshin Gakuen University, Faculty of Health Sciences	6. 最初と最後の頁 83-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢野 博之, 濱中 良志, 矢野 真美, 樋田 真理子, 松尾 哲孝, 吉岡 秀克
2. 発表標題 放射線によるI型コラーゲン発現増加におけるlncRNA-Xの役割
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 長鎖非コードRNAの放射線誘発線維症における機能解析.
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、甲斐浩一、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 骨芽細胞分化における長鎖非コード(lnc)RNAの発現.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野 博之
2. 発表標題 放射線誘発線維症における長鎖非コードRNAの関与
3. 学会等名 日本結合組織学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野 博之
2. 発表標題 骨芽細胞における長鎖非コード(lnc)RNAの発現
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野 博之
2. 発表標題 線維芽細胞における放射線による長鎖非コードRNAの発現解析
3. 学会等名 日本結合組織学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野 博之
2. 発表標題 放射線誘起線維症に関わる長鎖非コードRNAの発現解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------