

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17679

研究課題名（和文）LncRNAの機序を解明し、マクロライド薬のCOPDに対する治療法の確立を目指す

研究課題名（英文）Elucidate the mechanism of LncRNA and aim to establish a treatment method for COPD of macrolides

研究代表者

井尻 尚樹（IJIRI, NAOKI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：10567788

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）：COPDの本態である慢性気道炎症を制御する治療法は確立されておらず、またその原因も不明である。そこで原因としてLong non coding RNAであるNEAT1に注目し、気道上皮細胞を用いたタバコ煙抽出液を添加し測定したところNEAT1は上昇し同時に炎症性サイトカインであるIL-6、8も上昇した。NEAT1を不活化したところIL-6、8はともに上昇せず、NEAT1の関連が示唆された。またマクロライドに関してはクラリスロマイシン、アジスロマイシンを用いたが、前者のみ抗酸化作用に影響を与える転写因子であるNrf2を上昇させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性炎症性疾患であるCOPDにおいては、抗酸化作用を示すNrf2の低下や、非COPDと比較して炎症性サイトカインが上昇していることも報告されている。しかしそれらの機序は現時点でも不明である。そこで本研究では、炎症の惹起あるいは抑制といった作用があることが徐々に解明されつつあるLong non coding RNAの中でもNEAT1に注目し、COPDへの関与を示すことにより、今後のCOPD治療に対する新たな治療戦略に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：Therapies to control chronic airway inflammation, which is the main cause of COPD, have not been established, and the cause of inflammation is unknown. Therefore, we focused on NEAT1, which is a long non-coding RNA, and measured it by adding tobacco smoke extract using bronchial epithelial cells. As a result, NEAT1 increased and at the same time, inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 also increased. When NEAT1 was inactivated, neither IL-6 nor IL-8 increased, suggesting a relationship with NEAT1. For macrolides, clarithromycin and azithromycin were used, but only the former increased Nrf2, which is a transcription factor that affects antioxidant activity.

研究分野：COPD

キーワード：COPD NEAT1 LncRNA macrolides

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性疾患である COPD は持続性の気流閉塞を特徴とする進行性疾患である。また COPD による死亡は増加の一途を辿っており、世界の死因の 4 番目に位置する疾患である。COPD の主なりスクファクターはタバコ煙であり、これにより肺内の炎症性サイトカイン (IL-6、IL-8、TNF- α など) の発現を誘導し気腫化が促進される。しかし近年、タバコ刺激に対して Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) による抗酸化作用が働くこと、及び COPD 患者ではそもそも Nrf2 の発現量が少ないことが報告され、また COPD の機序に対して PIP3/Akt pathway の酸化作用への関与も併せて報告されてきており、近年特に COPD の病態に対する酸化・抗酸化作用に対して注目が集まりつつある。またマクロライド系抗生物質の作用機序に関しても、臨床の場では慢性気管支炎症状に対して気道クリアランスの改善を目指し低用量で使用されているが、最新の日本の COPD ガイドラインのみならず、WHO を含む世界の COPD の専門家が作成する Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) のガイドラインにおいても、マクロライド系薬剤が COPD の急性増悪を抑制するという臨床的効果が記述されており、さらにステロイドに対する感受性を促進するという記述もある。エビデンスの基となるのは臨床的疫学研究及び基礎研究であるが、基礎研究においては主に細胞株に対して抗酸化作用を示すという報告があるぐらいで、いずれの報告においてもその機序は十分には解明されていない。即ち、現時点では COPD の治療法としては β_2 刺激薬や抗コリン薬などの気管支拡張剤による対症療法や急性増悪抑制を期待しての低用量マクロライド薬に留まり、COPD に対し特異的に炎症を抑制するという COPD の分子基盤に対する根本的な治療は存在していない。

次に、近年、蛋白質をコードしない non-coding RNA が世界的に注目され、この中でも 200 ヌクレオチド以上の Long non-coding RNA (LncRNA) は多数の生物学的・病理学的プロセスに関わる遺伝子発現を制御することが報告されているが、特定の LncRNA と COPD との関連についての報告はない。そこで、COPD 患者、非 COPD の喫煙者、非喫煙者の肺線維芽細胞を用いて、タバコ煙抽出液 (Cigarette smoke extract: CSE) での刺激による LncRNA array を行い、特定の LncRNA を同定した。特に NEAT1 (2 isoform: NEAT1-1, NEAT1-2) が COPD 患者の肺線維芽細胞で増加していること、また非喫煙者から採取した線維芽細胞に CSE を添加することでも上昇することを明らかにし、NEAT1 に対する siRNA を用いることにより、増加した NEAT1 が IL-8 の発現を促す可能性があることを明らかにした

2. 研究の目的

本研究では、タバコ煙に直接曝露される細胞である気道上皮細胞を用いて、慢性気道炎症を特徴とする COPD の病態を抗酸化作用が期待されるマクロライド薬の効果を確認するとともに、LncRNAs の作用機序の解明といった新しい観点から検討を行い、疾患の自然経過を改善させる薬剤が未開発である COPD に対する新規治療戦略の開発へと展開するための研究基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

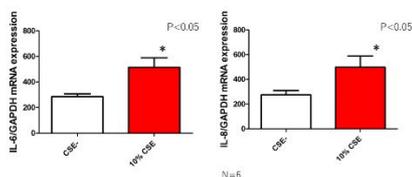
本研究では、タバコ煙に直接曝露される細胞である気道上皮細胞の細胞株である BEAS-2B を用いた。またタバコ煙抽出液 (CSE) の作成に関しては、培地である BEBM にタバコの煙をくぐらせることにより作成し、濃度に関しては吸光度 OD(320nm)において 0.65 を CSE100%と

して調整した。なお、使用した CSE はすべて上記により調整した 10%である。BEAS-2B に 10% CSE で刺激した群と刺激していない群を用い、細胞から RNA 及びタンパク質を抽出し各種実験に用いた。実験中に測定した IL-6、IL-8 はそれぞれ RT-PCR 及び ELISA で測定し、また LncRNA である NEAT1 に関しては、RT-PCR で発現量を測定した。なお、ハウスキーピング遺伝子は GAPDH を用いた。また NEAT1 の経路を確認する目的として、siRNA を用い NEAT1 を不活化し炎症性サイトカインの反応を確認した。そして、慢性気道炎症を特徴とする COPD の病態を抗酸化作用が期待されるマクロライド薬を通じて、抗酸化プロセスを担う Nrf2 の作用機序の解明を行った。

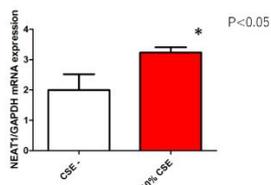
4. 研究成果

気道上皮細胞を用い、CSE で曝露/非曝露の群に分類し、各種発現量を確認したところ、IL-6, 8 は CSE による上昇を RT-PCR 及び ELISA で確認するとともに、NEAT1 の発現量上昇も確認した。そこで NEAT1 を siRNA で不活化したところ、CSE で刺激後であっても IL-6, 8 の発現量の上昇は認めなかった（下記図を参照）。上記から CSE による炎症惹起の経路において NEAT1 が関与していることが示唆された。またマクロライドにおいてはアジスロマイシン、クラリスロマイシンを添加した後に CSE を曝露したところ、クラリスロマイシンを添加した群において、非前処置の群と比較し Nrf2 の mRNA 及びタンパク質の発現量が増加していたことから、クラリスロマイシンは抗酸化作用の経路に関与していることが示唆された（下記参照）。

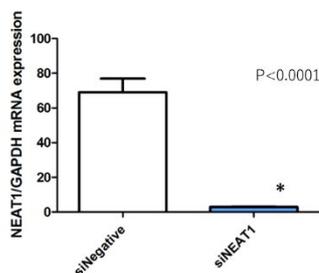
CSEは、IL-6及びIL-8 mRNA 発現を促進した



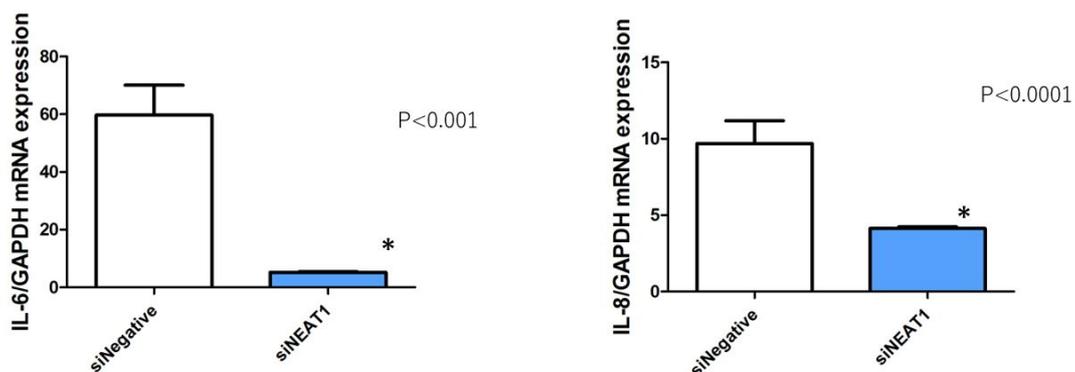
CSEはNEAT1 RNAの発現を促進した。



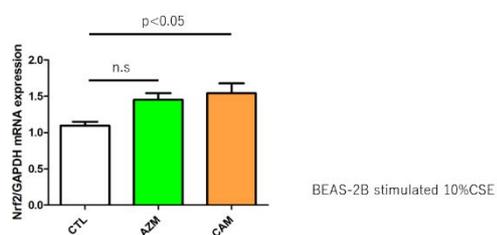
BEAS-2BにsiNEAT1を導入し、発現抑制できていることを確認した。



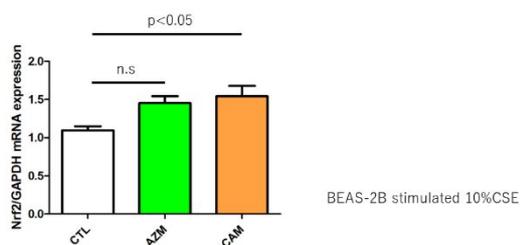
NEAT1が不活化されるとIL-6,IL-8はCSE刺激にも関わらず有意に上昇しなかった



CSE刺激時、クラリスロマイシンを前処置するとNrf2のmRNAは上昇した。



CSE刺激時、クラリスロマイシンを前処置するとNrf2のmRNAは上昇した。



上記から NEAT1 は CSE 刺激時において炎症性サイトカインを惹起させる経路に関与していること、またマクロライド類の 1 つであるクラリスロマイシンは抗酸化作用に関与している可能性について示唆された。

これらの結果により、炎症性疾患である COPD の炎症惹起の経路の解明に寄与しうると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井尻尚樹、浅井一久、佐藤佳奈子、山田一宏、山本典雄、渡辺徹也、金澤博、平田一人、川口知哉
2. 発表標題 CSE刺激時にLong non coding RNA : NEAT1は炎症性サイトカインの放出を促す
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井尻尚樹
2. 発表標題 CSE刺激時にLong non coding RNA : NEAT1は炎症性サイトカインの放出を促す
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020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
---------	---------