

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32653
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592182
 研究課題名（和文）鼻副鼻腔線維芽細胞に特徴的に発現するマイクロ RNA の同定とその役割の
 解明
 研究課題名（英文）Investigation of microRNA expression by nasal and paranasal fibroblasts
 研究代表者
 野中 学（NONAKA MANABU）
 東京女子医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：70271351

研究成果の概要（和文）：健常な鼻粘膜と健常な肺線維芽細胞から線維芽細胞を単離し、種々のサイトカインで刺激し、誘導される microRNA を検討した。また鼻茸（鼻副鼻腔粘膜の慢性炎症）と肺線維症の肺線維芽細胞も同時に刺激し誘導される microRNA の発現、鼻のそれとの違いを検討した。TGF-β で刺激すると肺線維芽細胞で miR-146a が誘導され、鼻では誘導されていない。IL-13 や IL-4、TNF-α で鼻線維芽細胞を刺激すると TSLP が産生され、さらに miR-375 が誘導されている。

研究成果の概要（英文）：Primary fibroblast lines were established from human nasal and lung tissues. We looked at the expression of microRNA induced by cutokines. miR-146a was induced by TGF-β in lung fibroblast lines, but not in nasal fibroblast lines. IL-4/IL-13 and TNF-α induced the production of TSLP as well as miR-375 in nasal fibroblasts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻副鼻腔, microRNA, 線維芽細胞, 呼吸器

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞は、皮膚、粘膜など人の各臓器の間質に、支持細胞として存在している。以前より、慢性炎症に伴う線維化の過程に細胞外基質（コラーゲンなど）産生や MMP、TIMP の産生制御により重要な働きをしていることはよく知られている。近年、線維芽細胞は

サイトカインやケモカインを産生することが解り、上皮細胞と同様に炎症反応に深く関わっていることが解っている。たとえば、RANTES、eotaxin、MCP-4 産生を通しての好酸球遊走、TARC 産生による Th2 細胞の遊走、MIP-3α 産生や TSLP 産生による樹状細胞遊走

と活性化に関与していると考えられつつある。さらに、血管透過性因子である VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) を産生し浮腫形成にも関与している可能性がある。実際、我々耳鼻咽喉科医が治療にあたる上気道の慢性炎症である、慢性副鼻腔炎やアレルギー性鼻炎においては、好酸球や Th2 細胞の浸潤、樹状細胞の浸潤及び活性化、浮腫形成が頻繁に認められる。

また線維芽細胞は人の部位により性質が顕著に異なっている。このことは、同じ線維芽細胞でも、炎症の起こった部位により線維芽細胞の炎症における役割が異なっていることを意味している。たとえば気道において、鼻副鼻腔線維芽細胞と肺線維芽細胞を比較すると次のような違いが存在する。鼻副鼻腔線維芽細胞は、LPS をはじめとする病原微生物由来物質(toll-like receptor ligands)に toll-like receptors (TLRs) を介して刺激され、種々のサイトカインを産生し自然免疫に携わっている。たとえば LPS の刺激にアレルギー性炎症で重要な IL-4 の刺激が加わると eotaxin, MCP-4 の相乗的産生と TARC 産生を誘導し、好酸球性炎症へと誘導する。一方肺線維芽細胞は LPS に対する反応性はなく、IL-4 とともに刺激してもそれらケモカインの相乗的産生はみられない。また線維化の過程に重要な働きをする TGF- β 刺激により、肺線維芽細胞は細胞の分化が誘導され、筋線維芽細胞へ変換し、I 型コラーゲンを産生する。一方、鼻副鼻腔線維芽細胞は、筋線維芽細胞への分化がおこりにくく、I 型コラーゲンを産生しにくい。このような違いから鼻副鼻腔粘膜は、外界との門戸として線維芽細胞も動員して外来からの病原菌やウイルスから防御していると考えられる。また TGF- β 刺激により組織を線維化に誘導するのに重要な筋線維芽細胞に変換されないことが、炎

症を何度おこしても、一生を通じて線維化病変が鼻副鼻腔にきわめて少ないことを示している可能性がある。このように線維芽細胞は、鼻副鼻腔において健常な状態においても特殊性があり、鼻副鼻腔に特徴的な病変の病態形成に大変重要と考えられる。それではなぜこのような違いが存在するのであろう。

1958 年に提唱された分子生物学の中心原理では、一つの遺伝子から一つの mRNA が転写され、一つのたんぱく質ができるというものであった。しかし近年の non-coding RNA (ncRNA) (small interfering RNA や microRNA などからなる) の発見により、ゲノムの領域を大きな遺伝子領域が覆い一つの遺伝子から多数の RNA が転写され、その RNA のうち約半分は ncRNA として RNA 大陸を形成していることが明らかになった。これらの ncRNA は機能性 RNA として遺伝子に働き、種々の細胞の分化や増殖、サイトカイン・ケモカイン産生を始めとする自然免疫や獲得免疫応答を制御していると考えられている。

microRNA-181a や microRNA-150 はリンパ球の分化において重要な働きをはたすと考えられ、その制御が結果的に獲得免疫の制御に繋がる。また microRNA-155 は microRNA-146 と microRNA-132 とともにマクロファージの TLRs を介した自然免疫応答制御に働くと考えられている。またヒトの遺伝子は約 2.2 万個で、ショウジョウバエのそれは 2 万個で遺伝子の数はほとんど変わらない。生物種が高等な場合の複雑さの違いを示す microRNA の違いを示す要素の一つに microRNA の働きが考えられている。しかしこれらの検討はまだ始まったばかりで、動物由来の細胞での検討が圧倒的で、ひとから直接分離した培養細胞の検討は非常に少ない。

2. 研究の目的

(1) 今回のひと線維芽細胞（主に気道）を用いて次のことを明らかにしたい。健常な鼻副鼻腔粘膜と健常な肺線維芽細胞から線維芽細胞を単離し、microRNA のアレイにて microRNA の発現の違いを検討し、鼻副鼻腔粘膜線維芽細胞に特徴的な microRNA を同定する。同時に鼻茸（鼻副鼻腔粘膜の慢性炎症）の線維芽細胞と肺線維症の肺線維芽細胞を比較検討する。

(2) 健常な鼻粘膜と健常な肺線維芽細胞から線維芽細胞を単離し、種々の TLR ligand で刺激し誘導される microRNA を検討する。また鼻茸（鼻副鼻腔粘膜の慢性炎症）と肺線維症の肺線維芽細胞も同時に刺激し誘導される microRNA の発現、鼻のそれとの違いを検討する。TLR ligand 以外にも TNF- α , IL-1 β , Th1 サイトカイン (IFN- γ など), Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13 など) の刺激を行い同様な検討を行う。1) で同定された鼻副鼻腔線維芽細胞に特徴的 microRNA がどの刺激で発現が制御されるか確認することができる。また線維芽細胞の分化やサイトカイン・ケモカイン産生との関係も検討する。

(3) (1) で同定された鼻副鼻腔に特徴的な microRNA の precursory molecule を線維芽細胞に導入し、その microRNA を過剰発現させ、その結果鼻副鼻腔の分化やサイトカイン・ケモカイン産生がどのように変化するか検討する。

(4) 10 歳以下の健常な鼻副鼻腔粘膜と鼻茸（鼻粘膜の慢性炎症）から線維芽細胞を単離し、40 歳以上の健常な鼻副鼻腔粘膜と鼻茸（鼻粘膜の慢性炎症）から線維芽細胞を単離し、年齢による microRNA 発現の違いがないかアレイを用い検討する。

鼻副鼻腔と肺におけるヒト線維芽細胞の microRNA 発現解析より、鼻副鼻腔線維芽細胞

に特徴的 microRNA が同定可能である。またその特徴的 microRNA がどの刺激に対し変化するかを解明することができる。さらに同定された鼻副鼻腔線維芽細胞に特徴的 microRNA の precursory molecule を導入することにより、その microRNA が実際にタンパク産生をどのように制御しているかが明らかになる。鼻副鼻腔線維芽細胞に特徴的に発現する microRNA の同定と役割を明らかにすることにより、ヒトのような高等動物の上気道に特徴的疾患（慢性副鼻腔炎など）に特有な病態形成の解明さらには治療法の開発につながると思われる。

3. 研究の方法

鼻副鼻腔線維芽細胞は、健常なものは第一基板から篩骨胞上の粘膜を眼窩吹く抜け骨折や孤立性蝶形洞病変の手術時に採取した粘膜から単離する。健常な肺線維芽細胞は、肺癌患者が肺葉切除を受ける時に健常肺組織より単離する。それぞれの検体で microRNA array を行い、鼻副鼻腔線維芽細胞に特徴的 microRNA を同定する。できれば慢性副鼻腔炎に伴う鼻茸（慢性炎症性疾患）と肺線維症に発生した肺癌患者が肺葉切除を受ける時に肺線維症部分の肺組織より線維芽細胞を単離し、それぞれ健常なものと microRNA の発現の違いと検討する。各線維芽細胞をサイトカインで刺激し、誘導される microRNA を同定する。

4. 研究成果

TGF- β で刺激すると肺線維芽細胞で miR-146a が誘導され、鼻では誘導されていない。IL-13 や IL-4、TNF- α で鼻線維芽細胞を刺激すると TSLP が産生され、さらに miR-375 が誘導されている。今後は、miR-146a や miR-375 の precursory molecule を導入する

ことにより、その microRNA が実際にタンパク質産生をどのように制御しているかを明らかにしたい。

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 2 件)

① Nonaka M, Fukumoto A, Ogihara N, Sakanushi A, Pawankar R, Yagi, T. Synergistic Induction of Thymic Stromal Lymphopoietin by TNF- α and Th2 Cytokine in Nasal Polyp Fibroblasts. Am J Rhinol and Allergy. 24:14-18, 2010.

② Nonaka M, Ogihara N, Fukumoto A, Sakanushi A, Kusama K, Pawankar, R, Yagi T. Combined Stimulation with Poly (I:C), TNF- α and Th2 Cytokines Induces TARC Production by Human Fibroblasts from the Nose, Bronchiole and Lung. Int Arch Allergy Immunol. 152:327-341, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 学 (NONAKA MANABU)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70271351