

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461463

研究課題名(和文) AU-rich element 依存性mRNA制御と関節リウマチ滑膜細胞機能変換

研究課題名(英文) AU-rich element dependent mRNA regulation in functional change of rheumatoid arthritis synoviocyte

研究代表者

山崎 聡士 (Satoshi, Yamasaki)

久留米大学・その他部局等・講師

研究者番号：30367388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗サイトカイン抗体治療は、治療標的としてのサイトカインの重要性を決定的にした。本研究では、mRNAの3'非翻訳領域に存在するAU rich elementを介してmRNAの代謝を調節するサイトカインを、レポータープラスミドを用いてスクリーニングした。IL-1 がCXCL2 mRNAの3'UTRを有するレポーター活性を亢進させた。IL-1 は滑膜細胞におけるCXCL2の mRNAとタンパク質発現亢進をもたらすが、これはCXCL2 mRNAがIL-1 によって安定化されるためと判明し、この作用にRNA結合蛋白TTPの関与が判明した。炎症性サイトカインによるケモカインmRNA安定化が証明された。

研究成果の概要(英文)：Anti-cytokine antibody therapy has proven the importance of cytokines as therapeutic targets. In this study, cytokines that regulate the metabolism of mRNA via AU rich element present in the 3' untranslated region of mRNA were screened by using a reporter plasmid. IL-1 enhanced the luciferase activity of the reporter having the 3' UTR of CXCL2 mRNA. IL-1 leads to enhanced mRNA and protein expression of CXCL2 in synovial cells, which proved that CXCL2 mRNA is stabilized by IL-1. Co-transfection of TTP with the reporter plasmid suppressed the luciferase activity with the 3' UTR of CXCL2 mRNA. It became clear that cytokine contributes to induction of an inflammatory gene by stabilizing the mRNA in addition to transcriptional up-regulation of the gene.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：mRNA制御 3'UTR AU-rich element サイトカイン 関節リウマチ 滑膜細胞 発現制御

1. 研究開始当初の背景

サイトカインは細胞から放出され、標的細胞の増殖、分化、アポトーシスを制御する。関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)に対するサイトカイン中和治療の劇的な臨床効果は、同疾患におけるサイトカインの重要性を決定的なものとした。

サイトカインは標的細胞の分子発現制御を介してその作用を発揮する。近年転写後の mRNA の制御が、転写そのものの制御と同様に遺伝子発現の重要なステップであることが分かってきた。一連の mRNA 制御は、転写により合成された mRNA を分解し、転写の効果をキャンセルできる点で重要であり、病的意義も少なくないと思われ。

mRNA の発現制御には、その非翻訳領域(untranslated region: UTR) が重要である。cap 構造を含む 5' UTR がリボソーム複合体の結合部であるのに対し、3'側の非翻訳領域(3' UTR) は mRNA の安定性および翻訳効率制御を司る cis-element であり、mRNA の安定性や翻訳効率のコントロールを司る RNA 結合蛋白や miRNA との結合配列を含む。

3' UTR に AUUUA リピートを特徴とする Adenylate-uridylate-rich element (AU-rich elements; ARE) を含む mRNA は、その約半数が RA と関連することが知られている遺伝子であると確認でき、特に RA 研究で常に鍵となる分子である TNF や IL-1 もみられ、ARE-mRNA と RA との関連が強く予想される。

ARE に対しては特定の ARE binding protein: ARE-BP が結合し、標的 mRNA の制御、特に崩壊を促進することが知られている。T 細胞内抗原-1 (TIA1)、TIA1 関連タンパク質 (TIAR)、トリステトラプロリン (TTP) および HuR のような RNA 結合タンパク質は、ARE を保有する mRNA と関連し、それらの代謝を調節する。TIA1 および TIAR は、標的 mRNA の翻訳を阻害する。TTP は標的 mRNA 崩壊を加速し、HuR は標的 mRNA を安定化することが知られている。しかしながら、病態における RNA 結合タンパク質活性を調整する上流経路は不明であり、これらの経路を誘発する刺激のタイプも未知である。これらの ARE-BP の発現や制御に関する研究は行われているが、ヒト疾患との関連には不明な点も多い。

RA における ARE-mRNA の意義は確立しており、これを制御するメカニズムの解明は、新たな RA 病態生理の解明につながると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、サイトカインが滑膜細胞に引き起こす遺伝子発現変換のメカニズムを、mRNA 制御の観点から解明する。AU-rich element (ARE) という独特の非翻訳領域の構造を有する mRNA とその安定性を司る分

子メカニズムを、レポーターアッセイによるスクリーニング、mRNA の半減期測定を駆使して解析する。ARE を有する mRNA には関節リウマチ病態との関連を持つ分子も含まれ、サイトカインによる滑膜細胞の機能変換の新規機序の発見を目的とする。

3. 研究の方法

3つの実験により構成される。

Dual luciferase reporter assay を使用して、標的 mRNA に作用するサイトカインをスクリーニングする (Step 1)。同定されたサイトカインが標的 mRNA の半減期に与える影響を確認する (Step 2)。RNA 結合たんぱく質の作用を確認する (Step 3)。

スクリーニングには pmirGLO ベクターを使用した。これは Renilla Luciferase (hRLuc) と Fire Fly Luciferase (Luc2) がタンデムに転写され、hRLuc の mRNA の 3' UTR には poly A 配列のみが、Luc2 の 3' UTR には multi-cloning site を用いて任意の 3' UTR が付加できる。ARE-mRNA 31 個の mRNA のうち、23 個の 3' UTR を pmirGLO へのサブクローニングし、スクリーニングを行なった。

内在性 mRNA の半減期定量のためには、ActD 処理し細胞内転写を停止させ、その後内在の ARE-mRNA の半減期を測定した。

RNA 結合蛋白質 TIA1, TIAR, TTP, HuR による CXCL2 mRNA の 3' UTR に対する影響は Dual luciferase reporter assay との共発現により確認した。

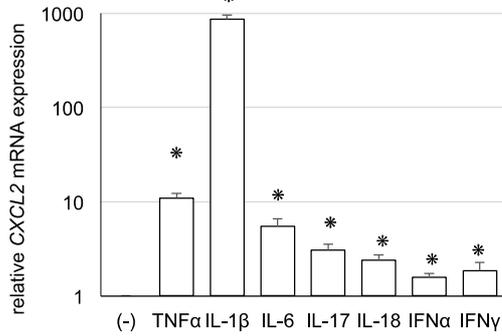
4. 研究成果

3' UTR に AU rich element と呼ばれる AUUUA の繰り返しを有する mRNA を標的 mRNA として選択し、Dual luciferase reporter system を用いたスクリーニングを行ったところ、サイトカインにより 3' UTR を介した制御を受ける可能性がある標的 mRNA が複数同定された。標的ルシフェラーゼの活性亢進を示した標的 mRNA は、3' UTR を介した mRNA の半減期延長、あるいは翻訳効率促進といういずれかの影響を受けることが想像される。IL-1、IL-17A による CXCL2 mRNA に対する促進効果は強力であると考えられた。

次に、関節リウマチの病態を形成する滑膜細胞に対するサイトカインの効果を確認してみたところ、複数の炎症性サイトカインが CXCL2 の mRNA 発現を誘導するが、IL-1 による CXCL2 mRNA 発現誘導は群を抜いて著しいことが判明した (図 1)。

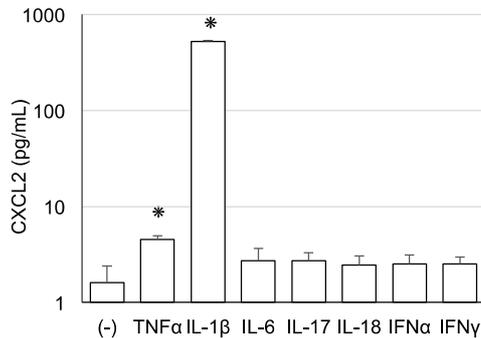
この特徴的な発現誘導のメカニズムとして、転写活性による制御のみでは説明が困難であると判断し、IL-1 による CXCL2 mRNA 発現誘導に、mRNA 代謝の関与があるかをさらに検討することとした。

図 1



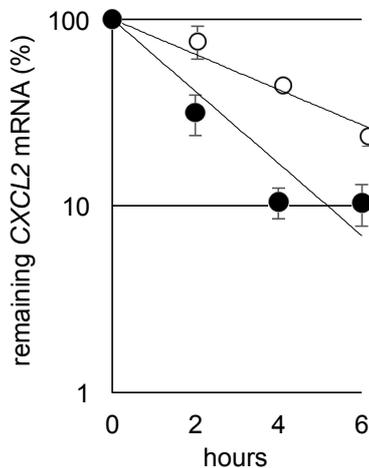
CXCL2 mRNA 発現の著しい誘導に一致して、IL-1 による CXCL2 分泌量も群を抜いて増加することが判明した(図 2)。この現象はサイトカインの作用としてよく知られている転写活性化に加えて、未知の mRNA 発現誘導メカニズムが機能していることを示唆するものであると考えた。

図 2



次にサイトカインが標的 mRNA の代謝に与える影響を確認した。RNA polymerase2 阻害剤である Actinomycin D (ActD) を使用して、あらたな転写を停止し、その後の培養滑膜細胞の CXCL2 mRNA 発現を経時的に測定した。ActD 添加前の CXCL2 mRNA は IL-1 により約 8 倍に上昇していた。この時点における CXCL2 mRNA 発現を 100%として、経時的に観察を行ったところ、IL-1 の刺激により、CXCL2 mRNA の半減期は延長していた(図 3)。

図 3 (白丸が IL-1)



さらに、複数例の症例から採取した滑膜細胞を用いて検討したところ、統計学的にも有意差を持って、IL-1 が CXCL2 mRNA の半減期を延長することが判明した。この結果は、IL-1 が CXCL2 mRNA に対して崩壊抑制効果を有していることを示す。

図 4

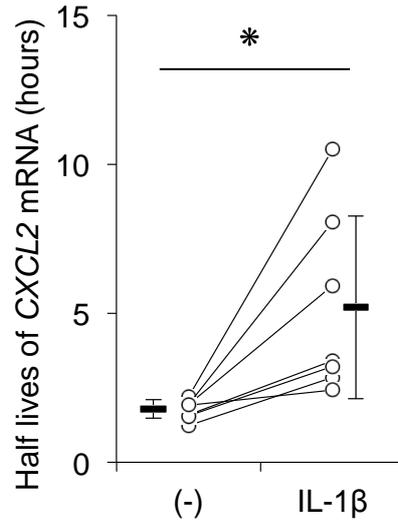
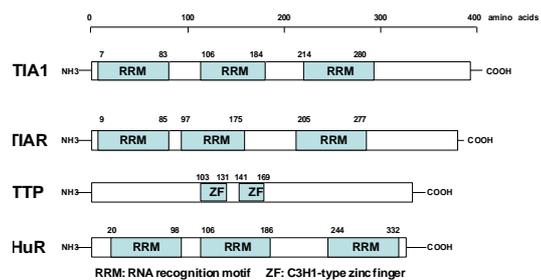


図 5 は代表的な AU rich element 結合蛋白 4 分子を示す。これらの分子は標的 mRNA に結合し、これらに対して RNA 安定性および翻訳効率の制御作用を發揮することで、遺伝子発現を制御することが知られている。基本的に HuR 以外は標的 mRNA の分解する抑制分子として知られている。

図 5



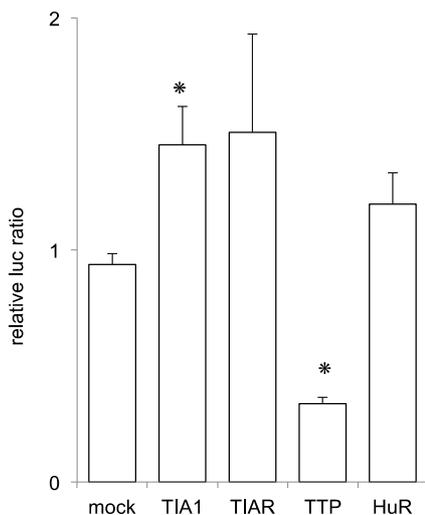
これらの分子をレポーターと共発現させて、再度ルシフェラーゼ活性を検討した。結果として、CXCL2 mRNA 3' UTR reporter 活性に対して、TTP は抑制的、TIA1 は促進的であった(図 5)。

TTP と HuR によるレポーター活性促進は予想通りであったが、TIA1, TIAR は、一般的には ARE を有する 3' UTR に対しては抑制的と考えられてきた分子であるため、共発現により、レポーター活性が亢進したのは、予想外の結果であった。

これらの検討から、サイトカインにより 3' UTR を介した mRNA 制御の可能性が複数示された。特に IL-1 の CXCL2 mRNA への促進的効果は強力で、この現象は IL-1 による CXCL2

mRNA の半減期延長が寄与していること、TIA1 や TTP といった既知の ARE 結合蛋白の関与が存在することが判明した。

図 5



結論として、サイトカインにより 3' UTR を介した mRNA 制御の可能性が示された。特に IL-1 により CXCL2 mRNA への促進的効果は強力で、この現象は IL-1 による CXCL2 mRNA の半減期延長が寄与していることが判明した。転写に加えて、第二の mRNA 発現亢進メカニズムの発見と言える。

CXCL2 は、様々な細胞種によって産生され、多形核白血球の走化性を促進する。したがって、CXCL2 mRNA の半減期延長は、関節リウマチ、血管炎、および自己炎症性疾患のようなヒト疾患において、好中球の増殖および活性化を導く可能性がある。

CXCL2 mRNA は、RNA 結合タンパク質による調節に非常に影響されやすい。これまでにも、CXCL2 mRNA 発現は、HuR などの ARE 結合タンパク質によって調節されることが報告されている。我々の知見も、IL-1 が RNA 結合タンパク質を介して CXCL2 mRNA を安定化することを示した。また、レポーターシステムでは、TIA1 の強制発現によって、CXCL2 mRNA の 3' UTR を含むルシフェラーゼの活性が増大させたが、逆に TTP これを減弱させた。したがって、CXCL2 mRNA を調節することができる少なくとも 3 つの RNA 結合タンパク質 (TTP、HuR および TIA1) が存在するという結論に至った。

TTP、HuR、または TIA1 は、異なる刺激で CXCL2 mRNA と会合すること予想される。当初 IL-1 が TTP、HuR、または TIA1 の発現を変化させることによって CXCL2 mRNA を安定化させると仮定したが、滑膜細胞において TTP、HuR および TIA1 の mRNA 発現が低すぎ、IL-1 による刺激後に顕著な変化を示さなかったため、その発現を大きく変化させないと考えられた。

他の経路として、IL-1 によって誘導されるシグナル伝達経路が翻訳後修飾を介して TTP および/または TIA1 活性に影響を及ぼすことが想像された。特に、IL-1 は、IL-1 受容体タイプ I に結合して、IL-1 受容体アクセサリタンパク質とのヘテロダイマー複合体を形成する。この複合体は、TAK1/ TAK1 結合タンパク/ NF- B または MAP kinase を介して炎症性遺伝子の転写を誘導する。このようなキナーゼシグナル伝達は、CXCL2 mRNA 関連タンパク質の調節に寄与し得ると考えられる。この理論は、MAPK シグナル伝達が CXCL2 mRNA 発現の TTP 依存性制御を調節することを示す最近の報告によっても支持される。

本研究では、mRNA 代謝のための細胞ベースのレポーターシステムを確立した。この包括的解析の中で、我々は、IL-1 以外のサイトカインが CXCL2 mRNA を調節することを示すいくつかの例も発見した。

このレポーターシステムにはいくつかの利点があると考えられる。第 1 に、多彩なヒト細胞用いて実験全体を行うことが可能である。すなわち、疾患に重要とされる細胞を用いて、病態と関係すると考えられるサイトカインなどの因子の作用を検討できる。また、このレポーターシステムに目的遺伝子の共発現を加えることによって、化学物質、環境刺激、および組換えタンパク質発現を適用することが可能となる。これらのアプリケーションは、ヒトの疾患および関連する治療の研究にも適していると思われる。

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 1 件)

山崎聡士、膠原病と慢性炎症 - サイトカイン mRNA による転写後制御、BIO Clinica , 査読なし、5 巻、2015、133-136.

[学会発表](計 3 件)

Satoshi Yamasaki, Yusuke Yoshida and Eiji Sugiyama : interleukin-1 Stabilize CXCL2mRNA and increase its Expression . 82th American College of Rheumatology , Walter E. Washington Convention Center , Washington, D.C. , USA , November 11-16, 2016 .

山崎聡士、吉田雄介、熊谷和彦、野島崇樹、杉山英二 : 3' -Untranslated Region Reporter System を用いた関節リウマチ関連遺伝子制御機序の解明 . 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016.4.21-23、横浜 .

吉田雄介、山崎聡士、熊谷和彦、野島崇樹、杉山英二 : IL-1 と IL-17A による AU-rich element を介した CXCL2 mRNA の制御 . 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016.4.21-23、横浜 .

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎聡士 (YAMASAKI Satoshi)

久留米大学・その他部局等・講師

研究者番号：30367388

(2) 研究分担者

杉山英二 (SUGIYAMA Eiji)

広島大学・病院(医)・教授

研究者番号：70179167