

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07078

研究課題名(和文)炎症性腸疾患モデルマウスにおけるmicroRNAの制御機構

研究課題名(英文)The mechanism of microRNA in inflammatory bowel disease model mouse

研究代表者

安藤 祐吾 (ANDO, YUGO)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50388427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)患者やIBDモデルマウスの腸管粘膜においてmiR-21が高発現していることが報告されているが、miR-21が腸炎の発症および慢性化にどのような役割を果たしているのか明らかにされていない。本研究ではIBDモデルマウスであるdominant negative TGF- Receptor IIマウスを用いて、miR-21が生体内でどのような役割を果たしているか検証した。IBDモデルマウスのmiR-21をノックアウトすることにより、腸炎の悪化が見られたことから、miR-21は生体内で炎症を抑制する方向に働いている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、難病である潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) の患者数は年々増加傾向にあります。しかもIBDは若年発症する患者が大多数を占めており、難治例では患者の人生設計に大きな影響を与える可能性があります。また、難治性症例では生物学的製剤などの高額な医療費が継続的に必要となり、医療経済的にも大きな負担となっています。現在、まだIBDの根本原因は同定されていないため、根治治療は確立されておらず、寛解維持が治療のゴールと考えられています。今回の我々が行なった基礎的な研究成果が、近い将来、疾患の原因究明や疾患活動性マーカー、新規薬剤の開発に寄与する可能性が考えらる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that miR-21 is highly expressed in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease (IBD) and IBD model mice. It has not been clarified the mechanism of miR-21 in the onset and chronicity of enteritis. In this study, we examined the role of miR-21 in vivo using dominant negative TGF- Receptor II mice, which is one of IBD model mice. Knockout of miR-21 exacerbated enteritis in the IBD model mice, suggesting that miR-21 may play a critical role to suppress the local inflammation of the colon.

研究分野：消化器内科

キーワード：miR-21 microRNA IBD UC CD

### 1. 研究開始当初の背景

IBD の原因については、遺伝的要因、環境的因子などが発症に関与することが報告されているものの、未だ原因は明らかにされていない(Nature.2007Jul26;448(7152):427-34.)。近年、DNAメチル化と共に遺伝子発現に影響するファクターとして miRNA による RNA サイレncing が注目されており、活動期 IBD 患者や IBD モデルマウスにおいて miR-21 が過剰発現していることが報告された(PLOS ONE 2013;8(6):e66814;J Autoimmun.2013Mar;41:111-9.;PLOS One.2013 Oct 1;8(10):e76217)。miRNA は細胞の発生、分化、増殖、がん化およびアポトーシスなど細胞機能の根幹に関わっていることが知られており(Nature Reviews Molecular Cell Biology.2013;14:475-488)、活動期 IBD や IBD モデルマウスで高発現している miR-21 は、腸管へ浸潤している炎症細胞の分化や増殖、アポトーシスに何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。miR-21 の標的遺伝子である Programmed cell death 4 (PDCD4)は、アポトーシス誘導、細胞増殖抑制、JNK シグナル伝達系の抑制、AP-1, NF- $\kappa$ B などの転写因子の転写活性抑制に関与しており、炎症反応に抑制的に作用することが報告されている(Gut 2016;65:1470-1481)。また、AP-1 は miR-21 発現抑制的に作用することから、miR-21 は PDCD4 および AP-1 による double-negative feedback (図を参照)により制御されている可能性がある(J Biol Chem.2013Dec;288(52):37082-37093.)。これらの報告により、miR-21 が IBD において炎症促進に作用していることが示唆されるが、未だ生体内での miR-21 の働きについて明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

炎症性腸疾患(IBD)は右肩上がりに増えているが、その原因については、遺伝的要因、免疫学的要因、環境的因子などが発症に関与することが報告されているものの、多くは不明のままである。アミノサリチル酸製剤やステロイド、生物学的製剤、免疫抑制剤、ヤヌスキナーゼ(JAK)阻害剤など複数の治療薬が応用、開発されているが、不応例や不耐例もあり、詳細な原因解明は急務と考えられる。近年、DNAメチル化と共に遺伝子発現に影響するファクターとして microRNA による RNA サイレncing が注目されており、活動期 IBD 患者や IBD モデルマウスの腸管粘膜から分離した T リンパ球において miR-21 が過剰発現することが報告された。miR-21 はアポトーシス、細胞増殖、AP-1, NF- $\kappa$ B などの転写因子活性、癌化に促進的に作用すると報告されているが、炎症の結果として上昇しているだけとの報告もあり、miR-21 の詳細な作用は解明されていない。本研究では、IBD モデルマウスである dominant negative TGF- $\beta$  receptor (dnTGF- $\beta$  R )マウスと miR-21 ノックアウト(KO)マウスを交配し、腸炎や全身の炎症の程度に差があるかを解明し、miR-21 の IBD における役割を解析することで IBD の原因解明を目指す。

### 3. 研究の方法

dnTGF- $\beta$  R マウスにおける miR-21 の働き

dnTGF- $\beta$  RII マウス (B6.Cg-Tg(Cd4-TGFBR2)16F1v/J) および miR-21-/- マウス (B6;129S6-Mir21atm1Yoli/J)は、The Jackson Laboratory から購入し、関西医科大学動物センターにて SPF 環境下で飼育する。miR-21-/-dnTGF- $\beta$  RII マウスは、雄の dnTGF- $\beta$  RII マウスを雌の miR-21-/-マウスと交配させて作成する (Hepatology. 2012 Oct;56(4):1418-26.)。

各マウスは、24 週齢で屠殺し、血清、各臓器(心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、甲状腺、腸管、骨髄)を採取し、各種 assay へ用いる。採取した組織の一部で組織標本(H&E 染色)を作成し、炎症細胞浸潤の程度をスコア化する。

次にマウスから採取した脾臓と腸間膜リンパ節は、比重遠心法(Histopaque-1077 を使用)を用いて単核細胞を分離し、細胞表面マーカーCD4、CD8a、NK1.1 および TCR- $\beta$  などの蛍光色素抗体で染色する。さらに、T 細胞活性化を評価するため、CD44、CD62L および CD69 の抗体を表面マーカーとして使用し、CD44+ CD62L-細胞および CD69+細胞は、エフェクターおよび活性化 T 細胞とする。また、CD4+T 細胞と CD8+T 細胞によるサイトカイン産生能を調べる為に、炎症性サイトカイン(IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17)を intracellular staining(BD Cytotfix/Cytoperm™ Method)により評価する。

CD4+/CD8 + T 細胞は、比重遠心法で回収された単核細胞を用いて、anti-CD4 microbeads、もしくは anti-CD8a microbeads を加えて標識した後、磁気カラムによる positive selection によ

り CD4+/CD8 + T 細胞を回収する。

腸管粘膜内の単核細胞の回収方法は、コラゲナーゼ V を用いて腸管組織を消化分解することにより単核細胞を分離回収し、以降は脾細胞と同様の処理を行う(J Autoimmun. 2013 Mar;41:111-9.)。腸管組織内の各種サイトカイン(IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-2, and IFN- $\gamma$ ) 測定は、大腸粘膜をホモジナイズし、BD™ CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit を用いて測定する。

炎症と miR-21 の関連性については、各臓器および CD4+/CD8 + T 細胞から抽出した total RNA を用いて、miR-21 発現量および各種サイトカイン(IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-2, and IFN- $\gamma$ ) の mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて定量し解析する。次に、miR-21 の標的遺伝子である PDCD4 は、単離した細胞および腸管組織よりタンパク質および total RNA を抽出し、RT-PCR 法および Western blotting 法を用いて PDCD4 の mRNA 発現量およびタンパク質量を測定する(J Autoimmun. 2013 Mar;41:111-9., EMBO Mol Med. 2011 Oct;3:605-15.)。また、miR-21 が細胞増殖やアポトーシスに及ぼす影響について、CFSE Cell Proliferation assay および Annexin V binding assay により検証する。

マウスの全身状態および生存率を評価するために、体重、生存率、各臓器の病理組織、腸管長、腸管重量を測定し、全身および腸管局所の炎症の程度を客観的に評価する。

血清は採取後、直ちに液体窒素で凍結させ、-80℃ で検体を保存する。後に、血清中の各種サイトカイン(IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-2, and IFN- $\gamma$ ) を BD™ CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit を用いて測定する。

in vitro における LNA miR-21 阻害剤の効果

In vitro での LNA miR-21 阻害剤が CD4+/CD8 + T 細胞に与える影響を評価するために、12 週齢の dnTGF- $\beta$  RII マウスの脾臓及び腸間膜リンパ節を採取し、前述の如く比重遠心分離法により単核細胞を回収し、anti-CD4/CD8 microbeads を用いて positive selection により CD4+/CD8 + T 細胞を分離回収し培養する。人工核酸には細胞内に導入する際にリポフェクション試薬等のキャリアを必要としない Gymnosis mechanism という優れた特徴を持つことが知られている(Methods Mol Biol. 2012;815:333-46.)。そこで、LNA miR-21 阻害剤(50nM)もしくは LNA scramble control(50nM) を RPMI1640, 10% FBS, 25mM HEPES, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 50mM 2-mercaptoethanol, 100U/mL recombinant IL-2 に添加し、48 時間後に細胞を回収する。次に、LNA miR-21 阻害剤による miR-21 阻害効果を判定するために、miR-21 の標的遺伝子である PDCD4 の蛋白量を Western blotting 法を用いて測定する。CD4 + T リンパ球の細胞増殖能は CellTrace CFSE Cell Proliferation kit を用いて測定し、培養上清中の各種サイトカイン(IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-2, and IFN- $\gamma$ ) は、BD™ CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit を用いて測定する。また、LNA miR-21 阻害剤によるアポトーシス誘導については、FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit を用いて検証する。

#### 4. 研究成果

現在、dnTGF- $\beta$  RII マウスと back cross 後の miR-21KO マウスの交配に成功し、統計学的有意差を確認するために、実験に必要個体数を確保するための繁殖の途中である。

実験途中で SPD 実験室内での感染事故があり、交配を中断する期間が発生したこと、新型コロナ感染の影響により大幅にマウス作成に時間を要した。

現在、集積された予備実験結果からは、IBD モデルマウスの miR-21 をノックアウトすることにより、腸炎の悪化が見られたことから、miR-21 は生体内で炎症を抑制する方向に働いている可能性が示唆された。

今後、マウス数が確保された時点で、上記解析方法を用いて、抗炎症のメカニズムを解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------