

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18日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21689049

研究課題名（和文）RNA ワールドにおける階層的遺伝子発現制御機構の解明とその応用

研究課題名（英文）Clarification of mechanisms for hierarchical gene expression in RNA world and its application

研究代表者

森 亮一（MORI RYOICHI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30509310

研究成果の概要（和文）：

炎症反応に関連する microRNA (miRNA) は、炎症制御並びに臓器線維化に関与すると考えられる。しかしながら、未だ炎症関連 miRNA の同定は行われていない。本研究では、次世代シーケンサーを用いて、皮膚創傷治癒過程において発現誘導される既知及び未知 miRNA を網羅的に同定した。さらに、組織学・分子細胞生物学・イメージング等様々な手法を用いて、炎症関連 miRNA の同定及び機能解明を行った。本研究成果により、miRNA が司る炎症・組織修復の制御機構の一端を解明することが出来た。

研究成果の概要（英文）：

Inflammation-related miRNAs might be involved in regulation of inflammatory response and tissue fibrosis. However, these genes have not been identified yet. In the present study, we identified wound-related known and unknown miRNAs using next generation sequencing. Then we identified inflammation-related miRNAs and clarified its functions using histological, cellular and molecular biological, and imaging analysis *in vivo* and *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	20,200,000	6,060,000	26,260,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学、歯科放射線学

キーワード：免疫・炎症・microRNA・次世代シーケンサー・皮膚創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

発生学領域において様々なモデル生物を用いた研究により、組織修復に限って炎症反応は必ずしも必要でなく、逆に組織線維化を導く増悪反応であると考えられているがその分子メカニズムは明らかではない。そこで、炎症反応が惹起しない PU.1 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて皮膚創傷治癒を調べた

結果、PU.1 KO マウスは治癒が促進し、さらに癒痕が形成されなかった (Martin et al, Curr Biol, 2003)。次の解析として、炎症反応並びに癒痕形成関連遺伝子の同定を目的とし、PU.1 KO と wild type (WT) マウスの比較検討による DNA マイクロアレイ解析を行い、186 種類の候補遺伝子 (炎症反応依存遺伝子群) を抽出、発現細胞の同定を行った

(Cooper et al, Genome Biol, 2004)。損傷部に存在する線維芽細胞が分泌する細胞外基質は、癒痕形成に直接関与すると考えられていることから、抽出した遺伝子群の中でも osteopontin (OPN) が癒痕形成に関与すると示唆された。そこで私達は、皮膚創傷治癒における OPN の機能解析を目的とし、アンチセンスオリゴ (AS ODN) を用いて皮膚創傷部特異的に OPN ノックダウンを行ったところ、OPN AS ODN 塗布部は治癒が促進し、癒痕形成が減弱した (Mori et al, J Exp Med, 2008)。

以上の研究成果により、私達は癒痕形成関与遺伝子として OPN を同定し、更に OPN を標的とした核酸医薬の開発に至り、炎症反応と組織修復の分子機構の一端を解明することができた。しかし、他の癒痕形成関与遺伝子の存在が示唆されるので、詳細な解析を行う必要がある。

近年、蛋白質に翻訳されないと考えられていた多数の DNA 配列が ncRNA (non-coding RNA) として転写され、蛋白質翻訳制御に関与していることが明らかになった。ncRNA の中でも micro RNA (miRNA) は、標的 mRNA に作用して蛋白質翻訳制御に関与する分子として知られている。いくつかの miRNA は、炎症反応特異的に誘導されることが明らかにされている (O'Connell RM, PNAS, 2007)、さらに miRNA-155 は、免疫恒常性の破綻に起因する気管支線維化発症に関与することが明らかにされた (Rodriguez et al, Science, 2007)。一方私達は、皮膚創傷治癒過程における炎症期・増殖期において miRNA-132、-146a、-155 が発現誘導されることを見出した。従って、炎症反応により特異的に発現誘導される miRNA は、炎症反応だけでなく組織修復時に重要な役割を担っていると推察されるが、未だ同定すらされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症・組織修復並びに治癒後に生じる癒痕形成 (傷跡、線維化) の分子メカニズム解明及び皮膚創傷治癒に効果のある分子標的核酸医薬の開発を試みることである。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚損傷モデルの作成

8 週齢 ICR マウス (雄) の背部に、直径 4 mm のバイオプシーパンチ (カイ インダストリーズ) を用いて皮膚打ち抜き損傷を作成した。その後、正常皮膚及び受傷後 1, 3, 7, 10, 14 日目に、損傷部を中心として直径 8 mm のバイオプシーパンチで損傷部を採取した。

(2) 免疫沈降法による miRNA 精製

皮膚創傷サンプルを Cell Lysis Buffer

(Wako) に浸し、緩やかに 5 分間ホモジナイズした。次に、遠心操作を行い、上清を回収した。回収した上清をさらにフィルターを用いて精製を行った。最後に、抗マウス Argonaute2 (Ago2) 抗体 (Wako) を用いた免疫沈降法により Ago2-miRNA 複合体を回収した。

(3) フェノール・クロロホルム法による miRNA 精製

採取した皮膚損傷サンプルを、TissueLyser II (Qiagen) (粉碎条件: 2 分、25 Hz) を用いて粉碎した。その後、miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて miRNA を精製した。

(4) miRNA ライブラリーの作製

免疫沈降法によって精製した miRNA サンプルを用いて、small RNA Cloning Kit (TaKaRa) による miRNA クローニングを行い、次世代シーケンサー用サンプルである miRNA ライブラリーを作製した。ライブラリー作製効率については、TA cloning、塩基配列決定を行い、ライブラリー作成が問題なく行われていることを確認した。

(5) 次世代シーケンサーを用いた既知 miRNA 及び未知 miRNA 候補群の網羅的同定

次世代シーケンサー (Illumina) を用いて、トランスクリプトーム解析を行った。その後、配列のフィルタリング、ゲノムへのマッピング、アノテーション作業、配列のグルーピング、二次構造予測を行った。

(6) 定量 PCR 法による miRNA 発現動態解析

フェノール・クロロホルム法で抽出した miRNA をサンプルとして、TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) 及び microRNA LNATM PCR primer sets (Exiqon) を用いて cDNA を合成した後、miRNA の定量を行った。

(7) *In situ* hybridization 及び免疫組織化学的染色

皮膚組織を採取後、4% パラフォルムアルデヒドを用いて組織固定を行い、パラフィン切片を作成した。コントロールプローブとして miRCURY LNATM Detection Control Probe (Exiqon)、miRNA 検出プローブとして miRCURY LNATM microRNA Detection Probe (Exiqon) を使用した。その後、F4/80 抗体 (Abcom) または好中球抗体 (Abcom) を用いて、免疫組織化学的染色を行った。

(8) PU.1 遺伝子欠損マウスを用いた機能解析

生後 1 日齢の WT、PU.1 遺伝子ヘテロ欠損

(ht) 及び KO マウスの背部に、長さ 1 cm の皮膚創傷を施した。その後、3 時間後に創傷部を中心として 1 mm 幅で皮膚創傷部位を摘出した。摘出したサンプルは、フェノール・クロロホルム法によって miRNA 精製を行った。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを用いた皮膚創傷治癒過程における miRNA 発現動態の解析
miRNA は、細胞核内において既存遺伝子と同様に転写され、核外に移行する。その後、細胞質内で Dicer による修飾を受けて成熟型 miRNA が生合成され、最終的に Ago2 蛋白質と複合体を形成して標的 mRNA に作用し、標的遺伝子の蛋白質翻訳制御に関与している。すなわち miRNA 機能を考慮した場合、Ago2 蛋白質と相互作用をしている成熟型 miRNA のみが、実際に翻訳抑制機能を有することになる。そこで、抗 Ago2 抗体による免疫沈降法を用いて成熟 miRNA の精製を行い、次世代シーケンサーを用いて既知及び新規 miRNA 候補の探索及び発現パターン解析を行った。その結果、皮膚創傷治癒過程において 300 種類以上の miRNA が発現誘導されていることが明らかとなった。さらに、バイオインフォマティクス解析による二次構造予測を行った結果、83 種類の新規 miRNA 候補を同定した。

miR name	Unwounded	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10	Day 14	Day1 / unwounded
mmu-miR-147	6	442	96	8	12	8	73.87
mmu-miR-223	3957	138618	29135	7251	2968	5883	35.93
mmu-miR-129-3p	19	582	64	47	47	54	30.63
mmu-miR-21*	256	2751	1721	76	67	34	10.75
mmu-miR-34b-5p	250	1672	1331	482	179	439	6.69
mmu-miR-142-3p	1872	12270	6540	5416	2617	4324	6.55
mmu-miR-142-5p	2493	15944	8980	5492	3146	3254	6.40

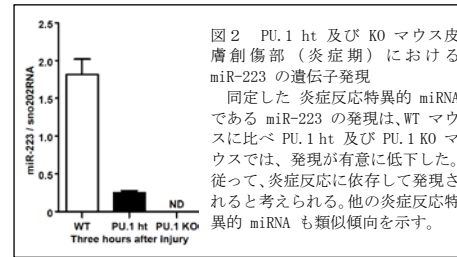
図1 次世代シーケンサーを用いた miRNA 群の同定
数値は発現量(リード数)を示す。上記 miRNA 群は、定量 PCR 法により発現パターンを検証済みである。

(2) 炎症反応特異的 miRNA の同定

本研究におけるマウス皮膚創傷モデルでは、受傷後 3 日目迄が炎症期に該当する。そこで正常皮膚と受傷後 1 日目の発現量を比較し、炎症反応によって特異的に発現誘導される miRNA を抽出した。そして定量 PCR を用いて、詳細に発現動態の解析を行った結果、miR-21*、miR-129-3p、miR-139-5p、miR-142-3p、miR-142-5p、miR-147、miR-223、miR-340-5p は炎症期において有意に発現が上昇していた(図1)。

さらに、真に炎症反応依存的であることを実証することを目的とし、PU.1 ht 及び KO マウスを用いて、上記 miRNA 群の発現定量解析を行った。その結果、miR-21*、miR-129-3p、miR-142-3p、miR-142-5p、miR-147、miR-223、miR-340-5p については、PU.1 ht もしくは PU.1 KO マウス皮膚創傷

部で有意に発現が減弱していた。従って上記 7 種類の miRNA 群は、炎症反応に依存して発現誘導されると考えられた(図2)。



(3) 炎症反応特異的 miRNA 発現細胞の同定

In situ hybridization 法及び蛍光免疫液染色法を用いて、炎症反応特異的 miRNA 発現細胞の同定を行った。その結果、miR-147 及び miR-223 については好中球に発現していることが確認された。

(4) Rab37/Munc13-1 複合体はマクロファージにおける TNF α 分泌を制御する

公共データベースを用いて炎症反応関連 miRNA の標的遺伝子の同定を試みた。興味深いことに、炎症関連 mRNA に作用するだけでなく、サイトカイン分泌(小胞輸送)に関与する低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリー遺伝子群にも作用することが示された。これは miRNA が様々な細胞内イベントに協調的に作用し、炎症反応のみならず、生命常性を維持している可能性を示唆する結果であり、とても興味深い。そこで、炎症反応特異的 miRNA と Rab ファミリーの相互作用解明に関する先行的な研究として、我々が同定した炎症反応に関連すると推察された Rab37 の機能解析を行った。その結果、Rab37 は Munc13-1 蛋白質と複合体を形成し、マクロファージからの主要な炎症性サイトカインである TNF α の分泌制御に必須であることが明らかとなった(図3)。

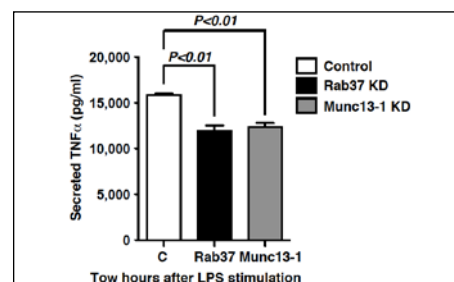


図3 Rab37 及び Munc13-1 はマクロファージからの TNF α 分泌を制御する
Rab37 及び Munc13-1 遺伝子発現抑制(KD)を行った RAW264.7 細胞株では、TNF α の分泌が減少した。

(5) 炎症制御・組織修復に関与する血液由来分泌型 miRNA 機能解明に関する基礎的検討

皮膚創傷治癒は、遺伝的背景・栄養状態・

糖尿病を代表とする生活習慣病・加齢等様々な内因・外因性因子の影響を受ける。その原因の一つとして、局所及び全身性の炎症制御の破綻が示唆されているが、その分子メカニズムは明らかではない。一方、血液中に存在する分泌型 miRNA は、様々な病態に関与していると考えられている。そこで私達は、血液由来分泌型 miRNA の炎症制御・組織修復における基礎的検討を目的とし、免疫沈降法を用いて、老化及び肥満モデルマウス血漿中に存在する分泌型 miRNA の精製及びクローニングを行い、次世代シーケンシングを用いて網羅的同定を行った。その結果、多種類の分泌型 miRNA 群は、肥満及びカロリー制限下において顕著に発現動態が変化していた(図4)。同定された一部の分泌型 miRNA は、血液を介して局所炎症並びに組織修復に関与していると考えられる。

ID	AL(fed)	AL(fasted)	CR(fasted)	HFD(fasted)
ACC="MI0001163"; ID="mmu-mir-411"	56	158	70	1
ACC="MI0000796"; ID="mmu-mir-379"	72	232	63	4
ACC="MI0000605"; ID="mmu-mir-329"	53	205	27	4
ACC="MI0004639"; ID="mmu-mir-495"	8	192	26	5
ACC="MI0000176"; ID="mmu-mir-154"	111	413	101	13
ACC="MI0001524"; ID="mmu-mir-431"	7	67	23	3
ACC="MI0009939"; ID="mmu-mir-1948"	5	57	4	2
ACC="MI0000403"; ID="mmu-mir-34c"	41	63	32	4
ACC="MI0000799"; ID="mmu-mir-382"	35	207	40	10
ACC="MI0000625"; ID="mmu-mir-341"	1	39	27	2

図4 生理条件に変動するマウス血漿中に存在する分泌型 miRNA 群。カロリー制限マウス (CR) 及び高脂肪食餌マウス (HFD) は、自由摂食群 (AL) マウスに比べ、多数の miRNA 群の発現量が減少する。一部の炎症関連 miRNA は、HFD において発現減少していたことから、普遍的に炎症制御に関与している可能性も考えられる。 fed: 絶食無、Fasted: 血漿採取前16時間絶食。

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7件)

- ① Chiba T, Tsuchiya T, Mori R, Shimokawa I: Reporter bioassay systems for the phenotypic screening of candidate drugs, *Sensors*, 12, 1648-1656, 2011. (査読有)
- ② Mori R, Ikematsu K, Kitaguchi T, Kim SE, Okamoto M, Chiba T, Miyawaki A, Shimokawa I, Tsuboi T: Release of TNF- α from macrophages is mediated by small GTPase Rab37. *European Journal of Immunology*, 41, 3230-3239, 2011. (査読有)
- ③ Komatsu T, Trindade LS, Chiba T, Hayashi H, Henmi T, Ushiroda Y, Mori R, Shimokawa I: Acute stress response modified by modest inhibition of growth hormone axis: a potential machinery of the anti-aging effect of calorie restriction. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132, 103-109,

2011. (査読有)

- ④ Chiba T, Tsuchiya T, Komatsu T, Mori R, Hayashi H, Shimokawa I: Development of Calorie Restriction Mimetics as Therapeutics for Obesity, Diabetes, Inflammatory and Neurodegenerative Diseases. *Current Genomics*, 11, 562-567, 2010. (査読有)
- ⑤ Shaw TJ, Kishi K, Mori R: Wound-associated skin fibrosis: mechanisms and treatments based on modulating the inflammatory response. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 10, 320-330, 2010. (査読有)
- ⑥ Chiba T, Tsuchiya T, Komatsu T, Mori R, Hayashi H, Shimano H, Spindler SR, Shimokawa I: Development of a bioassay to screen for chemicals mimicking the anti-aging effects of calorie restriction, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 401, 213-218, 2010. (査読有)
- ⑦ Yamaza H, Komatsu T, Wakita S, Kijogi C, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Furuyama T, Mori N, Shimokawa I: FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction. *Aging Cell*, 9, 372-382, 2010. (査読有)

[学会発表] (計11件)

- ① Mori R: Identification of differentially expressed circulating microRNA-complexed with argonaute2 in blood plasma of calorie restriction and high fat diet-induced obese mice by next generation sequencing, The 2nd Pusan-Nagasaki Joint Seminar on Aging Research, 16 February, 2011, Pusan, Korea
- ② 森 亮一, Kim Sang Eun, 岡本 百々子, 千葉 卓哉, 下川 功: 皮膚創傷治癒過程における炎症反応特異的 microRNA の同定、第33回日本分子生物学会年会、2011年12月13日~16日、横浜
- ③ 森 亮一: 皮膚創傷治癒過程における炎症反応特異的 microRNA の同定、第3回日本 RNAi 研究会、2011年8月26日~27日、広島
- ④ 森 亮一, 間所 俊介, Kim Sang Eun, 小松 利光, 千葉 卓哉, 坪井 貴司, 下川 功: マクロファージのサイトカイン分泌に関与する低分子量 G 蛋白質 Rab family の機能解析、第34回日本基礎老化学会、2011年6月17日~18日、東京
- ⑤ Mori R: Molecular mechanisms for

TNF α secretion from macrophages,
Gordon Research Conferences -Tissue
Repair & Regeneration, 5-10 June,
2011, New Hampshire, USA.

- ⑥ 森 亮一、千葉 卓哉、下川 功：マクロファージにおける tumor necrosis factor- α の分泌は低分子量 G 蛋白質 Rab37 によって制御される、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 28 日～30 日、横浜
- ⑦ 森 亮一、Kim San Eun、兼松 宗太郎、千葉 卓哉、小松 利光、鈴木 穰、下川 功：次世代シーケンサーを用いたカロリー制限及び肥満マウス血漿中に存在する microRNA の網羅的同定、第 2 回 RNAi 研究会、2010 年 8 月 27 日～28 日、広島
- ⑧ Mori R: Identification of differentially expressed microRNA in blood plasma of calorie restricted and obese mice by next generation sequencing. Asian Aging Core for Longevity Research and Education 2010、August 22～24, 2010, Jeju Island, Korea
- ⑨ 森 亮一、Kim San Eun、兼松 宗太郎、千葉 卓哉、小松 利光、鈴木 穰、下川 功：次世代シーケンサーを用いたカロリー制限及び肥満マウス血漿中に存在する microRNA の網羅的同定、第 33 回日本基礎老化学会、2010 年 6 月 17 日～18 日、名古屋
- ⑩ 森 亮一、千葉 卓哉、下川 功：デジタルトランスクリプトーム解析による炎症及び組織修復関連 microRNA の網羅的同定、第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 27 日～29 日、東京
- ⑪ 森 亮一、池松 和哉、下川 功、坪井 貴司：Molecular mechanisms of cytokine secretion in macrophages、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日～12 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 亮一 (MORI RYOICHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：30509310

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し