

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06335

研究課題名(和文) マイクロRNA-33の骨髄機能および慢性炎症における役割の検討

研究課題名(英文) Analysis of the effect of microRNA-33 on bone marrow function and chronic inflammation

研究代表者

馬場 理 (Baba, Osamu)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：30758446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてはマイクロRNA-33の白血球分画および骨髄機能に与える影響について解析を行った。結果、マイクロRNA-33欠損マウスにおいて、骨髄中の造血幹細胞分画中でその標的遺伝子であるHMGA2の発現増加を認められた。それに伴って造血幹細胞分画におけるアポトーシスが減少し、造血幹細胞およびその下流の骨髄球系前駆細胞、単球分画が増加していることが見出された。また、マイクロRNA-33欠損はABCA1の発現増加を通じてHDLコレステロールを増加させることが知られているが、これによって骨髄中の単球の血中への移行が抑制されること、結果として血中の炎症性単球が減少することが示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed the effect of microRNA (miR)-33 on leukocyte population and bone marrow function. As a result, the expression of High mobility group AT-hook 2 (HMGA2) targeted by miR-33 was increased in hematopoietic stem cells in miR-33 deficient mice, which reduced their apoptosis and subsequently increased hematopoietic stem cell, myeloid progenitor and monocyte population in bone marrow. On the other hand, miR-33 is known to increase HDL cholesterol by targeting ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1). We also demonstrated that this increase in HDL cholesterol suppressed the emigration of monocytes from bone marrow to peripheral blood, which decreased peripheral inflammatory monocytes in miR-33 deficient mice.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マイクロRNA 単球 HDLコレステロール ABCA1 HMGA2

1. 研究開始当初の背景

近年、マイクロ RNA (miR) という 20 塩基程度の遺伝子をコードしない RNA が内在性に存在し、標的とした mRNA の翻訳を抑制することによって種々の遺伝子発現を精巧に調節していることが明らかになってきた。その中でも、miR-33 はコレステロール代謝遺伝子を制御する転写因子である sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP-2) のイントロンに種を超えて高度に保存され、コレステロール輸送蛋白である ATP-binding cassette A1 (ABCA1) を標的として抑制し、血中 HDL コレステロール値を低下させることが報告されている。我々のグループにおいて、この miR-33 の欠損マウスを作製したところ、マクロファージおよび肝臓における ABCA1 の発現上昇、マクロファージにおけるアポ A-1 に対するコレステロール引き抜き能の増加、血中 HDL コレステロール値の上昇を認めた()。さらに、miR-33 欠損マウスと動脈硬化のモデルマウスであるアポ E 欠損マウスをかけあわせることによって、miR-33/アポ E 両欠損マウスを作製したところ、動脈硬化進展抑制効果が認められた()。このため、miR-33 は動脈硬化性疾患に対する新たな治療標的となりうると考えられた。しかしながら、一方で上記両欠損マウスにおいて末梢血中の炎症性単球の割合が上昇していることも見出しており、これは動脈硬化形成に対して負に作用する可能性があった。このため、miR-33 を治療標的とする上で、炎症性単球に対する影響を明らかにすることが重要であると考えられた。

2. 研究の目的

miR-33 の白血球分画、特に炎症性単球分画、および骨髄機能に与える影響について検討する。

3. 研究の方法

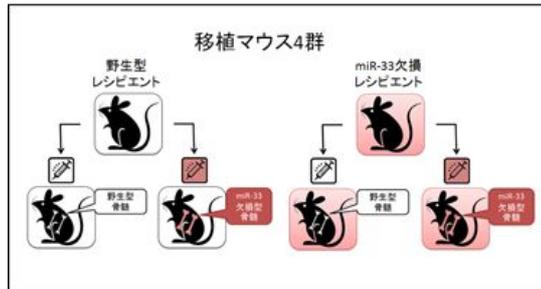
(1) miR-33 欠損マウスにおける末梢血白血球分画および骨髄中の造血系細胞分画についてフローサイトメトリーを用いて解析を行い、野生型マウスと比較検討を行った。

(2) 上記実験により miR-33 欠損マウスにおいて造血幹細胞分画の増加が認められたために、その原因について解析を行った。造血幹細胞の規定因子としては自己複製、髄外移送、アポトーシス、分化が考えられたために、それぞれの因子について解析を行った。

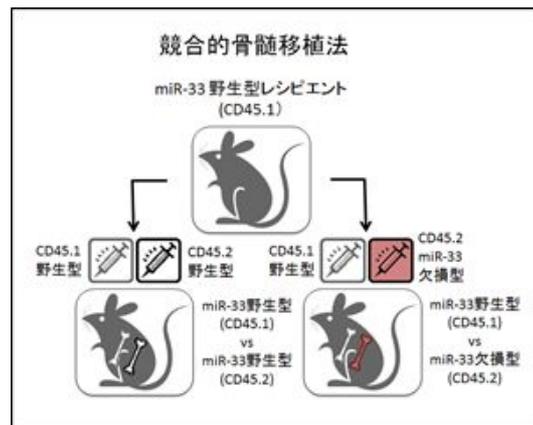
(3) 上記解析にて得られた、miR-33 欠損マウスにおける表現型が造血幹細胞由来の表現型であるのか、またはそれ以外の細胞由来の表現型であるのかを骨髄移植モデルを用いて解析した。

野生型のレシピエントに miR-33 欠損型の骨髄を移植することによって、血球系のみ miR-33 の欠損した野生型マウスを作成。また、

miR-33 欠損型のレシピエントに野生型の骨髄を移植することによって、血球系のみ野生型の miR-33 欠損マウスを作成した。コントロールとして野生型のレシピエントに野生型の骨髄を移植したもの、miR-33 欠損型のレシピエントに miR-33 欠損型の骨髄を移植したものを作成した(下図)。これら 4 群のマウスの末梢血および骨髄中の単球について、また造血幹細胞を含めた骨髄中の血球系前駆細胞の解析を行った。



また、さらに競合的骨髄移植法を行った。白血球に CD45.1 を発現する Ly5.1 マウスを用いた。野生型マウスおよび miR-33 欠損マウスの白血球においては CD45.2 が発現している。Ly5.1 マウスに対して、Ly5.1 マウスの骨髄および野生型マウスの骨髄を 1:1 で混合したものを移植し、コントロールとした。これに対して Ly5.1 マウスに Ly5.1 マウスの骨髄および miR-33 欠損マウスの骨髄を 1:1 で混合したものを移植し解析を行った(下図)。



(4) これまでの実験により同定された血球系由来の表現型を来たすと思われる miR-33 の標的遺伝子について検討した。miR-33 欠損マウスより造血幹細胞含有分画である Lin(-) Sca1(+) c-Kit(+) (LSK) 細胞分画をセルソーターを用いて採取し、そこから RNA を抽出した。バイオインフォマティクスによって表現型の原因と思われる遺伝子群を選定し、その mRNA の発現量について定量的 PCR を行って解析を行った。予想通りに発現上昇の認められた遺伝子について、フローサイトメトリーの蛍光強度 (MFI) によってタンパク発現も上昇していることを確認した。さらに、miR-33 欠損マウスより LSK 細胞を採取し、

レンチウイルスを用いて目的の標的遺伝子の siRNA を導入、アポトーシスの減少が消失するかの検討を行った。

(5) 造血幹細胞以外の因子については、まずは miR-33 欠損マウスの最も顕著な表現型である、血中 HDL コレステロールの増加で説明できるか検討を行った。pLIVE[®]ベクターを用いてヒト ABCA1 もしくはヒトアポ A1 を野生型のマウスの肝臓に導入することによって miR-33 欠損マウスと同様に HDL コレステロールの増加を引き起こし、miR-33 欠損マウスの非血球系の表現型が再現できるかを検討した。

4. 研究成果

(1) miR-33 単独欠損マウスにおいては、miR-33/アポ E 両欠損マウスとは逆に、末梢血中の炎症性単球 (Ly6C^{high} monocyte) が減少していること、また骨髄中では逆に増加していることが判明し、骨髄から末梢血への単球移送が低下していることが示唆された。また、骨髄中において造血幹細胞含有分画である LSK 細胞分画および骨髄球系前駆細胞分画 (CMP, GMP, MEP) の増加が認められた。

(2) 造血幹細胞数の規定因子について、分化については上記の如く、下流の前駆細胞の増加が認められていたため、他の因子について解析を行った。

自己複製に関して、造血幹細胞の細胞周期解析を DAPI および抗 Ki-67 抗体を用いて行ったが、miR-33 欠損マウスおよび野生型マウスにおいて特に差は認められなかった。

髄外移送については末梢血中の造血幹細胞数について検討したが、これにおいても差は認められなかった。

造血幹細胞におけるアポトーシスにおいて蛍光標識をおこなった Annexin V を用いて解析を行ったが、これは miR-33 欠損マウスにおいて有意に減少していた。

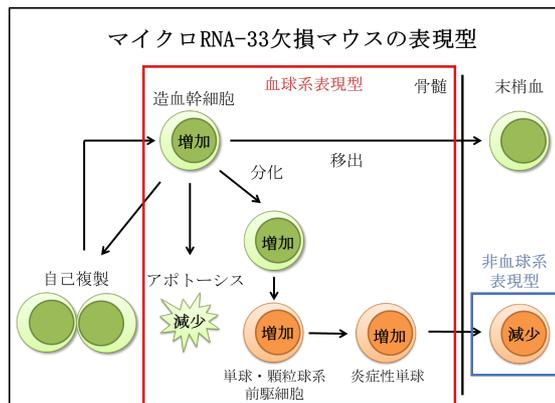
以上より、miR-33 欠損マウスにおける造血幹細胞分画の増加は、アポトーシスの減少によるものであることが示唆された。

(3) 骨髄移植モデルを用いた miR-33 欠損マウスの表現型の原因因子の解析により下記が判明した。

骨髄移植によって作成した 4 群の中で、末梢血炎症性単球の減少は、レシピエントにおいて miR-33 が欠損している群においてのみ認められ、この表現型が造血系以外の細胞由来であることが示唆された。一方、骨髄中の造血幹細胞、骨髄球系前駆細胞、炎症性単球の増加は、miR-33 欠損骨髄を移植された群においてのみ認められ、これらの表現型が血球系細胞由来であることが示唆された。

競合的骨髄移植において、末梢血白血球分

画の CD45.2 陽性細胞の割合の解析すると、コントロールグループ (Ly5.1 マウスの骨髄および野生型マウスの骨髄を 1:1 で移植) において、その割合はほぼ 50%であった。一方で、Ly5.1 マウスの骨髄および miR-33 欠損マウスの骨髄を 1:1 で混合したものを移植したマウスでは CD45.2 陽性細胞の割合は、白血球全体において増加傾向にあり、特に炎症性単球においては有意に増加していた。すなわち、非血球系細胞の環境が同等であれば、miR-33 欠損は末梢血中の炎症性単球を増加させる方向に働くということが示唆された。これは の結果と一致する(下図)。



(4) miR-33 の標的遺伝子かつ造血幹細胞数に影響を来しうる可能性のある遺伝子について、mRNA 発現量を測定したところ、HMGA2 という遺伝子の発現量が、miR-33 欠損マウスより採取した LSK 細胞において有意に上昇が認められた。フローサイトメーターを用いたタンパク発現解析でも、同様に上昇が認められた。また、HMGA2 の 3' UTR を持つレポーター遺伝子とともに miR-33 を 293T 細胞に導入したところ、レポーター活性の低下が認められた。これは HMGA2 が miR-33 の直接の標的遺伝子であることを示唆する。さらに、miR-33 欠損マウスより採取した LSK 細胞に HMGA2 の siRNA を導入したところ、アポトーシスの減少が消失した。これは miR-33 欠損による HMGA2 の上昇が、造血幹細胞におけるアポトーシス減少に寄与していたことを示唆する。さらに、miR-33 欠損マウスに垂致死性の放射線を照射、白血球の立ち上がりを観察したところ、野生型マウスに比べて早期に立ち上がることが確認できた。これにより、miR-33 が化学療法や放射線療法からの白血球立ち上がりに対する新たな治療標的となる可能性が示唆された。

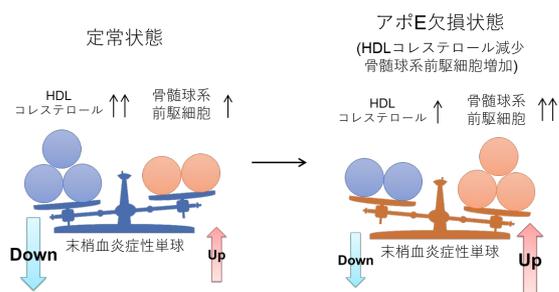
(5) 上記の如く、miR-33 欠損マウスにおいて末梢血炎症性単球が減少している原因として、単球の骨髄から末梢血への移送が抑制されている可能性が考えられた。この移送には単球における CCR2 および骨髄ニッチにおける MCP1 が重要な働きをすることが報告されている。そこで、骨髄中の炎症性単球における CCR2 の発現および骨髄中の MCP1 の発現につ

いて解析をおこなったところ、miR-33 欠損マウスにおいて骨髄炎症性単球での CCR2 の発現低下が認められた。一方、MCP1 の発現に差は認められなかった。HDL コレステロールは単球における CCR2 の発現を低下させることが報告されており、miR-33 欠損マウスにおける HDL コレステロール上昇が、骨髄中の炎症性単球における CCR2 の発現を抑制し、その末梢血中への移送を抑制している可能性が考えられた。実際に、pLIVE®ベクターを用いてヒト ABCA1 もしくはヒトアポ A1 を野生型のマウスの肝臓に導入することによって HDL コレステロールを上昇させると、末梢血中の炎症性単球の減少および骨髄中の増加傾向が認められ、我々の仮説を実証する結果であった。

以上より、miR-33 欠損は、造血幹細胞において、その標的遺伝子である HMGA2 の発現を増加させることによってそのアポトーシスを減少させ、その下流の骨髄球系前駆細胞、骨髄中の炎症性単球数を増加させること、また肝臓における ABCA1 増加を通じた HDL コレステロールの上昇によって骨髄中の炎症性単球における CCR2 の発現を減少させ、その末梢血中への移送を抑制することが示唆された。

すなわち、miR-33 欠損マウスにおいて、末梢血中の炎症性単球数は、血球系の因子と非血球系の因子のバランスによって規定されること、定常状態においては非血球系の因子が強く働き、末梢血中の炎症性単球は減少方向に向かうことが考えられた。

以前の研究中、miR-33/アポ E 両欠損マウスにおいて末梢血中の炎症性単球の割合は miR-33 単欠損とは逆に増加していたが、アポ E 欠損は造血幹細胞の増加および HDL コレステ



ロールの低下を来すことが報告されており、miR-33 欠損による血球系の因子の増強および非血球系因子の低下を来し、結果として両欠損マウスでは末梢血中の炎症性単球の割合が増加した可能性が考えられる(下図)。以前、miR-33 欠損マウスにおいて動脈硬化抑制が認められることを我々は報告したが、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどを用いた miR-33 阻害による動脈硬化抑制効果については報告グループによって結果が異なる。末梢血中の炎症性単球の増減は動脈硬化進展に影響を与えられられるが、様々な実験条件が、上記の miR-33 欠損における 2 つの因子のバランスに影響し、末梢血炎症性単

球の増減、ひいては動脈硬化進展にも影響を与えている可能性も考えられる。このため、miR-33 を動脈硬化性疾患の治療標的とするためには、細胞もしくは臓器特異的な阻害方法を確立していく必要があると考えられる。

<引用文献>

Horie, T., K. Ono, M. Horiguchi, H. Nishi, T. Nakamura, K. Nagao, M. Kinoshita, Y. Kuwabara, H. Marusawa, Y. Iwanaga, K. Hasegawa, M. Yokode, T. Kimura, and T. Kita. 2010. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:17321-17326. doi:10.1073/pnas.1008499107.

Horie, T., O. Baba, Y. Kuwabara, Y. Chujo, S. Watanabe, M. Kinoshita, M. Horiguchi, T. Nakamura, K. Chonabayashi, M. Hishizawa, K. Hasegawa, N. Kume, M. Yokode, T. Kita, T. Kimura, and K. Ono. 2012. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice. *J Am Hear. Assoc.* 1:e003376. doi:10.1161/JAHA.112.003376.

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)

[学会発表](計 1 件)

馬場 理、堀江 貴裕、伯野 大彦、中島 康弘、桑原 康秀、中尾 哲史、出原 正康、宇佐美 俊輔、西賀 雅隆、西野 共達、井手 裕也、中関 典子、小山 智史、木村 昌弘、花田 律子、木村 剛、尾野 亘、「マイクロ RNA-33 の骨髄機能および慢性炎症における役割」、Research PlaNet 2016、平成 28 年 5 月 28 日、東京都千代田区内幸町

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場 理 (BABA, Osamu)
京都大学医学研究科・医員
研究者番号：30758446