

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19697

研究課題名(和文)放射線誘起線維症におけるmiRNAの機能解析と線維化治療への応用

研究課題名(英文)Functional analysis of miRNA in radiation induced fibrosis and its application to therapy

研究代表者

矢野 博之(Yano, Hiroyuki)

大分大学・全学研究推進機構・教務職員

研究者番号：50448552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線誘起線維症(RIF)は、コラーゲン等、細胞外マトリックスの過剰な蓄積の結果である。我々は、放射線によりI型コラーゲンの発現がTGF- β を介して増加することを報告した。miRNAは遺伝子発現を負に調節すると提唱されているが、RIFにおけるmiRNAの役割は不明である。本研究では、放射線によるI型コラーゲン発現増加に関わるmiRNAについて調べた。その結果、放射線によりmiR-29が減少し、miR-29過剰発現でI型コラーゲン発現増加が緩和された。さらに、放射線によるmiR-29の発現減少にTGF- β が関与していた。以上の結果、miR-29がRIFの重要な調節因子であることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Radiation-induced fibrosis (RIF) is thought to involve the excessive accumulation of collagen; previously, we reported that radiation increased the type I collagen expression and TGF- β was involved in this increase. It has been suggested that miRNA negatively regulate the gene expression. However, their role in the RIF process remains unclear. In this study, we examined the effects of miRNA on the type I collagen expression induced by radiation. We found that miR-29 were downregulated and targeted type I collagen gene in irradiated cells. We also found that the overexpression of miR-29 inhibited the type I collagen expression whereas the knockdown of miR-29 enhanced it. In addition, TGF- β signaling decreased the miR-29 expression whereas the inhibition of this signaling cancelled this decrease. In conclusion, miR-29 was involved in the regulation of type I collagen expression through the TGF- β signaling in irradiated cells, suggesting that miR-29 may be an important regulator of RIF.

研究分野：放射線管理

キーワード：放射線誘起線維化 miRNA コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

現在、放射線はCT検査や癌治療等、医学的に広く実用化されているが、正常な組織や臓器への放射線照射を避けることは困難であり、その結果、副作用として生じる放射線障害が懸念されている。放射線障害には、照射から数日から数か月内に起こる急性障害と数か月以後に現れる晩期障害に分類される。臨床で大きな問題となるのは、主に晩期障害であり、晩期障害を予防するために放射線照射量を少なくしたり、照射範囲を縮小したりするなど対応されているが、それにより腫瘍への効果も十分得られなくなるとの問題もある。放射線によって生じる晩期障害の一つに、放射線誘発線維症(RIF)があり、特に肺や皮膚への線維化が、放射線治療を行う際に重要視される有害事象となっている。RIFは、様々な種類のサイトカインや増殖因子と協調して、放射線による線維芽細胞の増殖や分化、およびそれによるコラーゲン等の細胞外マトリックス(ECM)構成因子の過剰な蓄積の結果と考えられているが、RIFプロセスを促進する遺伝子発現機構やそれに関わるシグナル伝達等のメカニズムについて詳細に解明されていない。従って、RIFのメカニズムについて解析し、臨床的にRIFによる肺や皮膚への線維化を軽減させる手法を見出すことが急務であると考えられる。

コラーゲン分子は、ECMの主成分であり、体内のタンパク質の約3割を占めることに加え、現在、発生や再生時の組織形成や種々の細胞の機能発現にも重要な役割を担うことが報告されている。我々は、このコラーゲン遺伝子についてRIFに関連する遺伝子発現機構に十分に関与することと予測し、RIFメカニズムについて解析するために、コラーゲン遺伝子を研究対象として、その放射線による発現変化について調べている。これまでに、放射線により、NIH3T3培養細胞、マウス胎児皮膚由来線維芽細胞にてI型コラーゲンの発現がmRNAレベル、転写レベル、タンパク産生レベルで増加し、この発現増加に関わるシグナル伝達にMAPKシグナル経路はほとんど関与せず、TGF- β /Smadシグナル経路が重要な役割を担うことを示した。また、TGF- β の応答因子と考えられているCTGFについても、放射線によるI型コラーゲン発現増加に関与することを報告した。

近年、タンパク質をコードしないRNAの一種であるmicroRNA(miRNA)に関する研究が盛んに展開されている。miRNAは、標的とするmRNAの3'UTRと特異的に結合することでタンパク質への翻訳の阻害、もしくは直接分解し、転写後の遺伝子発現調整に関与すると考えられている。さらにmiRNAが、細胞増殖、細胞死、分化等の局面で重要な機能を果たし、ガンをはじめとした各種疾患にも関与していることが明らかになりつつある。RIFプロセスに関しても、放射線による

miRNAの発現変動が、I型コラーゲンの発現増加に、直接的または間接的に関与していると考えられるが、RIFプロセスとmiRNAとの関連を検討している報告は、まだない。また、放射線によって発現が変化するmiRNAについて、いくつかの報告はあるが、miRNAの転写等の遺伝子発現機構への放射線の影響についての報告はない。従って、RIFプロセスに関連する遺伝子発現機構に関してさらなる知見を得るためには、転写後の遺伝子発現制御に関わるmiRNAの関与の有無について調べる必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、まず、RIFプロセスにおける遺伝子発現制御に関わるmiRNAについて調べるために、miRNAマイクロアレイ解析により、放射線により発現変動する複数のmiRNAを見出す。そして、放射線により発現が変動したmiRNAの過剰発現、およびノックダウン実験を行い、その場合のI型コラーゲン遺伝子の発現がどのように変化するか調べる。次に、I型コラーゲンの発現に関与するCTGFについてもmiRNAが発現調整にどのように機能するか調べる。

放射線により発現変動したmiRNAについて、放射線による転写調節領域の存在、さらにその転写調節領域に結合する転写因子の同定を行い、miRNA転写調節機構への放射線の影響について調べる。

3. 研究の方法

(1) I型コラーゲンの発現調節に関与するmiRNAの同定と機能解析

放射線照射したNIH3T3細胞からsmall RNAを含むRNAを抽出してmiRNAアレイ解析を行い、放射線によって発現が変動するmiRNAを網羅的に調べた。そしてmiRNAデータベース(Targetscan)を用いてI型コラーゲン遺伝子を標的とするmiRNAを解析し、miRNAアレイ解析の結果と比較した。次にルシフェラーゼ・アッセイにより、miRNAの結合部位をルシフェラーゼ遺伝子の3'末端側に導入した場合のルシフェラーゼ活性、及びmiRNA結合部位に変異を加えた場合のルシフェラーゼ活性を測定し、I型コラーゲン遺伝子を標的とするmiRNAについて調べた。さらに、このmiRNAを過剰発現、及びknockdownさせた場合のI型コラーゲンの発現の変化をreal-time PCR、ELISAにて測定した。

(2) CTGFの発現調節に関与するmiRNAの同定と機能解析

ルシフェラーゼ・アッセイにてCTGF遺伝子とmiRNAとの結合部位のルシフェラーゼ活性の変化を測定し、CTGF遺伝子を標的とするmiRNAについて調べる。さらに、このmiRNAを過剰発現、及びknockdownした場合のCTGF

の発現の変化を real-time PCR、Western blotting にて測定した。そして、同様に I 型コラーゲンの発現の変化を測定して、miRNA が CTGF の発現調整を通して、間接的に I 型コラーゲンの発現に影響を与えるかどうか調べた。

(3) I 型コラーゲン発現増加に關与する miRNA の転写調節機構への放射線の影響の解析

(1)で解析した miRNA について、これら miRNA の転写調節機構への放射線の影響について調べるために、ルシフェラーゼ・アッセイにて miRNA のプロモーター解析を行った。ルシフェラーゼ・アッセイにて解析した miRNA 転写調節領域について、その領域に結合しうる配列を持つ転写因子をデータベース (TRANSFAC 等) により解析し、CHIP・アッセイより、予測した転写因子が miRNA 転写調節領域上に直接結合するか調べた。また、TGF- β /Smad シグナル伝達を阻害した場合の miRNA の発現の変化を real-time PCR にて調べた。

4. 研究成果

(1)放射線による I 型コラーゲンの発現増加における miRNA の作用機序の解明

miRNA アレイ解析の結果、放射線により 10 種の miRNA が発現低下、9 種の miRNA が発現増加した。これらの放射線により発現が変化した miRNA について、TargetsScan により I 型コラーゲン遺伝子を標的としうるか分析した結果、miR-29 family を見出した。ルシフェラーゼ・アッセイにより、I 型コラーゲン遺伝子の 3'UTR 活性を調べた結果、放射線により $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖遺伝子の 3'UTR 活性は増加したが、miR-29 結合部位に変異を加えた場合、放射線による増加が緩和された(図 1)。

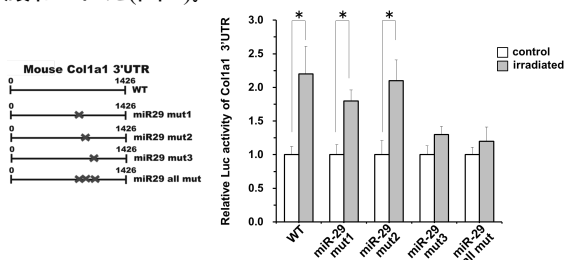


図 1 放射線による I 型コラーゲン 3'UTR 活性の変化

次に、miR-29 を過剰発現させた場合の I 型コラーゲンの発現変化を測定した。その結果、放射線により I 型コラーゲンの mRNA 発現量、およびタンパク産生は増加したが、miR-29 の過剰発現により、この発現増加が抑制された(図 2)。さらに CRISPR-Cas9 システムを用いて、miR-29 をノックアウトした細胞株を樹立し、この細胞株の I 型コラーゲンの発現について調べた結果、放射線による I 型コラーゲン発現の増加が、さらに増していた。これらの結果から、放射線による I 型コラーゲンの発現増加には、miR-29 が關与することが考えられる。

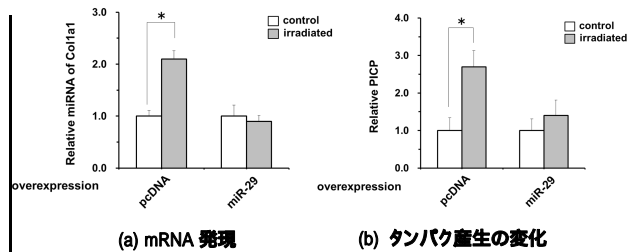


図 2 miR-29 過剰発現した場合の I 型コラーゲン発現の変化

(2)CTGF の発現調節に關与する miRNA の機能解析と I 型コラーゲン発現増加への寄与の解明

TargetsScan により選定した CTGF 遺伝子を標的としうる miRNA について、(1)の miRNA アレイの結果を解析した結果、miR-26 を見出した。CTGF の 3'UTR 活性についてルシフェラーゼ・アッセイにより測定した結果、放射線により増加したが、miR-26 結合部位に変異を加えると放射線による増加が緩和された。次に、miR-26 を過剰発現させた場合の CTGF の発現を測定した結果、放射線による CTGF の発現増加が緩和された(図 3a)。さらに、miR-26 を過剰発現させた場合、放射線による I 型コラーゲン発現増加が緩和された(図 3b)。以上の結果より、miR-26 は放射線による CTGF の発現増加を制御し、その発現制御により I 型コラーゲンの発現も間接的に調整することが考えられる。

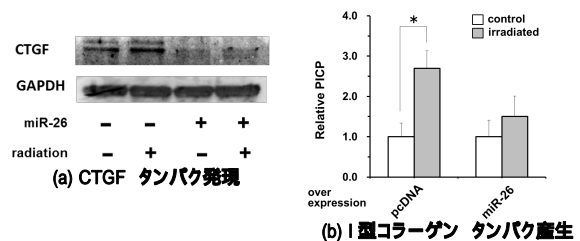


図 3 miR-26 過剰発現した場合の発現の変化

(3)miR-29 転写調節機構への放射線の影響の解析

放射線による miR-29 の発現低下に關して、その発現制御機構を調べるために、ルシフェラーゼ・アッセイにより miR-29 のプロモーター活性を測定した。miR-29b2 をコードする遺伝子の転写開始点から下流の+639bp から+865bp までの領域でルシフェラーゼ活性が増加し、また、同+1,030bp から+1,492bp までの領域では、ルシフェラーゼ活性が減少した(図 4)。

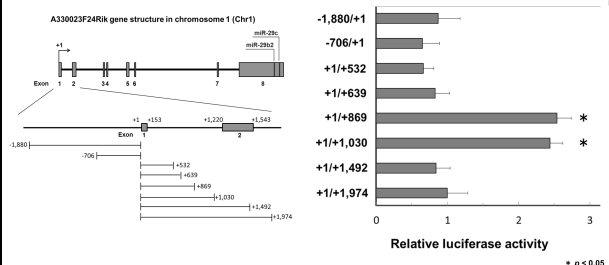


図 4 放射線による miR-29b2 プロモーター活性の変化

次に+1,030bpから+1,492bpまでの領域におけるプロモーター活性は、放射線により減少したため、TRANSFACによりこの領域に結合しうる転写因子を調べた。解析の結果、TGF-βの下流因子であるSmadの結合が予測され、CHIP・アッセイより、Smadが結合することが分かった(図5a)。さらに、このSmadとの結合が予想される領域に変異を加えるとルシフェラーゼ活性の減少が緩和された(図5b)。

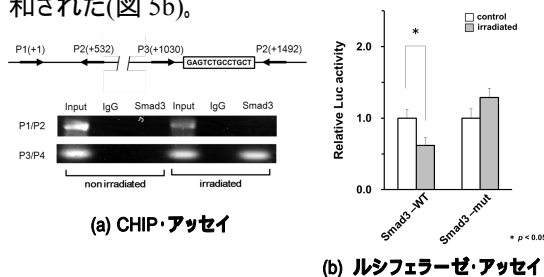


図5 miR-29 プロモーター活性の変化

以上の結果より、放射線により TGF-β/Smad シグナル経路を介して、miR-29 の発現が減少し、この miR-29 の発現が減少することで、放射線による I 型コラーゲンの発現増加がさらに増すことと考えられる。RIF の重要な調節因子として、miR-29 が示唆でき、今後、RIF の治療ターゲットとしての miR-29 の臨床的応用の可能性が考えられる。

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)

Watanabe K, Hida M, Sasaki T, Yano H, Kawano K, Yoshioka H, Matsuo N.: Sp1 upregulates the proximal promoter activity of the mouse collagen α1(XI) gene (Col11a1) in chondrocytes. In vivo Cell Dev Biol-Animal 52, 235-242, 2016. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

矢野博之、濱中良志、太田三紀、張娟娟、松尾哲孝、吉岡秀克:放射線による I 型コラーゲン発現調節における microRNA の機能とその発現。第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

矢野博之、濱中良志、太田三紀、張娟娟、松尾哲孝、吉岡秀克:放射線照射後の microRNA による I 型コラーゲン発現調節。第 48 回日本結合組織学会学術大会、2016 年 6 月 24 日～25 日、長崎大学医学部良順会館(長崎県長崎市)

矢野博之、濱中良志、太田三紀、張娟娟、松尾哲孝、吉岡秀克:放射線による I 型コラーゲン発現調節における microRNA の解析調節。第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1

日～4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

矢野博之、濱中良志、太田三紀、張娟娟、松尾哲孝、吉岡秀克:Sp7/Osterix は、骨芽細胞におけるマウス I 型コラーゲン 2 鎖遺伝子の発現を、基本プロモーターを介して誘導する。第 47 回日本結合組織学会学術大会、2015 年 5 月 15 日～16 日、コクヨホール(東京都港区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 博之 (Yano, Hiroyuki)

大分大学・全学研究推進機構・教務職員

研究者番号:50448552

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし