

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15163

研究課題名(和文) 長鎖非コードRNAの制御異常は、ABCトランスポーター病の分子病態を反映するか？

研究課題名(英文) Deregulated expression of lncRNAs in cystic fibrosis airway epithelial cells

研究代表者

首藤 剛 (Shuto, Tsuyoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・准教授

研究者番号：80333524

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)：嚢胞性線維症(CF)は、CFTRの遺伝子変異により生じる常染色体劣性の難治性遺伝性疾患である。なぜCF細胞で多様な遺伝子変化が起こるのかについては、未だ明らかになっていない。本研究では、全転写産物の発現解析可能なHuman transcriptome array (HTA) を用いて、CFTR機能不全気道上皮細胞における網羅的な遺伝子発現解析を試みた。その結果、これまで報告の無い機能未知なlncRNAの多くが、CFTRの機能依存的に発現変化することを見出した。また、CF患者由来の初代培養気道上皮細胞を用いた検討から、CFTRの機能依存的に発現変動する5種類の機能未知lncRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：Cystic fibrosis (CF) is the lethal inherited disorder caused by mutation in the gene encoding the CF transmembrane regulator (CFTR). However, the molecular basis of what and how gene transcription is regulated by mutant CFTR is still unclear. Here, I focused on lncRNAs, the novel class of functional RNA molecules with little or no protein-coding capacity. Human transcriptome array (HTA) characterized many coding and non-coding RNAs that are dysregulated in CFTR-dysfunctional CF cell line (CFBE41o-), and some of these genes are associated with some of the CF phenotypes. Among these non-coding RNAs, I identified six novel lncRNAs whose expression levels were inversely correlated with that of WT-CFTR, and five of six lncRNAs were significantly and consistently increased in primary human CF airway epithelial cells (DHBE-CF). This study may provide a novel molecular basis for CF-associated gene/protein dysregulation and pathology.

研究分野：細胞生物学、薬理学、分子生物学

キーワード：マイクロアレイ CFTR lncRNA

1. 研究開始当初の背景

嚢胞性線維症 (CF) は, Cl⁻チャネルである CFTR の遺伝子変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。CF は, 極めて高頻度・高致死率の遺伝子疾患として認識されているが, 全ての変異に有効な画期的な治療薬は, 未だ存在しない。興味深いことに, CF の病態形成には, CFTR loss of function 依存的な遺伝子発現変化が重要であり, その結果として, 感染性の炎症に伴う粘液の過剰分泌に伴う粘性痰 (喀痰) や肺気腫などが引き起こされる。したがって, 「なぜ, CF 細胞で, 多様な遺伝子変化が引き起こされるのか?」という疑問が生じるが, その明確な答えを見出した研究者はいまだ存在しない。このような背景の中, CF 細胞を用いた次世代マイクロアレイ解析 GeneChip® Human Transcriptome Array (HTA) (Affymetrics) (全転写産物検出可能) を行ったところ, 従来の報告通り, 遺伝子実態のある多くのコード遺伝子の発現変動が引き起こされていたが, 一方, 驚くべきことに, その機能が不明で遺伝子コードしていない長鎖 non-coding (nc) RNA (lncRNA) の発現の一部が, CFTR 機能依存的に変動することを見出した。申請者は, 「lncRNA の発現調節異常こそが, CF 病態の真実を説明するものなのではないか? また, CF 以外のトランスポーター病においても, その loss of function 依存的な lncRNA の機能的変動が起こるのではないか?」という仮説を立て, 本研究を開始した。

2. 研究の目的

嚢胞性線維症 (CF) は, Cl⁻を輸送する ABC トランスポーター CFTR の遺伝子変異により生じる常染色体劣性の難治性遺伝性疾患である。CF は, 極めて高頻度・高致死率の遺伝子疾患であることから, 分子機序に基づいた画期的な治療薬の登場が望まれていが, 「なぜ, CF 細胞で多様な遺伝子変化が起こるのか?」という命題に対しては誰も明確な解答を与えていない。申請者は, これまでに CF 病態形成に DNA メチル化異常・mRNA スプライシング異常を伴う「遺伝子発現調節異常」が深く関わることを見出してきた。本研究では, 網羅的解析で偶然に見出した CF 細胞や動物において異常な発現状態を呈する長鎖 non-coding (nc) RNA (lncRNA) に着目し, CF 病態形成との関わりを明らかにすることをおもな目的とし, 種々の検討を行った。

3. 研究の方法

A) 各種細胞の培養法

16HBE14o-, βγENaC-16HBE14o-, CFBE41o-, WT-CFTR-CFBE41o-, F508-CFTR-CFBE41o-, HSG 細胞の培養には 10 %ウシ胎仔血清 (FBS), および 100 U/mL penicillin / 100 mg/mL streptomycin (P/S) (GIBCO) を含む Minimum

Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich) を用いた。また, HSG を除く気道上皮細胞の培養に際しては, 培養容器を fibronectin coating solution (0.1 mg/mL MgCl₂, 0.1 mg/mL MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA in PBS (MgCl₂/CaCl₂(+)), 30 μg/mL Collagen, 10 μg/mL Human Plasma Fibronectin, PBS で希釈) でコーティングし, 37 °C 放置を 30 min 以上行った後, 細胞を付着させ培養した。なお, βγENaC-16HBE14o- 細胞は細胞立ち上げ時に, 300 μg/mL G418 塩酸塩 (Nacalai Tesque), 300 μg/mL Hygromycin (Thermo Fisher Scientific) を含む培養液で, WT-CFTR-CFBE41o- および F508-CFTR-CFBE41o- 細胞は 300 μg/mL Hygromycin を含む培養液で, それぞれ 1 週間以上の培養を行うことで, βγENaC もしくは WT-CFTR および F508-CFTR 過剰発現株の選別を行った。

NHBE および DHBE-CF 細胞の培養には, BEGM BulletKit (Takara) を用いた。

B) 機能不全気道上皮細胞を用いたトランスクリプトーム解析

GeneChip® Human transcriptome array (HTA) 2.0 による CF 気道上皮での転写産物の網羅的解析に際して, 健常人由来の気道上皮細胞 (16HBE14o-), CF 患者由来の CFTR 変異気道上皮細胞 (CFBE41o-), そして野生型 CFTR を安定的に発現する CFBE41o- (WT-CFTR-CFBE41o-) を検体として用いた。

C) RNA 発現解析

Total RNA の回収には RNAiso Plus® を用いた。マウス肺組織および培養細胞からの total RNA 回収の概要を以下に示す。まずマウス肺組織からの total RNA の回収は, マウスから右肺下葉部を摘出し, PBS を用いて洗浄した後, RNAlater® solution (Ambion) に浸漬し 4°C にて一晩転倒混和した。その後, RNAlater® solution を取り除き, RNAiso Plus® を加えた。マウス気道上皮細胞を含めた培養細胞においては, 種々の細胞を任意の割合で plate に播種後, コンフルエントに近い状態まで培養した細胞から培養液を除き, PBS にて細胞を 2 回洗浄した後, RNAiso Plus® を加えた。なお, 以下の操作は RNase の混入を防ぐために新しいゴム手袋を着用し, 専用の器具を用いて清潔な環境下で行った。その後, クロロホルムを回収に用いた RNAiso Plus® の 1/5 量加え, ボルテックスを 15 sec 行ってよく攪拌した。室温で 3 min 静置後, 遠心分離 (4 °C, 12,000 rpm, 15 min) し, 上清を別のチューブに移し, 同量のクロロホルムを加え攪拌後, 遠心分離 (4 °C, 12,000 rpm, 15 min), クロロホルム抽出を行った。その後, 再び上清を別のチューブに移し, 同量のイソプロパノールを加え転倒混和し, 10 min

静置したのちに遠心分離 (4 , 12,000 rpm , 15 min) し , イソプロパノール沈殿を行った . 得られたペレットを回収に用いた RNAiso Plus® と同量の 75 %エタノールで 2 回洗浄し , 風乾した後 , 20-30 μ L の DEPC 処理水で溶解した . RNA 回収後 , RNA 濃度を測定し , DNase をプロトコルに従って十分に処理 , 更にフェノール/クロロホルム抽出法 , エタノール沈殿法によって RNA のみを精製した . Total RNA の収量は GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech) , および Epoch™ Spectrophotometer (Bio-Tek) を用いて測定した . また , OD260/OD280 ratio が 1.8 以上であり , 高純度の RNA が得られていることを確認した .

RT 反応には , PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) kit (Takara) を用い , そのプロトコルに従った . 以下にその方法を略記する . 培養細胞から抽出した total RNA 0.0625 μ g/1 gene を鋳型とし , PrimeScript RTase , RNase Inhibitor , Random 6 mers , Oligo dT primer , 反応バッファーを全て含んだ 5 倍希釈濃度のプレミックス試薬を加え , 37 30 min , 85 10 sec , 4 for の条件で LifeECO Thermal Cycler™ (Bioer Technology) を用いて行った . その後 , PCR 反応は , RT 反応によって得られた cDNA と SYBR® Premix Ex Taq II (TAKARA) , 各遺伝子特異的 primer を用いて , 95 for 3 min , [95 for 10 sec , 65 for 1 min] ; 40 cycle , and plate read の条件で iCycler iQ5™ および CFX connect™ (Bio-Rad) を用いて行った . また , 細胞間での mRNA 発現量を比較する為の internal control としては ribosome RNA 18s を用いた . 相対的 mRNA 発現量は , $\Delta\Delta$ Ct 法により算出した . 本法は , 標的遺伝子の得られた CT 値を internal control の CT 値により正規化することで算出する方法である . PCR 反応におけるヒトおよびマウスの各標的遺伝子に対する primer の配列を Table 1 に示す .

Table.1 Primer sequences of human genes for quantitative RT-PCR.

Targeted genes	Primers	
	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
Human Inc-AC018816.3.1-7:1	TTTCTCCCTTCCCTTTCCAG	TGGATGGGTAAATGGAAGGATG
Human Inc-SLC01B3-1:1	TCATGGCTTTGGACGCGGA	CTCCAAACCAAGGAGAGTCC
Human Inc-SLC01B3-1:1	TCATGGCTTTGGACGCGGA	CTCCAAACCAAGGAGAGTCC
Human Inc-TAS2R1-24:1	CTCTCTGCAATGGAGTCAA	GTGATTCTCTTTCTCTTCCAG
Human Inc-TGFA-2:1	ACCTGGAGATGGGTGGTAG	GCTCAGGAAGTGGCTTTGGA
Human Inc-CSAG1-1:3	CAGCCGAACGAGGAACCTAA	GGCTGTCGAGAGGAGACTG
Human Inc-SOX4-2:1	GCACTAGGAGCTGCTCTT	ACACGGCATTGACAGGA
Human 18S	CGGCTACACATCAAGGAA	GCTGGCAATTACCGGCT

4 . 研究成果

(ア)機能不全気道上皮細胞を用いたトランスクリプトーム解析

解析の結果 , 16HBE14o- と比較して CFBE41o- では , 1062 遺伝子が発現上昇 (fold change (log2) \geq 1) し , 613 遺伝子が発現減少 (fold change (log2) \leq -1) していた . また同様に , WT-CFTR-CFBE41o- と CFBE41o-

を比較した際には , 8706 遺伝子が発現上昇 (fold change (log2) \geq 1) し , 125 遺伝子が発現減少 (fold change (log2) \leq -1) していた . 続いて , この 2 つの比較解析結果を用いて , 両者の比較で共通した発現変化パターンを示す遺伝子を抽出した . その結果 , 127 の coding 遺伝子と 125 の non-coding 遺伝子を併せた 252 遺伝子が共通して発現上昇し , 2 つの coding 遺伝子と 14 の non-coding 遺伝子を併せた 16 遺伝子が共通して発現減少していた . また , この共通して発現上昇した coding 遺伝子を用いて , G0 解析を行ったところ , 炎症応答や核酸代謝 , cAMP シグナル , 金属イオン輸送などに変化が生じていることが明らかになった . 以上より , CFTR 機能不全状態の気道上皮細胞では non-coding 遺伝子を含め , CF 病態に関連した数多くの遺伝子発現が変化することが示された .

(イ)CFTR 機能不全気道上皮細胞における lncRNA 発現解析

続いて , トランスクリプトーム解析内で大きく発現変動していた non-coding 遺伝子に着目した . 興味深いことに , 発現変化を示した non-coding 遺伝子の多くは , 過去に報告の無い機能未知な lncRNA が大部分を占めていた . そこで , これら lncRNA の発現が実際に , CFTR 機能不全に伴って発現変化を示すかを確認すべく , 健康人由来の 16HBE14o- , CF 患者由来の CFBE41o- , 野生型 CFTR をレスキューした WT-CFTR-CFBE41o- 加えて変異 CFTR を導入した F508-CFTR-CFBE41o- を用いて , 定量的 RT-PCR 法による lncRNA の発現解析を行った . その結果 , HTA2.0 において顕著な発現変化を示した 18 の lncRNA の内 , 6 つの lncRNA が CFTR 機能不全に相関して発現上昇することが示された .

(ウ)CF 患者由来の初代培養気道上皮細胞における lncRNA 発現解析

前項において , CFTR 機能に従って発現変化する lncRNA を同定したが , 実際にこれらの lncRNA は CF 患者の組織中においても発現変化を示すのだろうか . 健康人由来 , および CF 患者由来の初代培養気道上皮細胞 (NHBE , DHBE-CF) を用いて , 前項で発現変化を示した 6 つの lncRNA (Inc-AC018816.3.1-7:1 , Inc-SLC01B3-1:1 , Inc-TAS2R1-24:1 , Inc-TGFA-2:1 , Inc-CSAG1-1:3 , Inc-SOX4-2:1) の発現を , 定量的 RT-PCR 法によって解析した . その結果 , Inc-TAS2R1-24:1 を除く 5 つの lncRNA が , CF 細胞株の発現解析と同様に , CFTR 機能不全に伴い発現が上昇することが明らかになった .

以上より , CFTR 機能不全で発現が上昇し , 同時に CF 患者の気道上皮中でも発現が上昇する 5 種類の lncRNA を同定した .

(工) 総括および考察

本研究では,CF 気道上皮における遺伝子発現変化の包括的理解と,病態遺伝子の調節因子として lncRNA に着目し,CFTR 依存的に発現が変化する lncRNA の探索に取り組んだ。CFTR 機能不全の気道上皮細胞におけるトランスクリプトーム解析の結果,CFTR 機能に 관련된多くの遺伝子発現変化を確認すると共に,CFTR 機能不全依存的に発現上昇する機能未知な新規 lncRNA を同定した。これら lncRNA は,転写調節領域付近に,病態に関連する様々な因子を含むと同時に,機能が全く明らかでないことから,今後の機能解析によって病態との関連を明らかにすると共に,この発見が新規の病態標的因子として,CF や COPD の治療法開発の一助となることを願う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Shuto T, Kamei S, Nohara H, Fujikawa H, Tasaki Y, Sugahara T, Ono T, Matsumoto C, Sakaguchi Y, Maruta K, Nakashima R, Kawakami T, Suico MA, Kondo Y, Ishigami A, Takeo T, Tanaka KI, Watanabe H, Nakagata N, Uchimura K, Kitamura K, Li JD, Kai H. Pharmacological and genetic reappraisals of protease and oxidative stress pathways in a mouse model of obstructive lung diseases. *Sci Rep*.2016.6:39305, 査読有

Suico MA, Taura M, Kudo E, Gotoh K, Shuto T, Okada S, Kai H. The ETS Factor Myeloid E1f-1-Like Factor (MEF)/E1f4 Is Transcriptionally and Functionally Activated by Hypoxia. *Biol Pharm Bull*. 2016,39(4):641-7.doi: 10.1248/bpb.b15-00796, 査読有

Omachi K, Kamura M, Teramoto K, Kojima H, Yokota T, Kaseda S, Kuwazuru J, Fukuda R, Koyama K, Matsuyama S, Motomura K, Shuto T, Suico MA, Kai H. A split-luciferase-based trimer formation assay as a high-throughput screening platform for therapeutics in Alport syndrome, in press. *Cell Chem Biol*.2018.doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.003, 査読有

Kamei S, Fujikawa H, Nohara H, Ueno-Shuto K, Maruta K, Nakashima R, Kawakami T, Matsumoto C, Sakaguchi Y, Ono T, Suico MA, Boucher RC, Gruenert DC, Takeo T, Nakagata N, Li JD, Kai H, Shuto T. Zinc Deficiency via a Splice Switch in Zinc Importer ZIP2/SLC39A2 Causes

Cystic Fibrosis-Associated MUC5AC Hypersecretion in Airway Epithelial Cells. *EBioMedicine*. 2018 Jan;27:304-316. doi:

10.1016/j.ebiom.2017.12.025, 査読有
Shuto T, Kamei S, Nohara H, Fujikawa H, Tasaki Y, Sugahara T, Ono T, Matsumoto C, Sakaguchi Y, Maruta K, Nakashima R, Kawakami T, Suico MA, Kondo Y, Ishigami A, Takeo T, Tanaka KI, Watanabe H, Nakagata N, Uchimura K, Kitamura K, Li JD, Kai H. Pharmacological and genetic reappraisals of protease and oxidative stress pathways in a mouse model of obstructive lung diseases. *Sci Rep*. 2016, 6:39305. doi: 10.1038/srep39305, 査読有

Suico MA, Taura M, Kudo E, Gotoh K, Shuto T, Okada S, Kai H. The ETS Factor Myeloid E1f-1-Like Factor (MEF)/E1f4 Is Transcriptionally and Functionally Activated by Hypoxia. *Biol Pharm Bull*. 2016;39(4):641-7. doi: 10.1248/bpb.b15-00796, 査読有

[学会発表](計 12 件)

首藤 恵子, 亀井 竣輔, 内田 友二, 甲斐 広文, 徳富 直史, 首藤 剛. 嚢胞性纖維症気道上皮細胞における炎症抑制性 IL-37b-SIGIRR axis の破綻. 第 34 回日本薬学会九州支部大会. 2017.11.25-26. 崇城大学(熊本)

亀井 竣輔, 野原 寛文, 川上 太聖, 松本千鶴, 坂口 由起, 首藤 恵子, Mary Ann Suico, 甲斐 広文, 首藤 剛. 上皮型 Na⁺チャンネル過剰発現気道上皮細胞の分子生物学的表現型解析: 嚢胞性線維症・COPD のモデル細胞となりうるか? 第 12 回トランスポーター研究会年会. 2017.7.8-9. 東北大学 片平キャンパス さくらホール(仙台)

Kamei S, Maruta K, Nohara H, Fujikawa H, Nakashima R, Ueno-Shuto K, Tasaki Y, Suico MA, Gruenert DC, Kai H, Shuto T. LNC-SOX4-2:1 LINKS CFTR DYSREGULATION AND TLR2 UP-REGULATION IN AIRWAY EPITHELIAL CELLS. 31st Annual North American Cystic Fibrosis Conference. 2017.11.2-4. Indianapolis(USA)

首藤 剛, 亀井 竣輔, 首藤 恵子, Mary Ann Suico, 甲斐 広文. 気道上皮細胞における亜鉛取り込み輸送体 ZIP2 の新規スプライススイッチが閉塞製肺疾患の肺病態を調節する. 第 94 回日本生理学会大会. 2017.3.28-30. アクトシティ浜松(静岡)【招待講演】

丸田 かすみ, 亀井 竣輔, 野原 寛文,

藤川 春花, 中嶋 竜之介, 田崎 幸裕, 首藤 恵子, Mary Ann Suico, 甲斐 広文, 首藤 剛. 嚢胞性線維症の気道上皮細胞における lncRNA による自然免疫受容体 TLR2 の遺伝子発現制御. 第 90 回日本薬理学会年会. 2017.3.15-17.

丸田 かすみ, 亀井 竣輔, 野原 寛文, 藤川 春花, 田崎 幸裕, 首藤 恵子, Mary Ann Suico, 甲斐 広文, 首藤 剛. CFTR 機能破綻に伴い発現変動する lncRNA による炎症・自然免疫関連受容体 TLR2 の遺伝子発現制御. 第 33 回日本薬学会九州支部大会. 2016.12.3-4. 鹿児島大学 郡元キャンパス (鹿児島)

亀井 竣輔, 首藤 恵子, 藤川 春花, 丸田 かすみ, 野原 寛文, 中嶋 竜之介, 松本 千鶴, 坂口 由起, Mary Ann Suico, Dieter C.Gruenert, 甲斐 広文, 首藤 剛. A novel splicing switch of zinc importer ZIP2 in airway epithelial cells that controls the mucus hypersecretory and inflammatory phenotypes of obstructive lung diseases. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016.11.30-12.2. パシフィコ横浜 (神奈川)

首藤恵子, 亀井 竣輔, 内田 友二, 甲斐 広文, 徳富 直史, 首藤 剛. 嚢胞性線維症気道上皮細胞における炎症抑制性 IL-37b-SIGIRR axis の破綻. 第 69 回日本薬理学会西南部会. 2016.11.26. 松山大学 (愛媛)

首藤 剛. 疾患関連トランスポーター・チャネルの機能・局在調節とその破綻による病態発症機構の解明. 生体機能と創薬シンポジウム 2016. 2016.8.25-26. 東北大学 川内キャンパス (宮城)【招待講演】

首藤 剛. 閉塞性肺疾患における亜鉛トランスポーターの発現制御. 第 27 回日本微量元素学会学術集会. 2016.7.30-31. 京都大学医学部創立百周年記念施設 芝蘭会館 (京都)【招待講演】

丸田 かすみ, 亀井 竣輔, 首藤 剛, 野原 寛文, 藤川 春花, 中嶋 竜之介, 田崎 幸裕, 首藤 恵子, Mary Ann Suico, 甲斐 広文. 嚢胞性線維症の気道上皮における機能未知 lncRNA の発現変動. 第 11 回トランスポーター研究会年会. 2016.7.2-3. 京都大学宇治キャンパスきはだホール (京都)

Shuto T. Pharmacological and genetic approaches determine protease and oxidative stress as exacerbating factors in a mouse model of obstructive lung diseases. 3rd International Conference on Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2016. 2016.7.11-12. Brisbane(Australia) 【招待講演】

〔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 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://molmed730.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首藤 剛 (SHUTO, Tsuyoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬学系)・准教授

研究者番号 : 80333524

(2) 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

〔その他の研究協力者〕

()

〔図書〕(計 0 件)