

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15115

研究課題名(和文)長鎖非コードRNAによる腸管恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文)Maintenance of intestinal homeostasis by long non-coding RNA

研究代表者

千葉 朋希 (Chiba, Tomoki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00645830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年の大規模なトランスクリプトーム解析によりゲノムの多くの領域からたんぱく質をコードしないRNA(IncRNA)が転写されていることが明らかになってきた。これまでに炎症性サイトカインの発現を正に制御する新規IncRNAを同定し、LASCと名付けた。LASCはIL-6やGM-CSFといった炎症性サイトカインの発現を転写レベルで制御することを明らかにした。LASCノックアウトマウスは炎症性腸疾患に対して感受性を示し、粘膜固有層細胞においてIL-6などの炎症性サイトカインの発現が低下した。以上のことから、LASCが炎症性サイトカインの発現制御を介して腸管の恒常性維持に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトやマウスにおいて、タンパク質をコードしない非コードRNA(non-coding RNA)は20,000種類以上あると推定されている。その多くは機能を持たないRNAであると考えられているが、一部のRNAは生命機能に重要な役割を果たしている。新たに同定したLASCは炎症性サイトカインの発現に重要な長鎖非コードRNAであり、個体における炎症性疾患に重要な非コードRNAであることが示された。

研究成果の概要(英文)：Recent advantages of transcriptome analyses revealed that non-coding RNAs, especially long non-coding (lnc) RNAs, are transcribed across genome and involved in various aspects of biological processes. I have identified a novel lncRNA that positively regulates inflammatory cytokine expression and named it LASC. LASC is required for the expression of inflammatory cytokines such as IL-6 and GM-CSF. Recruitment of transcription factor NF- κ B was strongly reduced in LASC deficient cells, suggesting that LASC could regulate inflammatory cytokine expression at transcriptional level. LASC knockout mice are resistant to sepsis, but susceptible to inflammatory bowel disease. These results suggest that LASC is important for maintaining intestinal homeostasis through the regulation of inflammatory cytokine expression in mucosal cells.

研究分野：免疫学

キーワード：長鎖非コードRNA 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の GENCODE や FANTOM などのトランスクリプトーム解析によりタンパク質をコードする遺伝子がゲノム領域の 5% 未満にすぎないのに対して、ゲノムの非コード領域とされていた領域から 20,000 を超える RNA が転写されていることが明らかになり、それらの多くはタンパク質をコードしない non-coding RNA (非コード RNA) であると考えられ、non-coding RNA が生命現象や病態形成に大きな役割を担うことが強く示唆される。ncRNA はその転写産物の大きさから 200 塩基以下の small non-coding RNA と数百から数千塩基におよぶ long non-coding (lnc) RNA に分類される。炎症性サイトカインは炎症応答の中心を担うサイトカインであり、感染や組織修復に重要であるが、過度な炎症性サイトカインの産生は自己免疫疾患や炎症性疾患の発症はもとよりがんや生活習慣病などの様々な疾患につながると考えられている。lncRNA は転写レベルでの制御に関与することが報告されている。これまでの報告によると lncRNA はポリコムタンパク質複合体の構成因子である Ezh2 などと結合し、標的遺伝子のエピジェネティックな発現制御を介して ES 細胞の多能性の維持やがん細胞の浸潤能の獲得に寄与すると考えられている。近年、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析によりマクロファージや樹状細胞においても多くの lncRNA が発現していることが明らかになってきており、炎症性サイトカインの発現に関わるいくつかの lncRNA が報告された (Carpenter S. et al. 2012 Science, Krawczyk M. et al. 2014 eLife)。

これまでに炎症性サイトカインのエピジェネティックな制御を明らかにする過程において発現制御に関わる新規の lncRNA を同定し、LASC と名付けた。LASC は NF- κ B による転写制御を調節することで炎症性サイトカインの発現を正に制御することを見出した。

2. 研究の目的

長鎖非コード RNA (lncRNA) による制御が炎症性サイトカインの発現制御における新たな階層として注目されているが、その生理的意義は明らかではない。これまでに炎症性サイトカインの発現を転写レベルで制御する新規の lncRNA を同定し、LASC と名付けた。CRISPR/Cas9 により LASC ノックアウトマウスを作製し、生体内における炎症応答への寄与を検討した。敗血症モデルにおいて、LASC ノックアウトマウスは抵抗性を示した。一方で DSS 誘導性腸炎に対して感受性を示した。そこで本研究では LASC ノックアウトマウスにおける炎症性サイトカインの発現を解析するとともに、LASC による炎症性サイトカインの発現制御機構を解明するために LASC と相互作用するタンパク質の同定を Chromatin Isolation by RNA Purification (ChIRP) 法を用いて検証した。

3. 研究の方法

(1) デキストラン硫酸ナトリウム誘導性腸炎モデル

10 週齢の野生型 (WT) および LASC ノックアウト (KO) マウスに 3% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を飲料水として 7 日間与えた。その間の体重変化と死亡率を測定した。

(2) 粘膜固有層細胞における炎症性サイトカインの発現

WT および LASC KO マウスの大腸を取り出し、EDTA により intestinal intraepithelial T lymphocytes を除去した後に、コラゲナーゼ D により大腸組織を処理し粘膜固有層細胞を得た。粘膜固有層細胞から RNA を調整し、リアルタイム PCR を用いて IL-6 および GM-CSF の発現を定量した。

(3) Chromatin Isolation by RNA Purification (ChIRP) 法を用いた LASC 結合タンパク質の同定

非コード RNA はタンパク質と複合体を形成することでその機能を発揮すると考えられるため、LASC に結合するタンパク質を Chromatin Isolation by RNA Purification (ChIRP) 法を用いて同定を試みた。ChIRP 法は非コード RNA に相補的なビオチン化 DNA プローブを用いて RNA-タンパク質複合体をストレプトアビジンビーズによりプルダウンする方法であり、長鎖非コード RNA に結合するタンパク質の解析において有用な方法であることが報告されてきた (Ma et al. Mol Cell 2013)。LASC の 5' 側から 50 から 100 塩基の間隔おきに 20 個の LASC に相補的なビオチン化 DNA プローブを合成した (antisense-LASC probe #1-#20)。LPS で刺激したマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 をホルマリン固定し、細胞を溶解した後に奇数番号と偶数番号の 10 個ずつを混合した DNA プローブを混ぜ、37°C で 3 時間反応させた。ストレプトアビジンビーズを加えて複合体をプルダウンし、複合体を回収した。コントロールとして LacZ に対する DNA プローブを用いた。回収した複合体は質量分析により含まれるタンパク質の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) デキストラン硫酸ナトリウム誘導性腸炎モデル

野生型および LASC KO マウスに DSS を飲ませることで体重減少を認めた。WT マウスに比べて LASC KO マウスで大きな体重減少を示す傾向が見られた。LASC KO マウスは DSS 投与後 11 日目から死亡が認められ、13 日目までにすべてのマウスが死亡した (図 1)。以上のことから、LASC KO マウスは DSS 誘導性腸炎に対して感受性を示すことが明らかになった。

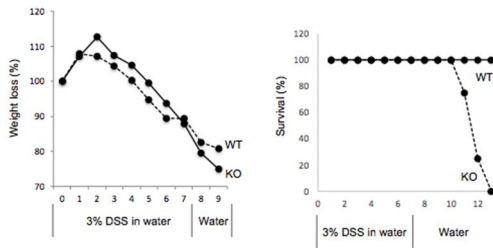


図 1 LASC ノックアウトマウスは DSS 誘導性腸炎に対して感受性を示す

(2) 粘膜固有層細胞における炎症性サイトカインの発現

腸管は腸内細菌と接することで常に一定レベルの炎症が起こっている。粘膜固有層細胞が産生する IL-6 や IL-23、TSLP などのサイトカインは腸管上皮細胞に対して増殖因子として働き、上皮細胞のリニューアルに関与することが示唆されている。LASC をノックダウンしたマウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞においてこれらサイトカインの発現をマイクロアレイで解析したところ、IL-6 や IL-23、TSLP の発現が低下していた (図 2)。

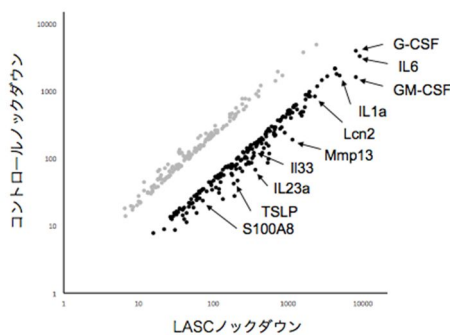


図 2 LASC ノックダウン細胞は種々のサイトカインの発現低下を示す

そこで、LASC KO マウスの粘膜固有層細胞における炎症性サイトカインの発現を定量 PCR を用いて解析した。その結果、粘膜固有層細胞において IL-6 の発現が低下していた (図 3)。

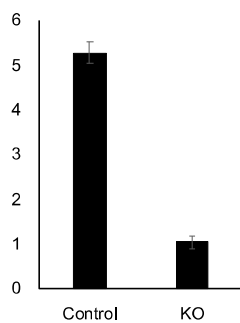


図 3 LASC ノックアウトマウス由来粘膜固有層細胞における IL-6 の発現

(3) Chromatin Isolation by RNA Purification (ChIRP)法を用いた LASC 結合タンパク質の同定

LASC に結合するタンパク質を同定するために ChIRP 法を用いて結合タンパク質の同定を行った。LASC 結合タンパク質の候補として複数の RNA 結合タンパク質が得られた。その内訳としては多くのヘテロ核リボヌクレオタンパク質 (hnRNP) ファミリーや RNA ヘリカーゼ、Zinc フィンガー

タンパク質などが同定された。その中でも RNA ヘリカーゼは LASC プローブを用いた時に特異的にプルダウンされることから、有力な候補であると考えられた(図4)。これまでの研究成果から LASC の作用機序として、LASC が NF- κ B による炎症性サイトカインに転写制御に関わることを明らかにしてきた。RNA ヘリカーゼは NF- κ B のコファクターとして機能し、炎症性サイトカインの発現制御に関わるということが報告されていることから LASC が RNA ヘリカーゼと複合体を形成して炎症性サイトカインの発現を転写レベルで制御することが示唆される。

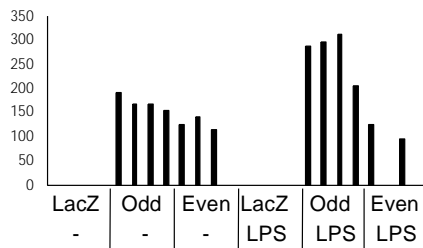


図3 LASC は RNA ヘリカーゼと複合体を形成する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Chiba Tomoki, Kurimoto Ryota, Matsushima Takahide, Ito Yoshiaki, Nakamichi Ryo, Lotz Martin, Asahara Hiroshi	4. 巻 2245
2. 論文標題 MicroRNA Expression Profiling, Target Identification, and Validation in	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 151 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1119-7_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uchida Yutaro, Matsushima Takahide, Kurimoto Ryota, Chiba Tomoki, Inutani Yuki, Asahara Hiroshi	4. 巻 595
2. 論文標題 Identification of chemical compounds regulating PD L1 by introducing HiBiT tagged cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 563 ~ 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kurimoto Ryota, Chiba Tomoki, Ito Yoshiaki, Matsushima Takahide, Yano Yuki, Miyata Kohei, Yashiro Yuka, Suzuki Tsutomu, Tomita Kozo, Asahara Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 The tRNA pseudouridine synthase TruB1 regulates the maturation of let 7 miRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020104708	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kataoka Kensuke, Kurimoto Ryota, Tsutsumi Hiroki, Chiba Tomoki, Kato Tomomi, Shishido Kana, Kato Mariko, Ito Yoshiaki, Cho Yuichiro, Hoshi Osamu, Mimata Ayako, Sakamaki Yuriko, Nakamichi Ryo, Lotz Martin K., Naruse Keiji, Asahara Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 In vitro Neo-Genesis of Tendon/Ligament-Like Tissue by Combination of Mohawk and a Three-Dimensional Cyclic Mechanical Stretch Culture System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yano Yuki, Chiba Tomoki, Asahara Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Analysis of the Mouse Y Chromosome by Single-Molecule Sequencing With Y Chromosome Enrichment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2020.00406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Isobe Momo, Toya Hikaru, Mito Mari, Chiba Tomoki, Asahara Hiroshi, Hirose Tetsuro, Nakagawa Shinichi	4. 巻 26
2. 論文標題 Forced isoform switching of Neat1_1 to Neat1_2 leads to the loss of Neat1_1 and the hyperformation of paraspeckles but does not affect the development and growth of mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 251 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.072587.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adriaens Carmen, Rambow Florian, Bervoets Greet, Silla Toomas, Mito Mari, Chiba Tomoki, Asahara Hiroshi, Hirose Tetsuro, Nakagawa Shinichi, Jensen Torben Heick, Marine Jean-Christophe	4. 巻 25
2. 論文標題 The long noncoding RNA NEAT1_1 is seemingly dispensable for normal tissue homeostasis and cancer cell growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1681 ~ 1695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.071456.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Uchida Yutaro, Chiba Tomoki, Kurimoto Ryota, Asahara Hiroshi	4. 巻 166
2. 論文標題 Post-transcriptional regulation of inflammation by RNA-binding proteins via cis-elements of mRNAs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 375 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsumura Takahiro, Ito Yoshiaki, Chiba Tomoki, Matsushima Takahide, Kurimoto Ryota, Tanaka Yoko, Kato Tomomi, Uchida Keisuke, Ito Takashi, Yamamoto Kouhei, Eishi Yoshinobu, Kitagawa Masanobu, Miyazaki Yasunari, Inase Naohiko, Asahara Hiroshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Ablation of miR-146b in mice causes hematopoietic malignancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 3483 ~ 3491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2018017954	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mochizuki Yusuke, Chiba Tomoki, Kataoka Kensuke, Yamashita Satoshi, Sato Tempei, Kato Tomomi, Takahashi Kenji, Miyamoto Takeshi, Kitazawa Masashi, Hatta Tomohisa, Natsume Tohru, Takai Shinro, Asahara Hiroshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Combinatorial CRISPR/Cas9 Approach to Elucidate a Far-Upstream Enhancer Complex for Tissue-Specific Sox9 Expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 794 ~ 806.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2018.07.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 千葉 朋希、寺尾 梨沙、浅原 弘嗣
2. 発表標題 鎖非コードRNAによる炎症性サイトカインの発現制御
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺尾 梨沙、千葉 朋希、小林 和弘、浅原 弘嗣
2. 発表標題 Long non-coding RNAによる炎症性サイトカインの発現制御
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉 朋希、寺尾 梨沙、浅原 弘嗣
2. 発表標題 長鎖非コードRNAによる炎症性サイトカインの発現制御
3. 学会等名 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉 朋希、浅原 弘嗣
2. 発表標題 長鎖非コードRNAによる炎症性サイトカインの発現制御
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺尾 梨沙、千葉 朋希、浅原 弘嗣
2. 発表標題 Long non-coding RNAによる炎症性サイトカインの発現制御
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田 雄太郎、千葉 朋希、矢野 雄暉、浅原 弘嗣
2. 発表標題 Escort1による炎症性サイトカインの転写後調節
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------