

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15395

研究課題名(和文)血小板と感染症を結びつけるmicroRNAの機能解明

研究課題名(英文)The rule of microRNA links between platelets and infection..disease

研究代表者

郡山 豊泰(Koriyama, Toyoyasu)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・臨床検査技師

研究者番号：60723616

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)：本申請では、細菌感染した免疫細胞からのmicroRNAが血小板へ与える細胞間コミュニケーションのツールとしてなり得るかを知る前段階として「レジオネラ菌感染がマクロファージに及ぼす形質変化の分子機序解明」を目的としin vitroで検討をおこなった。今回、新たな知見として申請者はL. pneumophila 感染によるマクロファージのサイトカイン産生の制御に、miR-218が関与すること、miR-218で発現が抑制されるRICTORの役割を初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はL. pneumophila 感染によるマクロファージのサイトカイン産生の制御に、miR-218が関与すること、miR-218で発現が抑制されるRICTORの役割を初めて明らかにした。これまでL. pneumophila 以外の細菌感染時における免疫応答でmiR-155やmiR-146が重要な役割を担うことが報告されているが、mTOR関連分子RICTORの細菌感染への役割については報告がない。増殖、生存シグナルを担うRICTORと感染症への関与の可能性を見出した点は興味深い

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to "elucidate of the molecular and functional mechanism of changes caused by Legionella infected macrophage cells".

First, we demonstrated whether microRNAs released from bacteria infected immune cells can serve as a tool for platelet-cell communication in vitro. Our study revealed the involvement of miR-218 in regulating the inflammatory response of macrophages against L. pneumophila infection. Further, we firstly revealed the role of RICTOR regulated by miR-218 expression.

研究分野：感染症学

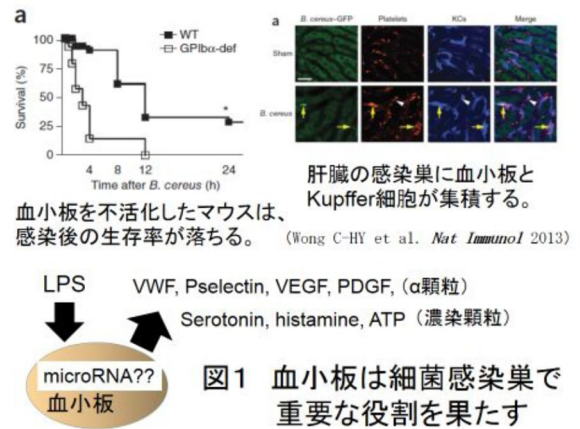
キーワード：microRNA マクロファージ RICTOR サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

[血小板と感染の関係] 図1

血小板は凝集の役割以外に、生体内の炎症や血管新生の場で重要な働きを持つことが明らかになってきた。例えば、右図1のように、血小板は障害された肝臓の再生、血管新生を促進する (Peterson JE et al. *Am J Hematol* 2010)。一方、細菌感染 (グラム陰性菌) があると、血小板の凝集反応は低下する (Ferkau A et al. *BMC Vct Res* 2013)。また、肝臓の細菌感染巣に血小板が集積し、肝臓のKupffer細胞の免疫応答に血小板の接着が必要であることが報告された (Wong C-HY et al. *Nat Immunol* 2013)。



[血小板のmicroRNA] 図2

非コードRNAのmicroRNAは1993年に線虫で発見されて以来、ヒトのあらゆる組織細胞に発現し、その各臓器で様々な生理的役割を持つこと、多くの疾患の発症と進展に関与することが証明された。右図2のように、血小板に高発現するmicroRNAの報告 (Edelstein LC et al. *Blood* 2011)、血小板内でmicroRNAがmRNAに結合して蛋白合成を抑えること (Landry P. et al. *Nat Struct Mol Biol* 2009) の報告から、血小板miRNAの機能が示唆されているが、microRNAによる血小板の機能変化の報告は極めて少ない。

	巨核球	血小板
1	miR-223	miR-223
2	miR-92	miR-26b
3	miR-16	miR-26a
4	miR-126	miR-23a
5	miR-142-3p	miR-126
6	miR-26a	miR-21
7	miR-565	let-7f
8	miR-484	miR-22
9	miR-486	miR-24
10	miR-222	miR-720

microRNAの頻度
Edelstein LC et al. *Blood* 2011
図2 血小板のmicroRNA

[血小板と炎症の分子生物学的知見]

LPS刺激で血小板内に存在する未熟なIL-1 mRNAのスプライシングが起こり、成熟したIL-1が生成される (Dennis MM et al. *Cell* 2005) こと、血小板の成熟過程で、IL-1 とIL-1 刺激でもオートクライン的に血小板は活性化される (Brown GT et al. *J Immunol* 2013) ことなどの事象は、血小板が細菌感染などの炎症変化を敏感に察知し機能的に反応していること、つまり、血小板は、遺伝子発現制御機構がないが、自身の持つシグナル伝達系を使って免疫応答していることが示唆される。また、miRNAの生合成が血小板内で起こり、miRNAの血小板機能を制御することが考えられる。

2. 研究の目的

まず細菌感染した免疫細胞からのmicroRNAが血小板へ与える細胞間コミュニケーションのツールとしてなり得るかを知る前段階として「レジオネラ菌感染がマクロファージに及ぼす形質変化の分子機序解明」を目的とした。本研究の最終目的は、血小板のmicroRNAが「感染制御」を調節しているという仮説を、分子学的手法を用いて検証することである。

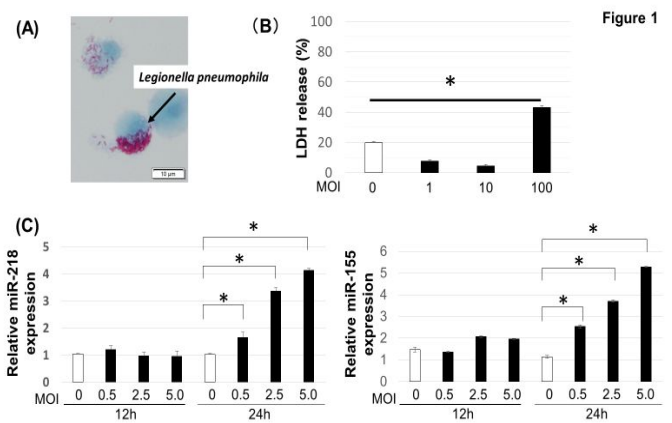
3. 研究の方法

培養細胞株は、ヒト単球系細胞株 (以下 U937 細胞) を使用した。実験には、10% FBS を含む PRMI-1640 で培養した U937 細胞に phorbol 12-myristate 13-acetate (以下 PMA) を添加し、さらに2日間培養 (37 °C、5%CO₂) し分化させたものを使用した。U937 細胞へのレジオネラ感染に

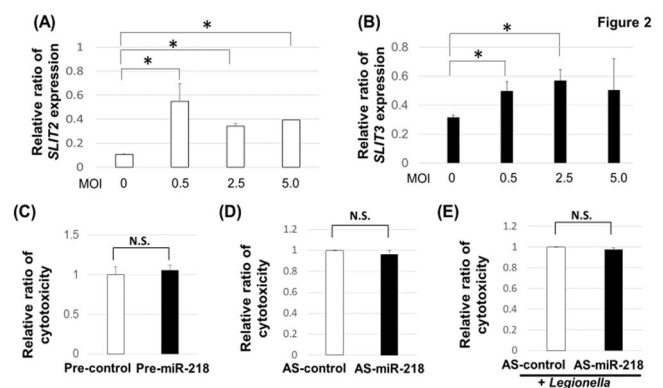
は、*L. pneumophila* 株 (ATCC33152) を WYO- 培地で 37 °C・2 日間培養したものを用いた。感染は、multiplicity of infection (MOI) = 0~100 の条件で行った。細胞毒性評価には、LDH cytotoxicity Detection Kit (Takara, Japan) を用いて培養上清中の LDH 濃度を測定した。RICTOR、AKT などの蛋白質の発現はウエスタンブロット法を、mRNA 及び miRNA の発現は各々の TaqMan primer (Applied Biosystems, USA) を用いてリアルタイム PCR (StepOne System, ThermoFisher Scientific, USA) で測定した。RICTOR のノックダウンおよび miR-218 の発現増強、減弱には、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, USA) と RICTOR silencing RNA および miR-218 mimics・miR-218 inhibitor を細胞内に導入し、細胞機能変化について解析した。

4. 研究成果

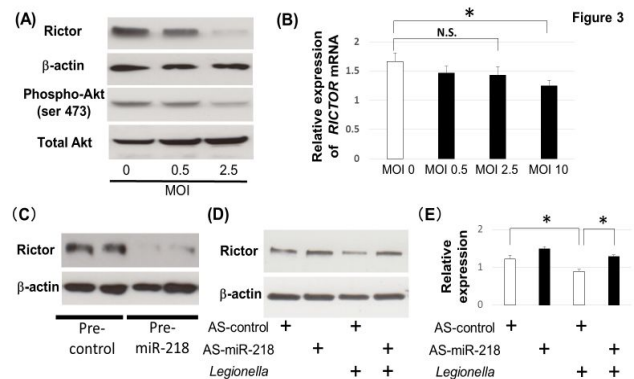
(1) U937 細胞に *L. pneumophila* を添加すると (MOI = 1)、U937 細胞の細胞質内への貪食が確認された (Figure 1 A)。*L. pneumophila* 感染細胞培養上清中の LDH は、MOI = 100 で増加したが、MOI < 10 では有意な変化はなく、MOI < 10 では *L. pneumophila* 感染による U937 細胞の細胞障害を認めなかった。従って、以後の解析は MOI < 10 で行った (Figure 1 B)。U937 細胞に *L. pneumophila* を添加 (MOI = 0~5) すると miR-218 を含む一連の miRNA 発現増強を認めた (Figure 1 C)。



(2) miR-218 は、*SLIT2* (*slit guidance ligand 2*) および *SLIT3* の 2 種類の宿主遺伝子のイントロンから産生 (各々 miR-218-1 と miR-218-2) されるが、*L. pneumophila* 感染 U937 細胞は *SLIT2* および *SLIT3* 遺伝子の両方の発現を増強した (Figure 2 A,B)。細胞内の miR-218 量を増強あるいは減弱させても、細胞毒性は見られなかった (Figure 2 C,E)。

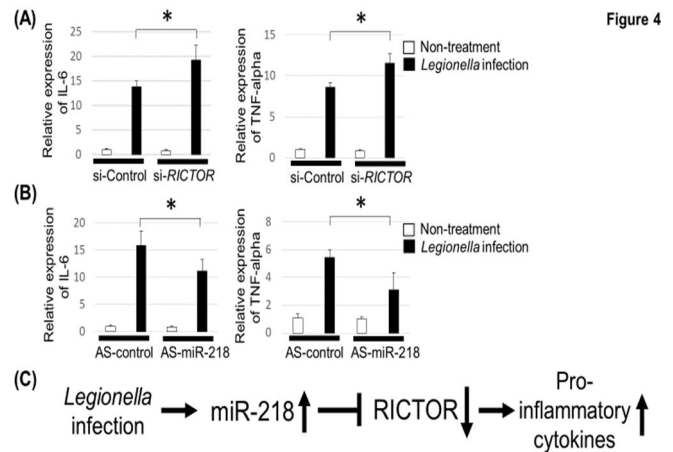


(3) 次に、miR-218 の標的遺伝子として、*RICTOR* 遺伝子に注目した。*RICTOR* は細胞の生存、増殖に重要な役割をもつ mTOR シグナルを担う分子の一つであり、活性化された *RICTOR* は下流の AKT をリン酸化することが知られている。U937 細胞に *L. pneumophila* を感染 (MOI = 0~2.5) させると、*RICTOR* 蛋白質の発現は濃度依存的に減少し、AKT のリン酸化 (serine 473) も抑制された (Figure 3 A)。しかし、*RICTOR* mRNA の発現は有意な変化を認めなかった (Figure 3 B)。このことは、*L. pneumophila* 感染による *RICTOR* 蛋白質の抑制は *RICTOR* mRNA 転写後の制御によることを示唆した。*RICTOR* mRNA の 3' 非翻訳領



域には、miR-218 の結合する配列が存在し、U937 細胞に miR-218 を強発現させると RICTOR の発現は抑制された(Figure3 C)。また、miR-218 をノックダウンした U937 細胞に *L. pneumophila* を感染させると RICTOR 蛋白質発現の低下は見られなかった(Figure3 D)。従って、*L. pneumophila* 感染による RICTOR の発現低下は、miR-218 を介すると考えられた。

(4) 最後に、miR-218 および RICTOR が U937 細胞の炎症性サイトカイン産生能に及ぼす影響を検討した。U937 細胞の RICTOR をノックダウンすると、*L. pneumophila* 感染による TNF- α と IL-6 の発現は増強した(Figure4 A)。また、miR-218 をノックダウンした U937 細胞に *L. pneumophila* を感染させると、これら炎症性サイトカインの産生は減少した(Figure4 B)。*L. pneumophila* 感染 U937 細胞の TNF- α と IL-6 の産生は、miR-218 と RICTOR を介していることが示唆された。



以上のことから、以下の3点が示唆された。(1) マクロファージ様 U937 細胞に *L. pneumophila* を感染させると、miR-218 の発現が増強する。(2) 細胞内で増加した miR-218 は RICTOR 蛋白質の発現を転写後抑制する。(3) RICTOR 発現低下は炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-6) の産生を増強する。

これらの研究結果は、Koriyama T, et al. *Bochem Biophys Res Commun.* 2019 より引用した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koriyama Toyoyasu, Yamakuchi Munekazu, Takenouchi Kazunori, Oyama Yoko, Takenaka Hiroyoshi, Nagakura Takumi, Masamoto Izumi, Hashiguchi Teruto	4. 巻 508
2. 論文標題 Legionella pneumophila infection-mediated regulation of RICTOR via miR-218 in U937 macrophage cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 608-613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.093	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 Imashioya T, Kodama Y, Ooka T, Nakagawa S, Nishikawa T, Tanabe T, Okamoto Y, Imuta N, Kirishima M, Tanimoto A, Koriyama T, Nishi J, Kawano Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Liver abscess due to Sterigmatomyces halophilus in a boy with acute lymphoblastic leukemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 1047-1049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2019.05.021	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 郡山豊泰, 山口宗一, 竹之内和則, 大山陽子, 政元いずみ, 橋口照人
2. 発表標題 ヒト巨核芽球細胞株における高血糖時のGLP-1受容体発現と機能の解析
3. 学会等名 第65回日本検査医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 郡山豊泰, 福山竜子, 舞木公子, 川畑恵, 政元いずみ, 蘭牟田直子, 川村英樹, 西順一郎, 橋口照人
2. 発表標題 耐性Acinetobacter属を目的とした環境培養時におけるCROMagarmSuperCARBA培地の性能評価
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----