

機関番号 : 10101

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21590961

研究課題名 (和文) 肺における細胞特異的エピジェネティクスへの挑戦

研究課題名 (英文) Challenges to cell specific epigenetics in the lungs

研究代表者

別役 智子 (BETSUYAKU TOMOKO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 60333605

研究成果の概要 (和文) :

細胞機能の変化は、いわゆるエピジェネティクスと呼ばれるDNAの翻訳後修飾によりもたらされている。H21年度は、喫煙曝露後とコントロールマウスとの間で細気管支上皮におけるmiRNAをマイクロアレイ上で網羅的にスクリーニングした。laser capture microdissection (LCM)法を用いて顕微鏡下に細気管支上皮細胞を選択的に採取した。mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion社)を用い、既存のバイオインフォーマティクスのデータベースの中に取り込んで解析を行った。

研究成果の概要 (英文) :

MicroRNAs (miRNAs) are a family of non-coding RNA molecules that post-transcriptionally regulate gene expression. It has recently been discovered that changes in expression of miRNAs are involved in development, carcinogenesis and inflammation. However, it is largely unknown how aging and smoking are associated with differential expression of miRNAs in the lungs. The main problem with analyzing miRNA expression in the lungs is the degree of cellular heterogeneity. The use of tissue homogenates inevitably results in average expression levels of all cells present in the lungs, thus potentially masking any differences in the expression of individual miRNAs within specific cell types. We therefore focused on the changes in miRNA expression in bronchiolar epithelium *in vivo*, since bronchiolar epithelium is an important site in the pathophysiology of COPD as well as in cigarette smoke (CS)-induced animal models of the disease. We demonstrated changes in miRNAs in mouse bronchiolar epithelium by age and CS exposure. We also found that the cessation of smoking differently affected the miRNA profiling by age.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：LCM, マウス, 喫煙, 細気管支上皮, miRNA

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性サイトカインの調節、DNA 修復、増殖といった様々な細胞機能の変化は、いわゆるエピジェネティクスと呼ばれる DNA の翻訳後修飾によりもたらされている。micro-RNA (miRNA) とは、細胞内に存在する高度に保存された長さ 20 から 25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA をいい、他の遺伝子の発現を調節する機能を有すると考えられている ncRNA (noncoding-RNA: タンパク質への翻訳はされない) の一種である。近年、miRNA が発生や細胞死、造血や神経経路形成といった種々の生物学的プロセスへの関与が報告され始めている。miRNA の標的遺伝子配列解析からは 2 次ターゲットも含めるとほぼすべての遺伝子発現が、miRNA を含む ncRNA によって制御される可能性がある。タンパク質をコードしている mRNA と同様に、miRNA の機能を理解する鍵は miRNA がいつどの細胞で発現しているのかを決定する事である。肺における miRNA に関する既存の報告はごく限られている。肺は 40 種類以上の細胞からなる複雑な臓器であり、肺全体を包括して miRNA のプロファイルを提示することは、細胞ごとに特異的な変化を見逃している可能性があることは容易に想像できる。細胞特異的な miRNA のプロファイルの作成が必要であり、様々な環境暴露が miRNA の誘導を解して遺伝子発現調節が行われる機序を探ることは、非常に意義深い。

### 2. 研究の目的

期間内に次の 4 つのプロジェクトを遂行する。**1)** 長期喫煙暴露後とコントロールマウスとの間で細気管支上皮における発現差がある miRNA をマイクロアレイ上で網羅的にスクリーニングする。その結果について miRNA 特異的プライマーを用いた RT-PCR、in situ hybridization にて検証する。**2)** 変化が検出された miRNA について、それぞれの標的 mRNA をデータベースより予測し、同細胞内での mRNA 発現変化との関連を検索する。**3)** その中で、いくつかの標的 miRNA; mRNA 関係に絞り、細気管支上皮培養細胞 (C22cell) を用いた in vitro の系にて、その機能的制御メカニズムを明らかにする。**4)** マウス長期喫煙モデルで変化が検出された miRNA についてヒト喫煙者、COPD 患者肺の細気管支上皮での検討を行う。

### 3. 研究の方法

C57BL/6 マウスに喫煙暴露モデルを作成する。laser capture microdissection (LCM) 法を用いて顕微鏡下に細気管支上皮細胞を選択的に採取する。長さ 200 塩基以下の RNA を濃縮した small RNA の画分として回収できるように開発された mirVana

miRNA Isolation Kit (Ambion 社) を用い、既存のバイオインフォーマティクスのデータベースの中に取り込んで解析を行う。得られるアレイの結果確認のための miRNA 発現解析を定量的 RT-PCR を用いて行う。一方、動物実験においては、長期喫煙暴露モデルに加え、老齢マウスに喫煙曝露を行い、加齢が及ぼす mRNA プロファイルへの変化を同時に検討する。

### 4. 研究成果

長期喫煙暴露モデルに加え、老齢マウスに喫煙曝露を行い、加齢が及ぼす mRNA プロファイルへの変化を同時に検討した。また、長期喫煙と加齢により変化する miRNA 群の中を絞り込み、ヒト喫煙者、COPD 患者でも同様の変化があることを確認した。さらに禁煙後にも変化が回復しない miRNA のうち 4 種に注目し、培養細胞を用いた in vitro での機能的解析を行った。特定の mRNA クラスターを修飾している可能性が示唆され、細胞生存、増殖に関与することが明らかとなった。一連の網羅的解析と機能解析の結果を合わせ論文執筆を完了し投稿準備中である。

### 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 11 件)

1. Odajima N, Betsuyaku T, Nagai K, Moriyama C, Wang DH, Takigawa T, Ogino K, Nishimura M: The role of catalase in pulmonary fibrosis, *Respir Res*, 11:183 (電子ジャーナル: ページ数表示なし) (2010) 査読あり

2. Deslee G, Adair-Kirk TL, Betsuyaku T, Woods JC, Moore CH, Gierada DS, Conradi SH, Atkinson JJ, Toennies HM, Battaile JT, Kobayashi DK, Patterson GA, Holtzman MJ, Pierce RA: Cigarette smoke induces nucleic acid oxidation in lung fibroblasts, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43(5):576-584 (2010) 査読あり

3. Odajima N, Betsuyaku T, Yoshida T, Hosokawa T, Nishimura M: High levels of extracellular matrix metalloproteinase inducer are expressed in lymphangioliomyomatosis, *Hum Pathol*, 41(7):935-943 (2010) 査読あり

4. Moriyama C, Betsuyaku T, Ito Y, Hamamura I, Hata J, Takahashi H, Nasuhara Y, Nishimura M: Aging enhances susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation through bronchiolar chemokines, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42(3):304-311 (2010) 査読あり

5. Katayama M, Ishizaka A, Sakamoto M, Fujishima S, Sekiguchi K, Asano K, Betsuyaku T, Kotani T, Ware LB, Matthay MA, Hashimoto S: Laminin gamma2 fragments are increased in the circulation of patients with early phase acute lung injury, *Intensive Care Med*, 36(3):479-486 (2010) 査読あり

6. Ito Y, Betsuyaku T, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M: Aging affects lipopolysaccharide-induced upregulation of heme oxygenase-1 in the lungs and alveolar macrophages, *Biogerontology*, 10(2):173-180 (2009) 査読あり

7. Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M: Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM, *Respir Med*, 103(1):124-129 (2009) 査読あり

8. Onodera J, Onodera S, Kondo E, Betsuyaku T, Yasuda K: A soluble factor (EMMPRIN) in exudates influences knee motion after total arthroplasty, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 17((3):298-304 (2009) 査読あり

9. Hasegawa M, Makita H, Nasuhara Y, Odajima N, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M: Relationship between improved airflow limitation and changes in airway caliber induced by inhaled anticholinergic agents in COPD, *Thorax*, 64(4):332-338 (2009) 査読あり

10. Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Odajima N, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M: Curcumin attenuates elastase- and cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296(4):614-623 (2009) 査読あり

11. Manicone AM, Birkland TP, Lin M, Betsuyaku T, van Rooijen N, Lohi J,

Keski-Oja J, Wang Y, Skerrett SJ, Parks WC: Epilysin (MMP-28) restrains early macrophage recruitment in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, *J Immunol*, 182(6):3866-3876 (2009) 査読あり

[学会発表] (計 12 件)

1. Betsuyaku T: Aging enhances susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation, The 9<sup>th</sup> World Congress on Inflammation Industry Sponsored Symposium 1, 2009. 7. 7, 東京: 京王プラザホテル東京

2. Hasegawa M, Nasuhara Y, Makita H, Odajima N, Nagai K, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M, Relationship between improved airflow limitation and changes in airway caliber induced by inhaled anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease, 第49回日本呼吸器学会, 2009. 6. 14, 東京: 東京国際フォーラム

3. Yoshida T, Betsuyaku T, Nagai K, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M: Kinetics of various oxidative stress markers in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in lipopolysaccharide (LPS) induced lung injury, 第49回日本呼吸器学会, 2009. 6. 13, 東京: 東京国際フォーラム

4. Inomata T, Betsuyaku T, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M: Catalase expression in pulmonary macrophages of smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, 第49回日本呼吸器学会, 2009. 6. 13, 東京: 東京国際フォーラム

5. 別役智子: 酸化ストレスによる肺病変としての気腫化と線維化, 第49回日本呼吸器学会, 2009. 6. 13, 東京: 東京国際フォーラム

6. 長井桂, 別役智子, 南須原康行, 近藤宇史, 西村正治: アレルギー性気道炎症モデルにおける気道被覆液中のグルタチオン化蛋白の検討, 第49回日本呼吸器学会, 2009. 6. 13, 東京: 東京国際フォーラム

7. 守山千夏, 別役智子, 伊藤洋子, 西村正治: 高齢マウス単回喫煙曝露モデルにおける細気管支上皮細胞での nuclear factor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) の活性化とケモカイン発現亢進, 第49回日本呼吸器学会, 2009. 6. 12, 東京: 東京国際フォーラム

8. Hersh CP, Betsuyaku T, Patel N, Marc hetti N, Klanderma n BJ, Criner G, Choi A: Alveolar - specific gene expression profiling in emphysematous lungs, The 105<sup>th</sup> American Thoracic Society International Conference, 2009.5.17, The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States

9. Inomata T, Betsuyaku T, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M: Catalase expression in pulmonary macrophages of smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, The 105<sup>th</sup> American Thoracic Society International Conference, 2009. 5. 17, The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States

10. Nagai K, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Kondo T, Nishimura M: Protein S-glutathionylation in the Epithelial Lining Fluid during Allergic Airway Inflammation, The 105<sup>th</sup> American Thoracic Society International Conference, 2009. 5. 17, The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States

11. Odajima N, Betsuyaku T, Inomata T, Yoshida T, Moriyama C, Suzuki K, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M: Duration of cigarette smoke (CS) exposure affects the resolution of lung inflammation after cessation in mice, The 105<sup>th</sup> American Thoracic Society International Conference, 2009. 5. 17, The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States

12. Yoshida T, Betsuyaku T, Nagai K, Ito Y, Nasuhara Y, Nishimura M: Kinetics of various oxidative stress markers in BAL fluid in lipopolysaccharide (LPS) - induced lung injury, The 105<sup>th</sup> American Thoracic Society International Conference, 2009. 5. 17, The San Diego Convention Center, San Diego, CA, United States

〔図書〕 (計 1 件)

1. 別役智子: 実験医学増刊 病態解明に迫る I. 活性酸素シグナルと酸化ストレス 癌, 神経変性疾患, 循環・代謝異常にかかわるレドックス制御機構と最新の技術開発, 羊土社(2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別役 智子 (BETSUYAKU TOMOKO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 60333605

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし