

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659172

研究課題名(和文)長鎖非翻訳RNAに注目したT細胞アナジー制御機構解析の新展開

研究課題名(英文)Contribution of long non-coding RNA in the regulation of T cell anergy

研究代表者

香城 諭 (Kojo, Satoshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号：70360542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞のアナジー化は、炎症反応の制御機構の一つとして極めて重要である。しかし、その制御に関する細胞内分子機構については未だ詳細が明らかとなっていない。本研究では、長鎖非翻訳RNAに注目し、アナジー制御におけるその役割を明らかにすることを目的とし検討を加える。

DNAマイクロアレイ解析および定量PCR解析の結果、イオノマイシン刺激によって特異的に上昇するlncRNAを27種類同定した。しかしながら、選択した3 lncRNAを対象としたshRNAによる検証において、lncRNAによるアナジー状態の制御は現在のところ関与が認められていない。

研究成果の概要(英文)：Anergy induction in Th cells is quite important for the regulation of inflammatory response. However, molecular mechanisms in the induction of anergy phenotype is remain unclear. I tried to clarify the contribution of long non-coding RNA (lncRNA) in the regulation of anergy induction in Th1 cells.

After DNA microarray and realtime PCR analysis, 27 lncRNAs that specifically upregulated by ionomycin stimulation, were identified. However, in the shRNA-mediated knockdown analysis against the selected three lncRNAs, no lncRNA contribution was observed in the regulation of anergy induction in Th1 cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：長鎖非翻訳RNA アナジー Th1

1. 研究開始当初の背景

炎症反応の収束に寄与する生体システムとして、T細胞のアナジー化誘導機構が存在する。T細胞のアナジー化については古くより解析が試みられているが、アナジー化を支持する細胞内分子機構については解析が進んでいない。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、T細胞およびiNKT細胞におけるアナジー化現象に着目し、様々な疾患制御にアナジー化が寄与することを示してきた。また近年では、アナジー化を制御する細胞内分子機構の解明に着手してきている。

申請者は現在、アナジー化制御における mRNA 型長鎖非翻訳 RNA (long non-coding RNA: lncRNA) の役割について注目している。生体内には膨大な量の lncRNA が存在しそのほとんどの lncRNA の機能は不明であるが、近年では細胞内シグナル制御やクロマチン制御等相次いでその機能が報告されてきている。本研究は、これらの lncRNA のうち、明確にプロモーターに制御される mRNA 型 lncRNA 群に着目し、アナジー制御におけるその役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アナジーの誘導

Th1細胞を利用し、イオノマイシン刺激によってアナジーを誘導する。アナジー化の指標は、増殖抑制、サイトカイン産生抑制、

アナジー制御因子 Cbl-b の発現増強にてモニタリングする。

(2) アナジー誘導に伴う lncRNA の発現変動

アナジー誘導時に lncRNA の発現が変動するとの報告はない。まず、変動の有無が存在するか否かを検証するため、プロモーター部に NFAT 結合配列を保有する lncRNA を抽出し、

アナジー誘導に伴う発現変化をリアルタイム PCR にて確認する。

(3) アナジー誘導サンプルにおける DNA マイクロアレイ解析

アナジーを誘導した細胞より RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析によって発現が変動する lncRNA を確認する。特に経時的な変化を捉えるため、経時的なサンプリングを実施する。イオノマイシン刺激によってのみ変動する lncRNA を抽出するため、PMA 刺激によって変動した lncRNA を除外する。

(4) shRNA による lncRNA ノックダウン

大きな発現変動が認められた lncRNA を対象とし、shRNA によるノックダウンを試みた。shRNA ノックダウン後にアナジーを誘導し、アナジー状況に変化が認められるか否かを検証した。

4. 研究成果

(1) アナジーの誘導

イオノマイシンを用い、Th1細胞に対してアナジーを誘導した結果、IFN- γ の産生抑制および Cbl-b の発現を伴うアナジーの誘導が確認された (図1)。

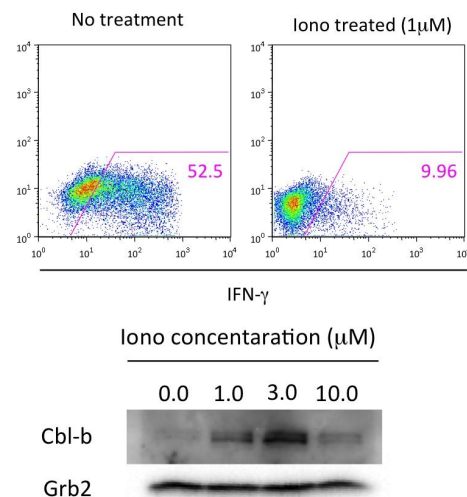


図1.イオノマイシン刺激によるTh1細胞アナジー誘導

(2) アナジー誘導に伴う lncRNA の発現変動
 変動の可否を確認するため、24 種類の lncRNA についてアナジー誘導前後の発現確認をリアルタイム PCR にて実施した。5 種類の lncRNA についてイオノマイシン刺激によるアナジー誘導時の発現上昇を認め、lncRNA はアナジー誘導時に発現が変動するものであることが確認された (図 2)。

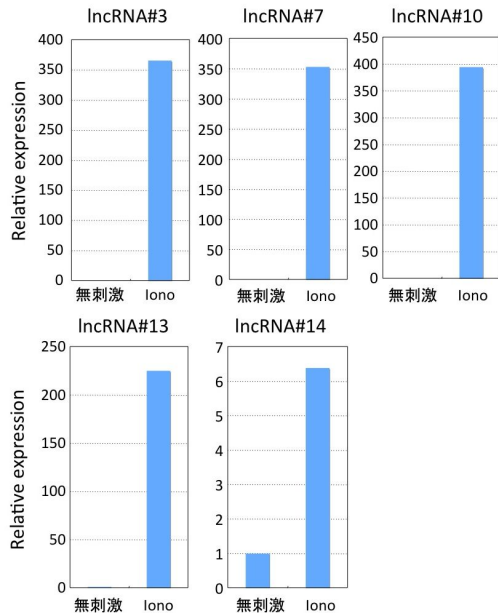


図2.イオノマイシン刺激によるlncRNAの変動

(3)DNA マイクロアレイによる、アナジー誘導サンプルにおける lncRNA 発現変動確認

DNA マイクロアレイ解析の結果、経時的な発現パターンは5パターンに分類可能であった。図3には、その代表例を示す。このよう

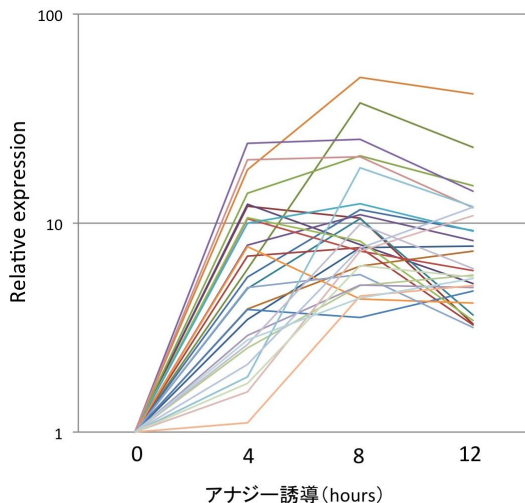


図3.網羅的lncRNA発現変動解析(DNAマイクロアレイ)

に見出された変動 lncRNA について、PMA 刺激による変動の可否を検証し、イオノマイシン刺激特異的に変動する lncRNA を 27 種類同定した。

(4)shRNA による lncRNA ノックダウンおよびアナジー誘導状況の変化

レンチウイルスを用いた Th1 細胞への shRNA 導入系を構築した。アナジーに伴う発現変動を示した lncRNA のうち、発現変動の大きな 3 lncRNA を対象に shRNA 導入ベクターを構築し、ノックダウン実験を実施した。その結果、shRNA によるアナジー状況の変化は見出せず、少なくとも今回対象とした 3 lncRNA はアナジー制御に寄与しないと考えられた。対象範囲の拡大が必要と考えている。

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)

Haruka Wada, Satoshi Kojō, Ken-ichiro Seino. Mouse model of human INAD by Pla2g6 deficiency. *Histol.Histopathol.* 査読有, 28 巻, 2013, 965-969

[学会発表](計 1件)

Satoshi Kojō, Hiroyuki Yamanaka, Masaru Taniguchi, Ken-ichiro Seino. Transcriptional regulator bHLHe40 works as a cofactor of T-bet in the regulation of iNKT cell IFN- γ production. The 42nd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. December 11-13, Makuhari Messe, Chiba, JAPAN.

[図書](計 1件)

香城 諭、清野研一郎、谷口 克. iNKT

細胞と自己免疫疾患 . EXPERT 膠原病・リ
ウマチ 改訂第3版 .2013 ,405 ページ(う
ち分担執筆 7 ページ pp12-18) 診断と治
療社

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

研究者番号 :

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

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/Immunobiology-Web/Home.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

香城 諭 (KOJO, Satoshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号 : 70360524

(2)研究分担者

()