

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670381

研究課題名(和文)慢性炎症における非翻訳RNAによるマクロファージダイナミクス制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of noncoding RNAs that regulate macrophage dynamics in chronic inflammation

研究代表者

眞鍋 一郎 (MANABE, Ichiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70359628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは心血管病の慢性炎症プロセスの進展に中心的な役割を果たす。本研究計画では、慢性炎症においてマクロファージを制御するncRNAを同定し、その機能を解析することを目的として検討を進めた。その結果、これまで報告されていない長鎖非コードRNA(lncRNA)を1000種以上同定した。また、多くのlncRNAがPU.1に結合することを見いだした。特に2種のlncRNAについて、マクロファージのLPS刺激における応答を制御することを見いだした。これらのlncRNAはin vivoにおいても、傷害刺激によって発現が誘導されることから、病態におけるマクロファージ機能を制御している可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are the key effector cells in chronic inflammatory processes in cardiovascular disease. They alter their phenotypes and functions during the processes. This study aimed to identify the noncoding RNAs that control dynamic changes in macrophage functions. We identified more than 1,000 novel long noncoding RNAs (lncRNAs) expressed in macrophages. We also found that some of them bind to the PU.1 transcriptional regulatory complexes. Among them two lncRNAs are induced by LPS in cultured macrophages. They are also induced by tissue injury in macrophages in vivo settings. Knocking down the lncRNAs altered the response of macrophages to LPS, suggesting they control macrophage functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：非翻訳RNA マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症が生活習慣病に共通した基盤病態として注目されている。我々はメタボリックシンドローム (Diabetes 2007, J Clin Invest 2008, Nat Med 2009)、心肥大・心不全 (J Clin Invest 2010)、動脈硬化 (Circulation 2010)、慢性腎臓病 (J Clin Invest 2011)、2型糖尿病 (Cell Metab 2012) において、慢性炎症プロセスによる病態形成機構を明らかにするとともに、マクロファージが極めて多機能なエフェクター細胞として中心的な役割を果たすことを見いだした。マクロファージの機能や形質は、時間的・空間的に極めてダイナミックに変化する。例えば、腎臓において最初に集まる M1 マクロファージは炎症や組織破壊を進めるが、遅れて集まる M2 マクロファージは線維化を進めるとともに、炎症を収束させる (図 1)。このよ

形質の変化 (M1/M2 等) に伴う発現変化の解析を行う。同定された ncRNA のうち、機能的に重要なものを絞り込むために、② RIP-seq (RNA 免疫沈降産物のシーケンシング) による解析を行う。その上で、③ 同定された miRNA、lncRNA への介入によりマクロファージ機能と形質の制御における役割を明らかにする。さらに、④ 心血管病における意義を明らかにするために、心臓・血管に存在するマクロファージでの ncRNA の発現を解析する。

3. 研究の方法

① グローバルな ncRNA の同定とマクロファージ形質変化に伴う発現変化の解析

RNA-seq (次世代シーケンサーによる RNA のグローバル解析) により、マクロファ

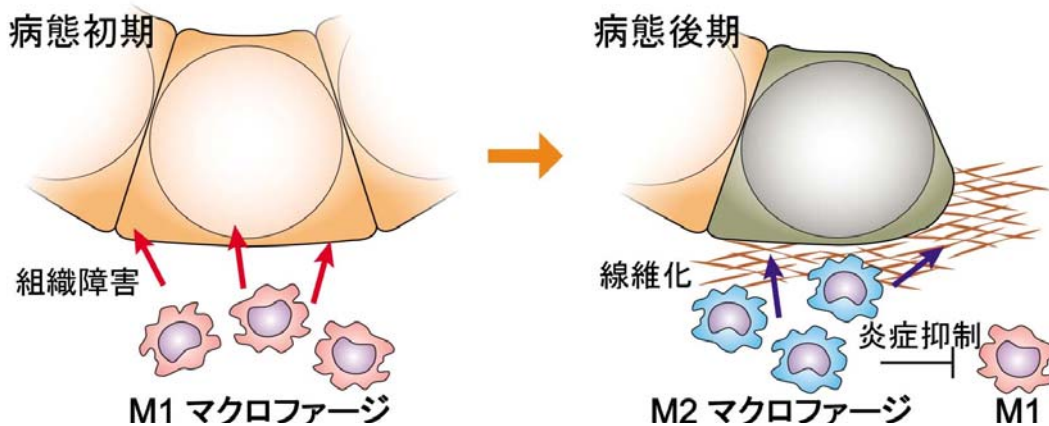


図 1 腎障害・線維化におけるマクロファージダイナミクス

うなマクロファージのダイナミズムを制御する分子機構の解明は心血管病形成機構の理解をもたらすだけでなく、新規治療法開発にも発展すると考えられる。

次世代シーケンス技術の進歩により、多数の非翻訳 RNA (noncoding RNA [ncRNA]) が発現していることが明らかとなっている。中でも短い RNA である microRNA (miRNA) については細胞分化等を制御することが明らかとなっている。一方、より長い (200 nt 以上) の ncRNA (long ncRNA [lncRNA]) については、まだその研究は端緒にすぎたばかりであり、機能はほとんど分かっていない。そこで、本研究課題では、マクロファージの時間・空間・機能的なダイナミズムを制御する ncRNA を同定するとともに、疾患における意義を検討する。

2. 研究の目的

本研究では、心血管病態プロセスにおいて主要な役割を果たすエフェクター細胞であるマクロファージについて、ncRNA によるダイナミックな機能と形質変化の制御機構を明らかにすることを目的とした。そのために以下の項目を進めた。① RNA-seq によるグローバルな ncRNA の同定とマクロファージ

の刺激応答 (M1/M2 活性化、収束形質) に伴いダイナミックに発現変動する ncRNA を同定する。LPS 刺激後 48 時間までの時間経過を追って発現解析を進め、炎症急性期と慢性期に機能する ncRNA の同定を進める。また、IL-4 刺激が一部の M2 マクロファージ遺伝子発現を誘導することも知られている。そこで、IL-4 刺激に応答する ncRNA についても解析を進める。

② RIP-seq による機能性 miRNA、lncRNA の絞り込み

マクロファージの刺激によって非常に多数の lncRNA、miRNA の発現が変動することから、今後の機能解析のためには、さらに ncRNA の絞り込みが必要となる。そこで、RIP-seq (免疫沈降産物中の RNA のシーケンシング) による解析を行う。miRNA については、Argonaut 2 (AGO2) の RIP-seq を行う。AGO2 は miRNA が標的 mRNA に結合して作用する際に蛋白複合体の中心となる。

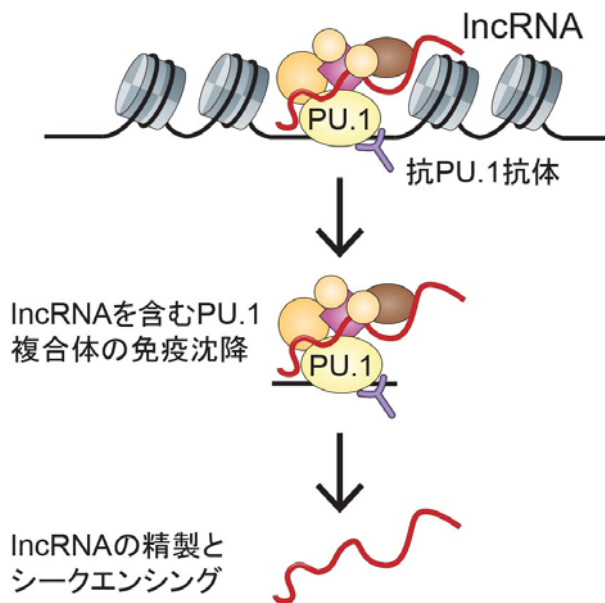


図 2 RIP-seq による PU.1 に結合する lncRNA の同定

つまり AGO2 を含む複合体には miRNA とその標的 mRNA の両方が含まれる。そこで、AGO2 を免疫沈降し、その複合体の中に含まれる miRNA 及び mRNA をシーケンシングする。これにより miRNA とその標的 mRNA の組み合わせをグローバルに同定する。

一方、lncRNA については、マクロファージのマスター転写因子である PU.1 に結合し、PU.1 転写複合体のプラットフォームになっている lncRNA を同定することを旨とする。そのため、PU.1 複合体中の RNA 免疫沈降し、RNA-seq にて解析する (RIP-seq、図 2)。

③マクロファージ活性化における miRNA、lncRNA の機能解析

機能的に重要と考えられる miRNA 及び lncRNA の候補について、miRNA は anti-miR 及び miRNA mimic、lncRNA については shRNA 及びアンチセンスオリゴ DNA を用いて介入を行い、機能を解析する。培養マクロファージの刺激系を用いてその機能解析を行う。

④in vivo における意義の解析

in vivo においても機能的に重要な ncRNA を同定することを目標とし、①項と同様のグローバル解析を心血管系の組織に存在するマクロファージで行う。特に、正常心

臓と、圧負荷によって肥大した心臓等について検討する。このデータと①から③項の解析結果を合わせることにより、in vivo において重要と考えられる ncRNA の絞り込みを進める。

4. 研究成果

マクロファージに発現する長鎖非コード RNA (lncRNA) と microRNA を RNA-seq 及び、microRNA array によって多数同定した。特に lncRNA については、1000 種以上の未知 lncRNA を同定した。lncRNA の発現はコード RNA の発現より細胞特異性が高く、また、核に局在するものが比較的多かった。さらに LPS への応答性を示す lncRNA を多数同定した。

lncRNA については、さらに PU.1 の RIP-seq により、PU.1 を含む転写複合体と結合する lncRNA を同定した。このうち特に 2 種類の lncRNA について、LPS へ応答し、マクロファージ遺伝子の発現を制御することを見いだした。これらの lncRNA は心臓や腎臓の傷害モデルで発現が誘導されており、in vivo においても重要な機能を持つことが考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①中山 幸輝、眞鍋 一郎、砂河 孝行、森岡 勝樹、永井 良三、小室 一成
炎症性マクロファージにおける長鎖ノンコーディング RNA の役割
第 36 回日本分子生物学会年会
2013 年 12 月 3-6 日
神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/manabe/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞鍋 一郎 (MANABE, Ichiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70359628

(3) 連携研究者

藤生 克仁 (FUJII, Katsuhito)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30422306

松本 佐保姫 (MATSUMOTO, Sahohime)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：80570184