

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860307

研究課題名(和文)長鎖ノンコーディングRNAの炎症応答における意義の解明

研究課題名(英文)Role of long non-coding RNA in regulation of inflammatory cytokine expression

## 研究代表者

千葉 朋希(Chiba, Tomoki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・特任研究員

研究者番号：00645830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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蛋白質をコードしないRNA(IncRNA)が転写されていることが明らかになってきた。本研究では炎症性サイトカインの発現制御に関わる新規IncRNAを同定し、その分子機構の解明を目指した。IncRNAはIL-6やGM-CSFといった炎症性サイトカインの発現誘導にきわめて重要であり、細胞質に局在することでNF-kappaB非依存的な炎症性サイトカインの発現制御に関与する可能性が強く示唆された。さらに、IncRNAの生理的な意義を明らかにするためにIncRNA遺伝子改変マウスの作製に成功した。

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 identified novel lncRNA that is essential for inflammatory cytokine expression. IL-6 and GM-CSF expression was severely reduced by lncRNA silencing upon LPS stimulation. lncRNA was mainly localized in cytoplasm and did not influence NF-kappaB activation. Further, to understand physiological roles, lncRNA transgenic and knockout mice were successfully generated by transposon and CRISPR/Cas9 system, respectively.

研究分野：免疫学

キーワード：非コードRNA 炎症性サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

近年の大規模な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2%にすぎないのに対して、RNAは約50%の領域から転写されていることが明らかになり、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。small non-coding RNAの代表格であるマイクロRNA(miRNA)は約20塩基からなるRNAであり、タンパク質をコードするmRNAの3' UTRに結合し、転写後調節または翻訳レベルに作用し、タンパク質をしての発現を抑制する。miRNAの発現異常は関節リウマチや全身性エリテマトーデスをはじめとする炎症性自己免疫疾患の制御において重要な役割を果たすことが明らかになっている。一方で、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。しかし、炎症応答や免疫応答に関与するlncRNAはほとんど明らかになっていない。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いるが、その機能に関する知見は皆無である。研究代表者は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、炎症性サイトカインの発現をポジティブに制御することを見出した。

### 2. 研究の目的

そこで本研究は新規に同定したlncRNAによる炎症性サイトカインの発現制御メカニズムの解明とその破綻による炎症疾患の病態形成への寄与を個体レベルで検討する。具体的にはlncRNAによる転写調節機構をエピジェネティックな視点より明らかにする。lncRNAの遺伝子改変マウスを作製し、炎症モデル実験により生体内における意義を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) lncRNAによる炎症性サイトカインの発現制御

はじめにlncRNAの発現細胞やその発現の時間軸を明らかにするためにマウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7、J774.1またはマウス骨髄由来マクロファージをLPSや非メチル化CpG、polyI:CなどのToll-like receptorリガンドや炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ やTNF $\alpha$ 、C-type レクチンリガンド

であるCurdlanで刺激し、lncRNAの発現を解析した。次にRAW264.7細胞にレトロウイルスベクターを用いてlncRNAを標的としたshRNAを安定的に導入し、ノックダウン細胞株(lncRNA KD)を得た。この細胞をLPSで刺激し、mRNAの発現を定量PCRおよびマイクロアレイにより解析した。

ついでlncRNA KD細胞におけるNF- $\kappa$ Bの活性化をコントロールおよびlncRNAのノックダウンRAW264.7細胞をLPS刺激し、経時的に細胞質分画および核分画を抗I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体、抗RelA抗体、抗p50抗体によりI $\kappa$ B $\alpha$ の分解速度およびNF- $\kappa$ B分子の核移行を検討した。また、炎症性サイトカインの発現に必須なco-activatorであるI $\kappa$ B $\zeta$ および転写因子C/EBP $\delta$ の発現をウェスタンブロットングまたは定量PCRで解析した。さらにRNAポリメラーゼIIおよび基本転写因子の炎症性サイトカインの転写開始点への動員を抗RNAポリメラーゼII抗体、抗TFIIB抗体を用いたクロマチン免疫沈降により解析した。細胞内におけるlncRNAの局在を明らかにするためにLPSで経時的に刺激したRAW264.7細胞をDIGラベルしたlncRNA相補的なRNAプローブを用いたRNA in situ hybridizationにより解析した。

### (2) lncRNA 遺伝子改変マウスの作製

lncRNA トランスジェニックマウスをメダカ由来のトランスポゾンを用いた方法を用いて作製した。lncRNA cDNAをEF1aプロモーター下に連結し、その両端にトランスポゾン認識配列を付加したプラスミドを作製した。トランスポゾン mRNAと上記のプラスミドをB6マウス受精卵にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを得た。lncRNA ノックアウトマウスの作製のためにCRISPR/Cas9を用いてポリA付加シグナルのノックインマウスを作製した。Cas9 mRNA、sgRNAおよびlncRNAの第2エクソンの5'側にポリAシグナルを導入した一本鎖DNAをB6マウス受精卵にマイクロインジェクションし、ポリA鎖付加シグナル配列のノックインマウスを得た。

### 4. 研究成果

(1) lncRNAによる炎症性サイトカインの発現制御

lncRNAはToll-like receptor 4のリガンドであるLPSで刺激したマクロファージ細胞種において広く発現が確認された。しかし、その発現レベルは刺激したりガンド間で大きく異なっておりLPSや非メチル化CpG刺激で強く誘導されるのに対して、polyI:Cや炎症性サイトカイン、Curdlanなどの刺激ではあまり誘導されないことが明らかになった。lncRNA KD RAW264.7細胞をLPSで刺激し炎症性サイトカインの発現を定量PCRで解析したところIL-6やGM-CSFの発現が強く抑制されていた(図1)。これらのサイトカインはタ

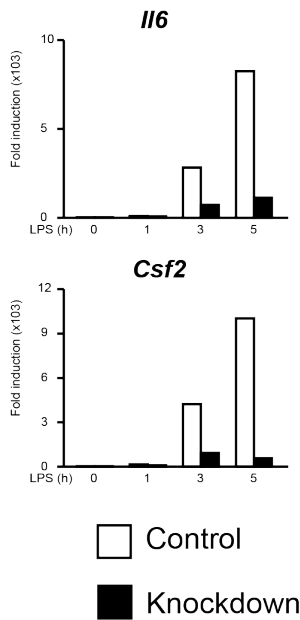


図1 . IncRNA のノックダウンによる IL-6 および GM-CSF mRNA の発現低下

ンパク質レベルにおける発現も顕著に減少していた(図2)。また、マイクロアレイ解析から IncRNA のノックダウンにより100以上の遺伝子が強く抑制されることが明らかになった。その遺伝子の Gene Ontology を解析するとその多くが炎症のプロセスに関わる遺伝子であった。興味深いことにこれらの遺伝子の多くが secondary response gene (SRG) と呼ばれるクロマチンリモデリング依存的な発現様式が特徴的な遺伝子であることを明らかになった。

これら炎症性メディエーターの活性化において NF- $\kappa$ B の活性化が重要であるため、NF- $\kappa$ B の活性化を I $\kappa$ B $\alpha$  の分解および NF- $\kappa$ B ファミリー分子の核移行により検証したところコントロールと比べて I $\kappa$ B $\alpha$  の分解速度や NF- $\kappa$ B ファミリーの RelA や p50 タンパク質の核移行に差は認められなかった。SRG の転写活性化において必須である I $\kappa$ B $\zeta$  や C/EBP $\delta$  の発現をウェスタンブロットングおよび定量 PCR で検証したところこれらの発現にも差は認められなかった。

つぎに、炎症性サイトカインの発現低下が転写レベルにおいて抑制されているか否かを IncRNA KD RAW264.7 細胞をもちいてクロマチン免疫沈降により検証した。RNA ポリメラーゼ II や基本転写因子である TFIIIB の転写開始点近傍への動員は顕著に減少していることから炎症性サイトカインの発現を NF- $\kappa$ B 非依存的に転写レベルで制御することが示唆された(図3)。RNA Fluorescence in situ hybridization により IncRNA の局在を解析したところその多くは細胞質に存在することが明らかになった(図3)。以上のことから炎症性サイトカインの発現制御にお

いて、この IncRNA は細胞質における炎症性サイトカインの発現活性化機構を制御することが示唆された。

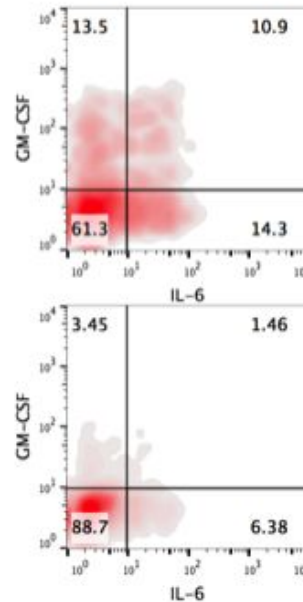


図2 . IncRNA のノックダウンによる IL-6 および GM-CSF タンパク質の産生低下

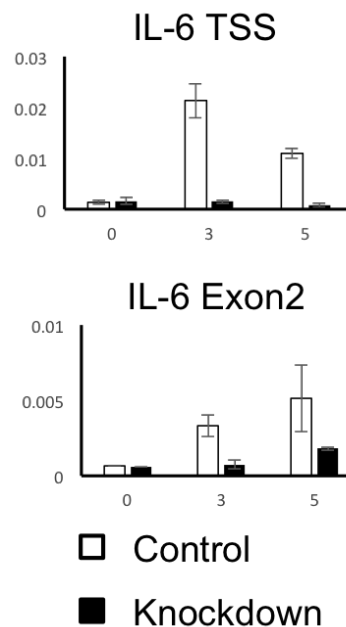
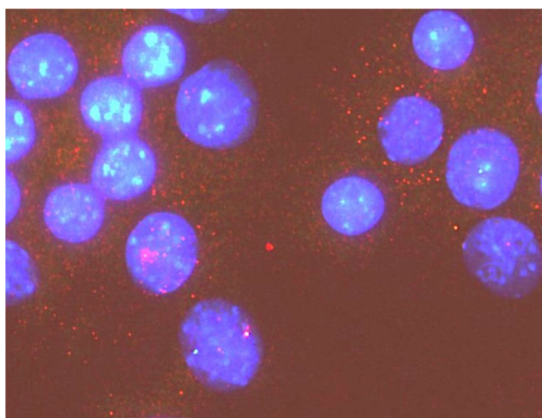


図3 . RNA ポリメラーゼ II の転写開始点近傍への動員

図3 . lncRNA の細胞内における局在



(赤 : lncRNA、青 : 核)

#### (2) lncRNA 遺伝子改変マウスの作製

In vivo における意義を明らかにするために lncRNA トランスジェニックマウスの作製に成功した。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いて lncRNA の Exon 領域にポリ A シグナルをノックインしたマウスの作製にも成功した。これらマウスを用いた lncRNA の役割の検討を進めている。

#### 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 2件)

Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into IL2RG locus  
Yohei Matsubara\*, Tomoki Chiba\*, Kenichi Kashimada, Tomohiro Morio, Shuji Takada, Shuki Mizutani & Hiroshi Asahara  
Scientific Reports 4 : 5043 (2014) DOI: 10.1038/srep05043 査読あり

TALEN-mediated gene disruption on Y Chromosome reveals Critical Role of EIF2S3Y in Mouse Spermatogenesis  
Yohei Matsubara, Tomoko Kato, Kenichi Kashimada, Hiromitsu Tanaka, Zhou Zhi, Shizuko Ichinose, Shuki Mizutani, Tomohiro Morio, Tomoki Chiba, Yoshiaki Ito, Yumiko Saga, Shuji Takada, and Hiroshi Asahara  
Stem Cells and Development 24, 1164-1170 (2015) DOI:10.1089/scd.2014.0466 査読あり

[その他]

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/grad/syst/asahsyst/index.html>

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

千葉 朋希 (Tomoki Chiba)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任研究員

研究者番号 : 00645830

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

浅原 弘嗣 (Hiroshi Asahara)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号 : 70294460

加藤 知美 (Tomomi Kato)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・技術補佐員