

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860544

研究課題名(和文)炎症性マクロファージにおける機能的lncRNAの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and mechanical analysis of the functional lncRNA in pro-inflammatory macrophages

研究代表者

中山 幸輝 (Nakayama, Yukiteru)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70721885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病や動脈硬化においてマクロファージはダイナミックにその機能を変動させ主要な役割を果たす。このようなマクロファージのダイナミズムを制御する分子機序は未知の部分も多い。今回lncFA0と名付けた長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA) lncRNAがマクロファージの炎症性サイトカインの発現制御に関わっていることを見出した。lncRNAは蛋白に翻訳されず、RNA自体の立体構造をもって機能を持つ。lncFA0がマクロファージの細胞代謝酵素と結合して細胞機能を調節することを示した。これにより、慢性炎症における新たな制御機構が同定され、今後の治療に向けての新たな標的領域を開拓したと考える。

研究成果の概要(英文)：Macrophages play pivotal roles in metabolic syndrome and atherosclerosis, fluctuating the function dynamically. The molecular mechanism of the regulation remains to be completely elucidated. In this study I identified a functional long noncoding RNA (lncRNA), named lncFA0, which is implicated in regulation of pro-inflammatory cytokine expression in macrophages. Functional lncRNAs have function via their own steric structure by themselves. I revealed that lncFA0 regulates macrophage phenotypes by binding with lipid metabolic enzyme. I think that this study showed a novel mechanism which regulate macrophage in chronic inflammatory diseases, and pave a pathway to identifications of new therapeutic targets.

研究分野：循環器内科

キーワード：マクロファージ ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の共通した基盤病態として慢性炎症が注目を集めている。その中心的役割を担うマクロファージは、組織中で炎症応答の時間的経過によって炎症促進性から抑制性のもので広範な表現型を示し、ダイナミックにその機能を変動させ多様な役割を果たす。ただし、そのダイナミズムを制御する分子機序は主要転写因子による発現調節のみでは説明できず、未だに不明な点が多く残されている。その機能を解明することは慢性炎症疾患の理解と、新たな治療標的の同定につながると考えられる。

シーケンス技術の目覚ましい進歩とともに蛋白をコードしない RNA が数多く発現することが明らかとなった。中でも、200 塩基以上の長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) が細胞機能を制御することが分かってきた。lncRNA は蛋白に翻訳されずに RNA 自体が機能を保有し、細胞分化等を制御することが報告されているが、その機能の理解は極めて限られている。lncRNA の発現は組織特異性、細胞特異性が高いことが示されており、機能的 lncRNA は細胞特異的な反応を制御すると考えられる。そこで、lncRNA が炎症性マクロファージ機能のダイナミックな制御を担うと考え、その分子機序の解析を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究では、lncRNA が環境に応じたマクロファージの活性の制御やサイトカイン発現を制御するという仮説を検討し、マクロファージダイナミズムの新たな制御機構を明らかにする事を目的として検討を進める事とした。まずはマウスのマクロファージの実験系として確立されている骨髄由来マクロファージを用いて機能的 lncRNA の同定と機能解析を行う事とした。さらには実際に *in vivo* において機能性を評価するためノックアウトマウスを作製して各種炎症モデルにおける機能解析を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) マクロファージの *in vitro* モデルによる機能的 lncRNA のスクリーニング

マウスの初代培養マクロファージを使用して、転写産物を次世代シーケンサーで網羅的に解析した。LPS (リポポリサッカライド) 刺激を行った炎症性マクロファージのモデルにおいて発現の時間的推移を解析することとした。これによりこれまで同定されていない 4,589 個の遺伝子領域で RNA が発現していることが分かった。これらの lncRNA の多くが、LPS 刺激依存的にダイナミックな発現変化を示すことを見出した。さらに lncRNA の発現はきわめて細胞特異性・刺激特異性が高い事が分かった。つまり、lncRNA は、蛋白をコードする RNA と比較してよりマクロファージに特異性が高く、また、マクロファージ

の活性や形質の変化とともに極めて鋭敏にその発現が変動した。このことから、lncRNA がマクロファージの機能をダイナミックに制御しているのではないかと考えた。

LPS により誘導される炎症機能を制御する lncRNA を同定するために、刺激後に大きく発現が変化する lncRNA に注目した。これらを siRNA や shRNA で発現抑制した時の、炎症性サイトカインの発現変化をもって機能的 lncRNA のスクリーニングを行った。

(2) *in vivo* モデルにおける lncRNA の発現とノックアウトマウスによる介入試験

マウスの疾患モデルを用いて *in vivo* の炎症性マクロファージでも上記機能的 lncRNA が発現することを確かめた。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトマウスを作製して、各種対照実験によりこの lncRNA が炎症の寄与する病態形成に關与することを明らかにした。

4. 研究成果

(1) 機能的 lncRNA (LncFA0) が Il1a, Il1b の発現を抑制する

マウスの骨髄由来マクロファージにおいて、LPS 刺激で大きく発現が誘導される lncRNA の中で高発現のものから siRNA によるノックダウンを行った。これによって炎症性サイトカインの変化が見られるかというスクリーニングを行った。すると、ノックダウンによって Il1a, Il1b の発現が増加する lncRNA を同定した。この LncFA0 と名付けた lncRNA は、LPS 刺激によって遅発性に誘導され、この lncRNA を発現抑制した上で網羅的発現解析を行うと特に *Il1* 関連遺伝子の発現が増加していた。また、LncFA0 の発現抑制により Il1a, Il1b の蛋白量も増加することが ELISA で示された。一方で過剰発現させると *Il1a, Il1b* の発現量が低下しており、LncFA0 が *Il1a, Il1b* の発現に抑制的作用を持つことが分かった。

(2) LncFA0 は脂肪酸代謝酵素と結合する

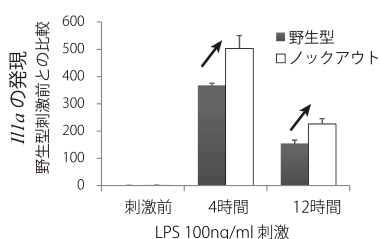
LncFA0 はマクロファージの細胞質優位に存在した。そこで、マクロファージの細胞質蛋白の抽出液と、*in vitro* transcription によりビオチン化した LncFA0 を共免疫沈降して得られた蛋白を質量分析によって同定した。すると、脂肪酸酸化の最終代謝酵素である Hadhb が同定され、ウェスタンブロットでも結合が示された。LncFA0 は Hadhb と結合してマクロファージの細胞代謝を調節することで細胞機能を変化させることが分かった。

(3) ノックアウトマウスがエンドトキシンショックモデルで早期に死亡する

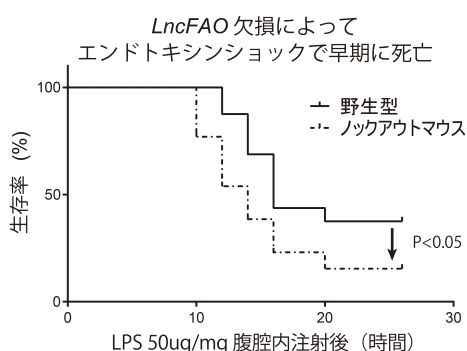
in vivo における機能解析のため、CRISPR/Cas9 システムを用いて LncFA0 の転写開始領域の塩基を脱落させたノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスの骨

髓由来マクロファージでは、発現抑制の時と同様、下図のように *Il1* 関連遺伝子の発現が上昇するとともに *Il6* などの炎症性サイトカインの発現も上昇していた。

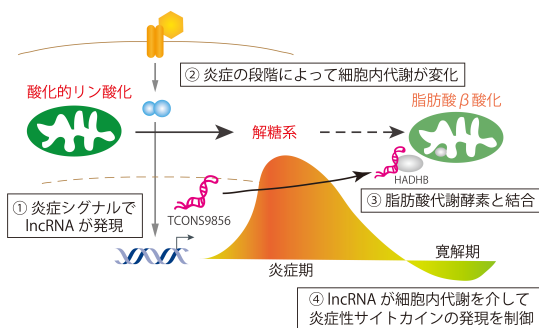
LncFAO ノックアウトマウスの骨髄マクロファージで *Il1a* の発現量が増加



そこで一般的に炎症モデルとして汎用されるエンドトキシンショックモデルで検討することとした。LPS を腹腔注射して野生型とノックアウトマウスで比較を行った。した図のようにノックアウトマウス群で早期に、かつ高い死亡率を示した。低用量 LPS の腹腔注射でも血中の炎症性サイトカイン濃度 (*Il1a*, *Il6*) が上昇しており、LncFAO が *in vivo* においても炎症遺伝子の発現を調節することが示された。



マクロファージは炎症消退期に細胞代謝を解糖系から脂肪酸代謝に変えるとされている。以上の結果から、LncFAO が炎症性マクロファージの細胞代謝の変化を介して炎症性サイトカインの発現調節に関与することが分かった。マクロファージにおいて lncRNA による新たな分子機構が存在することを示した。



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)

[学会発表](計 7 件)

中山幸輝 心臓組織マクロファージの心機能に与える影響と長鎖ノンコーディング RNA による機能制御の解明 第 3 回東京未来フォーラム (2016 年 2 月 5 日東京)

Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Ryoza Komuro, Issei Nagai, Functional Long Noncoding RNAs Regulating Pro-inflammatory Macrophages 第 38 回分子生物学会年会 (2015 年 12 月 2 日 神戸)

Yukiteru Nakayama, Ichiro Manabe, Katsuhito Fujiu, Ryoza Komuro, Issei Nagai, Functional Long Noncoding RNAs Regulating Pro-inflammatory Macrophages がん免疫療法・マクロファージ国際学会 2015 (2015 年 7 月 4 日 東京)

Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Ryoza Komuro, Issei Nagai, Functional Long Noncoding RNAs Regulating Pro-inflammatory Macrophages 第 1 回 HAKATA Cardiovascular conference (2015 年 5 月 29 日 福岡)

Yukiteru Nakayama, Katsuhito Fujiu, Ichiro Manabe, Ryoza Komuro, Issei Nagai, Functional Long Noncoding RNAs Regulating Pro-inflammatory Macrophages 第 79 回日本循環器学会学術集会 (2015 年 4 月 21 日 大阪)

中山幸輝, 藤生克仁, 眞鍋一郎, 永井良三, 小室一成 炎症性マクロファージを制御する長鎖ノンコーディング RNA の役割 第 52 回 日本臨床分子医学会学術集会 (2015 年 4 月 10 日 京都)

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で発現する長鎖ノンコーディング RNA の役割 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 26 日 横浜)

[図書](計 1 件)

中山幸輝 病的な心肥大に保護的作用を持つ新規の長鎖ノンコーディング RNA Cardio-Renal Diabetes 4(3):2-4, 2015

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 幸輝 (NAKAYAMA, Yukiteru)
東京大学医学部附属病院循環器内科 助教
研究者番号：70721885

(2) 研究分担者

眞鍋 一郎 (MANABE, Ichiro)
千葉大学大学院医学研究院長寿医学講座
教授
研究者番号：70359628

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

小室 一成 (KOMURO, Issei)
東京大学大学院医学系研究科器官病態内
科学講座循環器内科学 教授
研究者番号：30260483