

200822019A

厚生労働科学研究費補助金

子ども家庭総合研究事業

成育疾患における診断技術、治療法開発を目的とした  
ポストゲノムプラットフォームの構築と応用  
—小児リウマチ性疾患、自己免疫疾患におけるマイクロ  
RNA の機能解析と診断、治療への応用—

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浅原弘嗣

平成21(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金

子ども家庭総合研究事業

成育疾患における診断技術、治療法開発を目的とした  
ポストゲノムプラットフォームの構築と応用  
ー小児リウマチ性疾患、自己免疫疾患におけるマイクロ  
RNA の機能解析と診断、治療への応用ー

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浅原弘嗣

平成21（2009）年3月

## 目次

I. 総括研究報告	
1. マイクロ RNA の診断、治療応用への解析 .....	1
浅原 弘嗣	
II. 分担研究報告	
1. 小児及び成人のリウマチ性疾患・自己免疫疾患に特異的に発現上昇するマイクロ RNA の同定 .....	5
柳谷隆宏、吉鷹輝仁、関敦仁、小林信一、川合眞一、蓮沼智子、横田俊平	
2. リウマチ性疾患・自己免疫性疾患特異的なマイクロ RNA の標的遺伝子の同定と機能解析 .....	11
柳谷隆宏、吉鷹輝仁、佐藤可野、井上敦	
3. 関節疾患病態モデル、自己免疫疾患モデルマウスを用いたマイクロ RNA の阻害核酸の治療効果の検討 .....	19
柳谷隆宏、吉鷹輝仁、佐藤可野、井上敦	
4. 蛍光 DNA プローブを利用した疾患特異的マイクロ RNA 検出法の開発 .....	23
加藤義雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	35

# I. 統括研究報告書

「マイクロ RNA の診断、治療応用への解析」に関する研究

研究代表者 浅原弘嗣 国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部部長

研究要旨

若年性特発性関節炎を含む小児リウマチ性疾患・自己免疫疾患は、自己組織の慢性炎症や破壊を伴う重篤な全身性疾患であるが、その病因は完全には明らかにされていない。小児におけるリウマチ性関節破壊は、一生、患者の QOL を制限し苦痛を与えることがあるため、早期診断法の確立が必須である。また、現在の生物製剤治療では治癒できない症例も多く、新しい治療法の開発が急務とされる。近年、我々は、新しい機能遺伝子であるマイクロ RNA に注目して、リウマチ性関節炎において複数のマイクロ RNA が特異的に発現上昇していることを見出している。本研究では、小児を中心としたリウマチ性疾患・自己免疫疾患において特異的な発現を示すマイクロ RNA と疾患発症との関係を明らかにして、マイクロ RNA をターゲットとした新規治療法を開発するとともに、早期診断におけるマーカーとして応用することを試みる。

研究分担者

川合眞一 東邦大学医療センター大森病院  
膠原病科 教授  
蓮沼智子 北里大学臨床薬理研究所  
医学管理部 部長  
関 敦仁 国立成育医療センター第二専門  
診療部整形外科 医長  
小林信一 国立成育医療センター第一専門  
診療部膠原病・感染症科 医員  
柳谷隆宏 国立成育医療センター研究所  
移植・外科研究部 研究員  
加藤義雄 産業技術総合研究所セルエンジ  
ニアリング研究部門 研究員  
吉鷹輝仁 国立成育医療センター研究所  
移植・外科研究部 研究員  
佐藤可野 国立成育医療センター研究所  
移植・外科研究部 研究員

研究協力者

横田俊平 横浜市立大学医学部小児科  
教授  
井上 敦 国立成育医療センター研究所  
共同研究員

A. 研究目的

小児リウマチ性疾患・自己免疫疾患は根本的治療のない難病が多く、心身の成長発達の妨げとなるケースや、闘病生活が生涯に及び得ることを考えると、成人以上に早期診断法の確立と積極的かつ副作用の少ない治療法の開発が望まれる。また成人期においても妊娠可能年齢の女性に頻度が高いことから、母体・胎児双方への影響の抑止が喫緊の課題となっている。

私たちは最近、新しい機能遺伝子であるマイクロ RNA に着目し、リウマチ関節炎の滑膜組織において数種類のマイクロ RNA が特異的に上昇していることを明らかにした。そこで、本研究では、小児を中心に若年性特発性関節炎(JIA)をはじめとするリウマチ性疾患・自己免疫疾患における特異的マイクロ RNA を探索・同定して、早期診断を含めた新しい診断法への応用を検討する。上記の解析結果に基づき、治療ターゲットになり得るマイクロ RNA を絞り込み、それらに対する阻害剤としてアンチセンス核酸をデザインしたり、過剰発現

モデルとしてアデノウイルスベクターを構築して、リウマチ・自己免疫疾患モデルマウスに局所/全身投与することによってその効果を検討する。このような核酸（遺伝子）治療は従来の生物製剤などに比べると比較的安価であり、かつターゲットに特異的なものを作ることが可能である。

**血液検体の収集** リウマチ性疾患・自己免疫性疾患患者の血液サンプルおよび健常なボランティアから採取した血液サンプルを収集した。リウマチ性疾患・自己免疫性疾患患者の血液サンプルは、東邦大学医療センター大森病院膠原病科に来院した外来患者に対して、研究内容の十分な説明を行い、同意の得られた患者について次回来院時に採血を行った。健常なボランティアからの採血についても、北里大学臨床薬理研究所に来院した女性のボランティアに対して十分な研究内容・目的の説明を行った上で、同意を得られたボランティアから採血を行った。採血量は、リウマチ性疾患・自己免疫性疾患患者群および健常なボランティア群ともに5mlとした。採血した血液サンプルは、採血当日のうちに国立成育医療センター研究所移植・外科研究部に輸送した。輸送に関しては、民間の輸送会社に依頼をして、東邦大学医療センター大森病院から国立成育医療センター研究所までの区間と、北里大学臨床薬理研究所から国立成育医療センター研究所までの区間をバイク便にて輸送した。輸送時には、血液サンプルが入った採血管の紛失や破損、急激な温度上昇に細心の注意を払った。なお、本研究については、国立成育医療センター、東邦大学および北里大学の倫理委員会において厳重な審査受け、倫理委員会の承認ならびに機関の長（総長）の許可を得て、全ての研究を適正に遂行した。

**血液検体の処理** 国立成育医療センター研究所において受け取った血液サンプルは、移植・外科研究部内にて末梢血リンパ球の分離作業を行った。まず、5mlの全血に対して等量の balanced salt solution (0.01%

anhydrous D-glucose, 0.005uM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.098uM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.54uM KCL, 0.0145 Tris-HCl pH7.6, 0.126M NaCl)を加え転倒混和して希釈血液サンプルを調整した。15ml 遠心管に 4.5ml の Ficoll-Plaque PLUS (GE Healthcare)を入れたのち、希釈血液サンプルを 5ml 重層して、400 x g で 30 分間遠心した（密度勾配遠心）。遠心後、単核球画分（PBMC 画分）をピペットを用いて回収し、ここに 3 倍量の balanced salt solution を加えて転倒混和した。100 x g で 10 分間の遠心操作ののち、上清を除去してペレットを得た。同様の操作をもう一度繰り返したのち、PBMC を得た。この PBMC のペレットに 1ml の PBS(-)を加えて細胞懸濁液を調整した。この細胞懸濁液のうち、200ul を細胞株樹立のため、セルバンカーで混和して-80℃で保存した。また、細胞懸濁液のうちの 300ul については、ゲノム抽出のために、RLT plus buffer で溶解して-80℃で保存した。残った細胞懸濁液は再度遠心操作（200 x g, 5 分間）を行い、細胞をペレットにした後、50ul の PBS-BSA に懸濁した。この懸濁液に、CD4 および CD8 に対する抗体を金属ビーズで標識した particle を添加して室温で 30 分間反応させた。PBS-BSA によって洗浄のための混和作業を行い、マグネットを用いてビーズと反応した細胞を固定した状態で洗浄液を別の試験管に移した。ここで得られた固定された細胞画分を T 細胞画分とした。T 細胞画分は 1ml の PBS-BSA に懸濁したのち、一部を total RNA の抽出用サンプルとして扱った。残りについては、1 細胞レベルでの遺伝子発現解析用サンプルとし、顕微鏡下にてマウスピペットを用いて 1 細胞ずつ拾い上げた。各細胞は 0.2ml の PCR 用チューブに移したのち、4ul の細胞溶解液を添加してから-80℃にて保存した。一方、T 細胞画分を分離する際に保存していた洗浄液中には B 細胞が含まれていることから、CD19 に対する抗体を金属ビーズで標識した particle を用いた B 細胞画

分の分離用サンプルとして扱い、T細胞画分の分離と同様の方法でB細胞画分を得た。B細胞画分についても、一部の細胞はtotal RNA抽出用サンプルとし、残りについては、1細胞レベルでの遺伝子発現解析用サンプルとした。なお、1血液サンプルあたりT細胞を8個、B細胞も8個、拾い上げた。

### C. 研究結果

平成21年3月25日現在、東邦大学医療センター大森病院膠原病科にて収集された検体数は401検体にのぼり、その内訳は、関節リウマチ(188検体)、全身性エリテマトーデス(57検体)、強皮症(44検体)、シェーグレン症候群(30検体)、橋本病(26検体)、混合性結合組織病(15検体)、リウマチ性多発筋痛症(15検体)バセドウ病(8検体)となっている。これらの検体数は合併症を有している場合もカウントしているため(たとえば、関節リウマチと橋本病を合併している患者の場合、それぞれの疾患検体数をカウントする)、実際の総検体数よりも多い数になる。他の疾患検体については、表1のとおりである。一方、北里大学臨床薬理研究所に來所したボランティアより採血された検体は、171検体にのぼった。これらの検体はすべて女性ボランティアより採血したものである。採血に協力いただいたボランティアの年齢分布は図1のとおりである。

収集した血液検体は、国立成育医療センター研究所移植・外科研究部にて末梢血細胞の分離とDNA/RNAの抽出作業を行った。作業は図2に示す手順で行い、マイクロRNAの発現解析(マイクロアレイ解析、TaqMan法によるリアルタイムPCR解析)のためのサンプル調整を行った。現在、このサンプルを用いて、各種リウマチ性・自己免疫性疾患特異的なマイクロRNAの解析を進めている。一方、関節リウマチや多くの自己免疫性疾患は男性よりも女性において罹患率が高い疾患であることが知られ

ANCA 関連血管炎	1
Buerger 病	1
JIA (若年性関節リウマチ)	1
MCTD (混合性結合組織病)	15
PMR (リウマチ性多発筋痛症)	15
RA	188
RS3PE 症候群	1
SLE	57
SS	30
UA	2
UCTD	4
悪性関節リウマチ	1
回帰性リウマチ	1
強直性脊椎炎	3
結節性多発動脈症	1
顕微鏡的多発血管炎	5
抗リン脂質抗体症候群	1
掌蹠膿疱症性関節炎	4
好酸球性筋膜炎	1
好酸球増多症候群	1
成人スティル病	4
線維筋痛症	1
高安病	2
多発性筋炎	11
多発性外骨腫	1
強皮症	44
橋本病	26
バセドウ病	8
皮膚筋炎	3
ベーチェット病	3
変形性関節症	1
ミクリッツ病	2
リウマチ性多発性筋痛症	1

表1 疾患群検体の収集状況

ている。我々が見出しているリウマチ性関節炎に関連したマイクロ RNA の一つは、X 染色体上にマップされた遺伝子であることが分かっている。そこで、リウマチ性疾患関連マイクロ RNA の機能解析の一環として、さらに、リウマチ性疾患が女性に多い疾患である理由を探る全く新しいアプローチとして、X 染色体上の当該マイクロ RNA が女性の 2 つの X 染色体のどちらから発現しているかについても調べる予定である。本来、女性 (X 染色体を 2 つ有する) の X 染色体上の遺伝子発現は、X 染色体不活性化 (XCI) 機構によって制御されており、男性 (X 染色体を 1 つ有する) との遺伝子量の違いを補償されている。しかし、何らかの理由により XCI が破綻した場合、遺伝子量効果によって女性の X 染色体からの遺伝子 (マイクロ RNA) 発現量が高くなる可能性が考えられる。本計画では、女性の 2 つの X 染色体の両アレルから疾患関連マイクロ RNA の発現が認められた場合、疾患の発症リスクが男性よりも高くなる可能性が考えられるが、実際にそのような現象が起こっているかどうかを調べるものである。なお、XCI は個々の細胞でランダムに起こっているため、解析対象とするサンプルも 1 細胞単位となる。そこで、末梢血リンパ球の分離作業において、患者・健常者由来のリンパ球を 1 細胞単位で単離して解析を進めている (図 2)。

#### D. 考察

現在、予定通り血液検体の収集を進めている。健常者由来の検体数については 200 検体を目標にしているため、その目標数までの収集作業は継続する予定である。また、マイクロアレイ解析およびリアルタイム PCR による発現解析を進め、新規の疾患関連マイクロ RNA の検索作業を進める。

#### E. 結論

検体の収集作業については、一応のメドか付いた。今後は解析作業を進めて、新しい疾患関連マイクロ RNA の単離を目指す。

F. 健康危機情報  
特になし

G. 研究発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

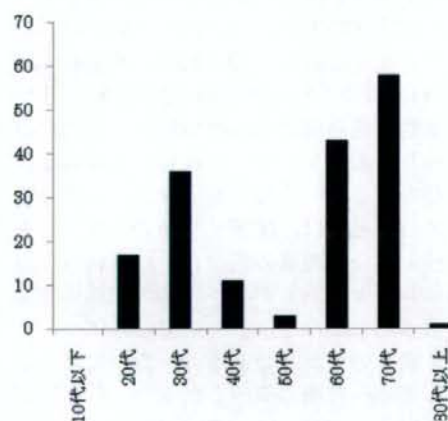


図1 健常者の血液検体の年齢別分布 (総検体数は 171 検体、すべて女性)

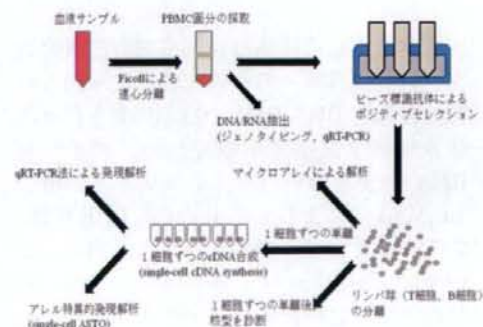


図2 血液検体からの細胞分離の流れ



## II. 分担研究報告書

分担報告書

「小児及び成人のリウマチ性疾患・自己免疫疾患に特異的に発現上昇するマイクロ RNA の同定」に関する研究

研究分担者 柳谷隆宏 国立成育医療センター研究所 研究員

研究要旨

マイクロ RNA は 22 塩基程度の non-coding RNA で配列特異的に標的とする mRNA に結合し、mRNA の不安定化や翻訳阻害により遺伝子の発現を抑制する。近年、癌や自己免疫疾患など多くの疾患において病変部や末梢血でのマイクロ RNA の発現が変化していることが報告されている。これらのマイクロ RNA の一部は、疾患の発症や予後に深く関わっていることが示唆されていることから、その発現変化の解析は疾患の原因や予後との関連を予測するために非常に有益な知見を得ることができる。そこで、本研究では、自己免疫疾患の一つである関節リウマチとマイクロ RNA との関係に注目して、リウマチ性関節炎の発症に深く関与しているマイクロ RNA の探索を行うと共に、疾患の治療や診断への応用における基盤となる研究を行った。

研究分担者

吉鷹輝仁 国立成育医療センター研究所  
研究員

研究協力者

横田俊平 横浜市立大学医学部 教授

では、リウマチ性疾患・自己免疫性疾患特異的に発現が上昇または減少するマイクロ RNA を同定して、疾患発症における役割を明らかにするとともに、疾患治療や早期診断マーカーとしての応用の可能性について探ることを目的としている。

A. 研究目的

マイクロ RNA は配列特異的に標的遺伝子の mRNA に結合し、mRNA の不安定化や翻訳阻害により遺伝子の発現を抑制する。現在、マイクロ RNA データベースである miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) には、ヒトのマイクロ RNA が 695 種登録されている。1 種のマイクロ RNA は複数の遺伝子を標的としているため、全遺伝子の約 1/3 がマイクロ RNA によって発現調節を受けているといわれており、マイクロ RNA の機能解析は複雑な遺伝子発現ネットワークの全貌を明らかにする上で重要な要素である。また、癌や白血病といったさまざまな疾患でマイクロ RNA に発現異常が見られることが報告され、治療や診断への応用が期待されている。そこで、本研究

B. 研究方法

**細胞培養** ヒト急性単球性白血病細胞由来の THP1、前骨髄球性白血病細胞由来の HL60、ヒト T リンパ性白血病細胞由来の Jurkat 細胞は penicillin-streptomycin (50U/ml penicillin、0.05 mg/ml streptomycin)、10% fetal bovine serum (FBS) を含む、RPMI Medium 1640 (GIBCO 社、以下 10% FBS RPMI 1640) で培養した。ヒト RA 由来滑膜繊維芽細胞の RASF は、penicillin-streptomycin (50 U/ml penicillin、0.05 mg/ml streptomycin)、10% FBS を含む Dulbecco's Modified Eagles Medium (GIBCO 社) を用いて 37°C/5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

#### マイクロ RNA の発現解析 mirVana

(Ambion 社製)を用いてリウマチ性関節炎滑膜組織、変形性関節症滑膜組織、正常滑膜組織から small RNA を回収した。それぞれの組織を液体窒素で凍らせて粉碎し、1ml の lysis buffer を加えホモジェナイズした。その後の作業は、メーカーのプロトコールに従った。抽出した small RNA (マイクロ RNA) 溶液は -80°C にて保存した。この RNA サンプルを用いて、マイクロアレイ解析を行った。解析は北海道システムサイエンス社に依頼して行った。一方、miRNeasy (QIAGEN 社)を用いて THP1、HL60、Jurkat 細胞、RASf、および活性化誘導した Jurkat T 細胞より small RNA を含むトータル RNA を抽出した。活性化誘導は、Jurkat T 細胞を 6 well plate に 1 well あたり  $2 \times 10^6$  cells/2 mL 10%FBS RPMI 1640 播いた翌日に、 $10^{-8}$ M Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/DMSO を PBS で 100 倍希釈し、1 well あたり 10 $\mu$ l 加えた (最終濃度 500 nmol/mL)。その後、経時的に細胞を回収した。浮遊細胞である THP1、HL60、Jurkat 細胞は 300 x g、で 2 分間遠心してペレット状にした。上清をマイクロピペットで注意深く取り除いた後、4°C の PBS で再懸濁して 300 x g で 2 分間遠心してペレット上にしたのち、上清をマイクロピペットで注意深く取り除いた。この操作をもう一度行い培地を完全に取り除いた。その後、メーカーのプロトコールに従ってトータル RNA の抽出を行った。得られた total RNA は -80°C にて保存した。注目するマイクロ RNA の発現解析については、TaqMan 法 (TaqMan miRNA Assay, ABI 社製)を用いて、同社のプロトコールに従って個別に発現解析を行った。

in situ hybridization has-miR-424 の配列情報は miRBase より得た。miR-424 は 22 塩基と非常に短いため、非特異的にプローブが結合してしまう可能性が考えられた。そこで、切断前の前駆体に結合するプ

ローブを設計した。リウマチ性関節炎滑膜組織から抽出した RNA より合成した cDNA と以下のプライマーを用いて PCR 反応を行い増幅させた。プライマーは、miR-424 の周辺約 100 bp を含む領域を増幅させるように設計した。プライマー F: 5'-CCAGCCTAGCCAGGAATAC-3'、プライマー R: 5'-AAGCTACCGGTGAGGTTTTG-3'。この PCR 産物を 1.0%アガロースゲルで電気泳動し、Gel Extraction kit (LABOPASS 社)で断片を取り出した。この断片を TA ベクターにサブクローニングし、得られたプラスミドに目的の配列が挿入されている事を確認した。このプラスミドを Not I で消化して精製した後、T7 RNA Polymerase (TAKARA 社)を用いて DIG 標識 RNA を合成した。サンプルとする切片は、-80°C で保存していた滑膜組織を一部採取し、4%PFA に入れ 4°C で一晚固定した。翌日、脱水・透析したのち、パラフィンで包埋した。ミクロトームを用いて 10  $\mu$ m の厚さに切り、シランコートされているスライドガラスに配置した。脱パラフィンした切片を 4%PFA に 10 分間浸し再固定した。PBS で 3 回洗浄を行い、37°C で 10 分間 Proteinase K (4 $\mu$ g/ml Proteinase K, 50mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA) 処理を行った。0.2% Glycine に 10 分間浸して Proteinase K 反応を停止させた。再び 4%PFA に 10 分間浸し固定して、PBS で 3 回洗浄を行った。アセチル化を行ったのち、65°C でプレハイブリダイゼーションを行った。使用直前に 80°C で 5 分間熱変性させた RNA プローブをさらに Hybridization Buffer で希釈してスライドガラス 1 枚あたり 80 $\mu$ l 添加してカバーガラスをかけ湿箱の中で 65°C 一晚反応させた。5 $\times$ SSC に浸し 65°C で 30 分間洗浄を行った。スライドガラスのみをゆっくりと引き上げカバーガラスをおとした。0.2 $\times$ SSC に浸し 65°C で 3 時間洗浄を行った。0.2 $\times$ SSC に浸し室温で 5 分間洗浄を行った。NT Buffer に浸し

室温で5分間洗浄を行った。4% Sheep serum/NT buffer をスライドガラス1枚あたり350 $\mu$ l添加して室温で60分間ブロッキングした。Anti-Dig-antibody (1:5000)/1% Sheep serum/NT buffer をスライドガラス1枚あたり500 $\mu$ l添加してカバーガラスをかぶせて4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。その後、NT buffer に浸し室温で15分間洗浄を行った。スライドガラスのみをゆっくりと引き上げカバーガラスをおとした。NMTに室温で5分間浸し平衡化した。NBT-BCIP/NMT をスライドガラス1枚あたり500 $\mu$ l添加しカバーガラスをかぶせて4 $^{\circ}$ Cで一晩発色させた。発色が十分に進んでいることを確認し、PBSで3回洗った。染色状態を撮影後、DAPI染色を行った。

### C. 研究結果

癌や自己免疫疾患など多くの疾患において病変部や末梢血でのマイクロRNAの発現が変化していることが報告されている。本研究では関節リウマチとマイクロRNA発現変化との関連を調べるために、関節リウマチの滑膜組織と正常滑膜組織からRNAを抽出してマイクロアレイ法にてマイクロRNAの発現を比較した。その結果、正常滑膜組織と比較してリウマチ性関節炎滑膜組織で発現が2倍以上上昇しているマイクロRNAとしてmiR-9、miR-21、miR-34a、miR-34b、miR-135b、miR-137、miR-146a、miR-197、miR-221、miR-424、miR-544、miR-590、let7iが抽出された(図1)。次に、異なる検出原理での検証としてTaqMan miRNA Assay (ABI)を用いて、同サンプルでの各マイクロRNAの発現量の比較を行った。また関節リウマチ特異的に発現が上昇しているかを確認するために、変形性関節症由来滑膜組織での発現量の解析も行った。変形性関節症は関節リウマチと同様に関節症を生ずる疾患であるが、形態変化による力学的ストレスや加齢が原因で発症する関節構成体の退行性変性、骨・軟骨破壊および増殖性変化のために起こる

関節軟骨疾患であり、免疫応答に異常は見られない。したがって、変形性関節症と比較して関節リウマチで発現が変化しているマイクロRNAは、関節リウマチにおける免疫応答異常に関連している可能性が高いと考えられる。TaqMan miRNA Assayによる定量解析の結果、miR-146aとmiR-424がリウマチ性関節炎の滑膜組織で正常滑膜や変形性関節症滑膜組織と比較して発現が上昇している事が確かめられた(図2、3)。

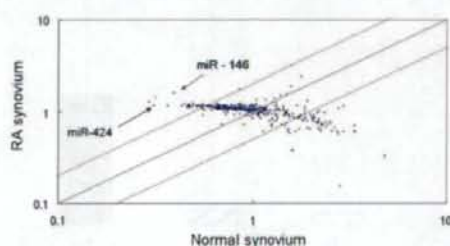


図1 マイクロアレイ解析によるリウマチ性関節炎特異的マイクロRNAの同定。

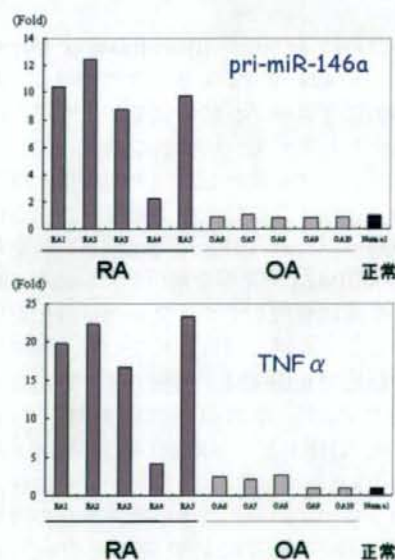


図2 miR-146aは関節リウマチ特異的に発現上昇している。

一方、miR-424 に関しては、リンパ球系細胞における発現解析も行った。リウマチ性関節炎滑膜組織では滑膜細胞のほか、T 細胞、B 細胞、マクロファージといった多様な細胞が活性化し、炎症性のサイトカインの産生や骨・軟骨破壊を促進する働きをしている。そこで、滑膜組織内のどの細胞集団が miR-424 を発現しているかを明らかに

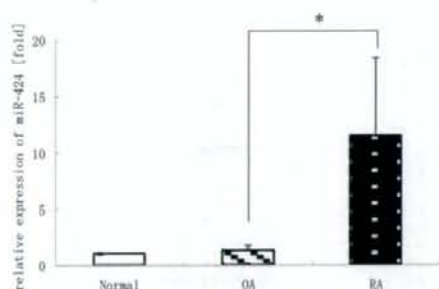


図3 関節リウマチ患者の滑膜組織 (n=4) と変形性関節症患者の滑膜組織 (n=4) と正常滑膜組織 (n=1) での miR-424 の発現。(\*: P<0.05)

するために *in situ* hybridization を行った。miR-424 は 22 塩基と非常に短く、非特異的にプローブが結合してしまう可能性が考えられたため、切断前の前駆体に結合するプローブを設計した。その結果、滑膜組織に存在する細胞全体で発現している様子が観察された (図4)。次に細胞株を用いて miR-424 の発現を解析した。miR-424 は、単球に発現しマクロファージ分化を促進することが既に報告されている。単球以外の細胞で miR-424 が発現しているかを調べるために、単球由来の細胞株である HL60、THP1 と、T 細胞由来の細胞株である Jurkat、ヒト脾臓 B 細胞由来細胞株、関節リウマチ由来の滑膜繊維芽細胞の各細胞における miR-424 の発現を TaqMan miRNA Assay を用いて測定した。それぞれの細胞での GAPDH との相対値で比較した。THP1 と Jurkat で特に高い miR-424 の発

現が見られ、その GAPDH に対する相対的な発現は RASF の約 30 倍だった (図5)。ヒト脾臓 B 細胞由来細胞株では、miR-424 の発現は検出されなかった。HL60 や THP1 で miR-424 の発現が確認できたことは、過去の報告と一致する。これまで miR-424 と T 細胞の関連についての報告はなされていない。

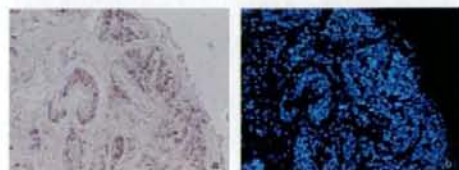


図4 滑膜細胞における miR-424 の局在。a) pri-miR-424 に対するプローブを用いて行った *in situ* hybridization. b) DAPI 染色。独立した実験を 3 回繰り返し、miR-424 が滑膜細胞に存在する全体の細胞で発現している事を確認した。

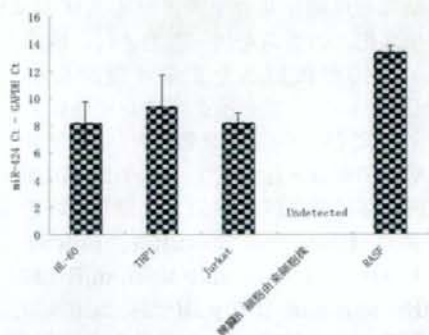


図5 各種細胞株での miR-424 の発現。左から、ヒト単球系由来細胞 HL60、THP1、ヒト T 細胞由来細胞株 Jurkat T 細胞、ヒト B 細胞由来細胞株、関節リウマチ滑膜繊維芽細胞 RASF。それぞれの細胞での miR-424 の発現を GAPDH で補正した。(n=4)

#### D. 考察

今回の研究によって、リウマチ性関節炎特異的なマイクロ RNA、miR-146a と miR-424 を見出すことが出来た。これらの

マイクロ RNA がどのようにして疾患発症において関わっているのかについては、現在、詳細な検討を行っている。特に、miR-424 に関しては、T 細胞系で強く発現していることが確認されており、T 細胞の分化や活性化の過程で機能していると予想される。今後、T 細胞の分化と miR-424 との関係について検討を進め、関節リウマチの発症においてどのような役割を果たしているのかについて明らかにする。

#### E. 結論

世界で初めて、関節リウマチに関連した疾患特異的マイクロ RNA を見出すことに成功した。今後は、疾患発症におけるマイクロ RNA の役割について調べていく予定である。

#### F. 健康危機情報

(総括研究報告書に記載)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakasa T. et al., (2008) Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 58. 1284-92.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「リウマチ性疾患、自己免疫性疾患特異的なマイクロ RNA の標的遺伝子の同定と機能解析」に関する研究

研究分担者 柳谷隆宏 国立成育医療センター研究所 研究員

研究要旨

マイクロ RNA は、部分的な相補性を有する mRNA に対して発現を抑制する。そのため、マイクロ RNA の標的となる遺伝子を配列情報のみから予測、同定することは非常に困難である。本研究では、多くの候補遺伝子を効率的に、また、実験的に検証できるシステムとして、ルシフェラーゼをレポーターとする新しいハイスループットスクリーニングシステムの開発を行った。さらに、このスクリーニングシステムを利用して、リウマチ性関節炎の滑膜組織において発現上昇しているマイクロ RNA の標的遺伝子の同定も行った。その結果、複数の標的候補遺伝子を見出すことに成功した。標的候補遺伝子については、個別にレポーター遺伝子と候補遺伝子 cDNA を組み込んだレポーターベクターを作成して詳細な解析を行ったところ、ほとんどの遺伝子について、マイクロ RNA による発現抑制効果が認められた。本研究で開発されたスクリーニングシステムは、世界に類を見ない画期的なシステムであり、他の疾患関連マイクロ RNA の標的遺伝子のスクリーニングに応用することも期待される。

研究分担者

柳谷隆宏 国立成育医療センター研究所  
研究員

佐藤可野 国立成育医療センター研究所  
研究員

研究協力者

井上 敦 国立成育医療センター研究所  
共同研究員

みから予測、同定することは非常に困難である。そこで、本研究では、多くの標的候補遺伝子をシステムティックかつゲノムワイドに検証できるシステムとして、ルシフェラーゼをレポーターとする新しいハイスループットスクリーニングシステムの開発を目指した。

B. 研究方法

ハイスループットスクリーニングシステムの構築と mir-146a の標的遺伝子の検索

リウマチ性関節炎の滑膜組織において発現上昇している miR-146a の標的遺伝子を同定するために、実験的ハイスループットアッセイシステムの構築を行った。ハイスループットにアッセイを行うために、様々な塩基配列を 3'UTR に含むルシフェラーゼレポーターライブラリーを作製する必要があった。そこで配列特異的に遺伝子組み換え反応を起こすことができる、Gateway シ

A. 研究目的

従来、マイクロ RNA の標的遺伝子については、マイクロ RNA の配列情報を基に作られた結合配列の予測アルゴリズムを用いて標的遺伝子を「推測」していた。この予測アルゴリズムは Web 上で一般公開されており、無料で簡単に利用できることから、広く活用されている。しかし、マイクロ RNA は部分的な相補性を有する mRNA に対しても作用することがあるため、マイクロ RNA の標的となる遺伝子を配列情報の

システムを用いて約 5,000 種類のコヒト cDNA 配列をルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR 部位に導入したレポーターライブラリーを構築した (図 1)。

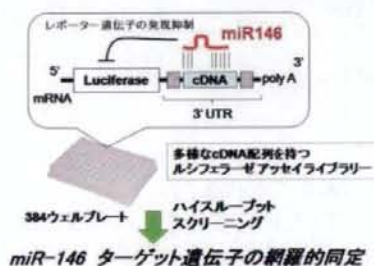


図 1 トランスレーション・アレイを構築することでシステムティックにマイクロ RNA の標的遺伝子を抽出することが可能となる。

ソースとした cDNA 配列は、元となる遺伝子のタンパク質をコードする ORF、5'UTR、3'UTR を含むが、そのすべてがルシフェラーゼ遺伝子配列の終止コドンとポリ A シグナルの間に位置するため、転写後の mRNA 中には含まれるが、融合タンパク質として翻訳されることはない。構築したルシフェラーゼレポーターライブラリー (トランスレーション・アレイシステム) を用いての miR-146a の標的候補遺伝子のスクリーニングは、384 ウェルプレートを用いて行った。構築した全ライブラリーに対して行ったスクリーニングを一次スクリーニングとし、ヒットした遺伝子については、二次スクリーニングを行って確認した。最終的に候補として残った遺伝子については、Western Blotting によるタンパク質レベルでの発現抑制効果を確認した。

#### miR-424 標的候補遺伝子の検索と検証

標的遺伝子予測アルゴリズム、Target Scan (<http://www.targetscan.org/>) を用いて、has-miR-424 と相互作用すると思われる遺伝子を検索した。そのうち、自己免疫疾患に関連があると予想されるものを選択して、miR-424 の標的候補遺伝子とした。

miR-424 の予測結合配列の周辺 1~2 kbp の領域を増幅させるように PCR 反応を行い、ルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR にサブクローニングした。得られたプラスミドは配列を確認し、大量精製してから使用した。なお、遺伝子導入実験は、HEK293 細胞と Lipofectamine2000 を用いて行った。遺伝子を導入した細胞は、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。測定終了後、遺伝子導入効率の補正のためにウミシイタケシフェラーゼ活性を測定した。両者の比を算出して補正を行い、発現ベクターから発現した miR-424 によるルシフェラーゼ遺伝子の発現阻害作用を数値化した。

#### C. 研究結果

miR-146a の標的遺伝子としては、すでに、TRAF6、IRAK1 について報告されている。そこで、この 2 遺伝子をポジティブコントロールとして利用して、我々が構築したハイスループットスクリーニングシステムの検証を行った。

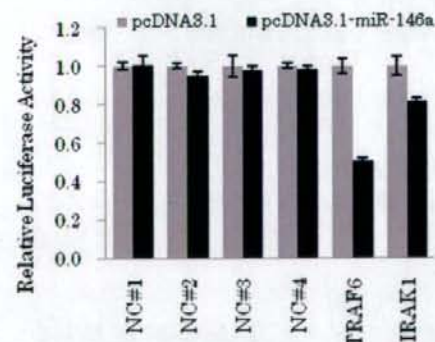


図 2 ハイスループットスクリーニングシステムの検証結果、miR-146a の標的遺伝子であることが報告されている TRAF6、IRAK1 を用いたポジティブコントロール群では、ルシフェラーゼ活性の低下が見られるが、ネガティブコントロール (NC#1~#4) 群ではルシフェラーゼ活性の変化は見られない。



その結果、これらの 2 遺伝子の配列を含んだレポーターベクターを導入したサンプルにおいて、ルシフェラーゼ活性の低下が認められた (図 2)。一方、miR-146a の結合配列を含まない遺伝子の 3' UTR を連結したレポーターベクターを導入した場合、miR-146a によるルシフェラーゼ活性の低下は認められなかった。このことから、本システムは miR-146a の標的遺伝子を検索する上で有効なシステムであることが示された。次に、実際に、miR-146a の標的遺伝子のスクリーニングを行った。miR-146a の標的遺伝子として構築した全ライブラリーに対して行ったスクリーニングを一次ス

2nd scrn ID	seq.id	Gene Symb
30	5	EMP1
24	7	MOBK2A
302	10	SERPINF2
44	14	CASP10
84	15	KCNA2
86	17	SLC39A11
77	18	IKBK
58	19	TMCO5
54	23	MYC
70	24	PRRC1
205	25	SLC22A18AS
206	26	DNMT3A
207	27	CD24
208	29	PIM2
311	35	EXOC2
320	44	GDAP1L1
328	52	SLC46A1
338	61	FAM55A
354		SH2D3C

図 3 2 次スクリーニングによって抽出された miR-146a の標的遺伝子群。1 次スクリーニングによって約 5000 遺伝子の中から 120 遺伝子に抽出され、さらに、2 次スクリーニングによって 19 遺伝子が標的候補遺伝子として見出された。

クリーニングとし、ヒットした遺伝子につ

いてさらに確認のために二次スクリーニングを行なった。その結果、miR-146a によって発現が抑制される標的候補遺伝子として 19 遺伝子を抽出することが出来た (図 3)。標的候補遺伝子のうち、免疫反応や細胞増殖に関与すると思われる遺伝子を選び、さらに、Western Blotting に使用できる抗体が入手できるものを選んで、miR-146a の標的遺伝子候補に対する作用についてタンパク質の発現量の変化を指標に評価した。その結果、IKBK と PIM-2 の発現量の減少が確認された (図 4)。これらのことから、我々が構築した、ハイスループットスクリーニングシステムによって見出された miR-146a の標的候補遺伝子は、miR-146a による発現抑制を受けていることが示唆された。

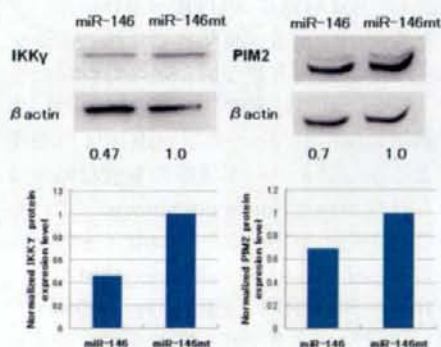


図 4 miR-146a の標的候補遺伝子の miR-146a による発現抑制。ハイスループットスクリーニングシステムを利用して見出した miR-146a の標的候補遺伝子のうち、IKK $\gamma$  (IKBK) と PIM-2 について、Western Blotting によって検証した結果、確かに miR-146a によってタンパク質レベルでの発現抑制が認められた。

一方、miR-424 の標的遺伝子の探索はデータベースを利用して行った。これは、上記したハイスループットスクリーニングシステムの運用が始まっていなかったためであり、miR-146a に関する標的候補遺伝子

のスクリーニングに先んじて行った実験であるためである。Target Scan (<http://www.targetscan.org/>) より miR-424 の標的遺伝子を検索した結果、967 種の遺伝子が標的候補としてあげられた。967 種の標的候補遺伝子から、自己免疫疾患や免疫応答経路について報告のあるものを選択した (SMAD7、TGIF2、SMURF1、SPRED1、SOSC6、SMAD5、MYB、EFNB1、BMX)。標的候補遺伝子の miR-424 の予測標的配列を含む 3'非翻訳領域 (3'UTR) をルシフェラーゼ 3'UTR にクローニングしたベクターと miR-424 発現ベクターを用いてレポーターアッセイを行った。その結果、SMAD7、TGIF2、SMURF1、SPRED1、SOSC6 の 3'UTR をクローニングした場合に miR-424 過剰発現によるルシフェラーゼ活性の低下が認められた (図 5)。しかし、SMAD5 の 3'UTR をクローニングした場合には miR-424 強発現によるルシフェラーゼ活性の有意な減少がみられなかった。また、MYB、EFNB1、BMX についても同様の解析を行ったが、miR-424 強発現によるルシフェラーゼ活性の有意な減少はみられなかった (data not shown)。これらのことから、レポーターアッセイを行った 9 の遺伝子のうち 5 の遺伝子 (SMAD7、TGIF2、SMURF1、SPRED1、SOSC6) が miR-424 により発現抑制を受けている可能性が示された。さらに、5 遺伝子のうち SMAD7、TGIF2、SMURF1 は TGF- $\beta$  シグナル経路において機能している遺伝子であることから、miR-424 は TGF- $\beta$  シグナル経路の制御において重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

#### D. 考察

我々は、マイクロ RNA の標的遺伝子のスクリーニング系を開発することを本研究事業の平成 20 年度研究計画における重点課題として位置づけていたが、当初の計画通り、本スクリーニング系を完成・運用させることに成功した。さらに、本システムを

活用してリウマチ性疾患特異的に発現しているマイクロ RNA の標的遺伝子の絞り込みにも成功した。

通常、マイクロ RNA を含む発現抑制複合体は標的 mRNA の 3'UTR 部位に部分的な相補鎖を形成して結合し、標的 mRNA の不安定化や翻訳阻害をすることにより、タンパク質への変換を抑制していると考えられている。そこで、ルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子の 3'UTR 部位に標的候補遺伝子の 3'UTR 配列を挿入したカセットを作製し、マイクロ RNA により発現が抑制されるかについて検討する方法が用いられている。ルシフェラーゼは非常に感度が高く定量性にも優れているため、蛍光タンパク質に基づくレポーター系よりもより高感度に発現減少を検出できる利点がある。本研究で構築したスクリーニングシステムでも、同様の方法を基本原理としており、レポーター遺伝子の 3'側非翻訳領域に cDNA ライブラリーを挿入した新規ライブラリーを作製した。挿入された外来遺伝子はルシフェラーゼ上流のプロモーターにより一本の長い mRNA として転写され、mRNA に含まれた cDNA 配列がマイクロ RNA によって翻訳抑制を受けると、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼの発現が抑制される。

従来、マイクロ RNA の標的遺伝子は、Target Scan のような結合配列情報を基にした予測アルゴリズムを用いて検索されていた。このアルゴリズムは、実験的検証によりその妥当性を確認してから作られたものであるが、実際に標的候補を検索すると非常に多くの候補遺伝子がヒットする。その理由は、マイクロ RNA は部分的な相補性を有する標的配列に対しても作用する場合があるためである。今回の実験で、miR-424 の標的遺伝子を Target Scan を用いて検索した場合でも、900 以上の候補遺伝子がヒットしており、これらの遺伝子が実際の標的であることを実験的に検証するのは困難である。また、注目する疾患とマイクロ RNA

の関係を調べる上では、疾患発症との関連性が低いと思われるような遺伝子も多く含まれる。そのため、真の標的候補遺伝子を選択するのは容易ではない。一方、我々が構築したスクリーニング系は、マイクロRNAによる遺伝子発現抑制を指標にしてスクリーニングする系であり、実験的な結果を基により精度の高いスクリーニングを可能にするものである。

miR-146aの標的遺伝子候補をスクリーニングした結果、最終的に19の候補遺伝子が抽出された。この中から、リウマチ性関節炎の発症に関連すると思われる遺伝子を選んで検証を進めた。タンパク質レベルでの検証を行うためには、標的候補遺伝子の発現抑制が起こっていることをWestern Blottingを用いて確かめる必要がある。しかし、いくつかの標的候補遺伝子については、抗体が入手できなかったため、今回の検証では、IKBKGとPIM-2の発現抑制について調べた。その結果、両遺伝子ともmiR-146aによる発現抑制が認められた。PIM-2は細胞増殖に関与するがん遺伝子の一つであり、リウマチ性関節炎局所における滑膜細胞の異常増殖に関与している可能性が考えられた。一方、IKBKGはNF- $\kappa$ Bの活性化に関わる因子の一つであり、免疫担当細胞の活性化などに関与している可能性が予想された(図6)。いずれにしても、これらの遺伝子は、リウマチ性関節炎を増悪させる作用が考えられた。そのような観点から考えた場合、miR-146aはリウマチ性関節炎において、炎症反応を抑制するために発現上昇している可能性も考えられる。miR-146aと疾患発症との関係については、今後、より詳細な検討を要する。

一方、miR-424の標的候補遺伝子(群)は、TGF- $\beta$ シグナルの抑制因子(群)であることが示された(図6)。本研究では、Target Scanを利用してmiR-424の標的遺伝子を検索して、さらに、文献などから自己免疫疾患や免疫応答との関連について報

告のあるものを選択した。その結果、SMAD7、TGIF2、SMURF1、SOCS6、SPRED1に関して、miR-424の標的遺伝子であることが実験的に示された。この5種の標的候補遺伝子のうち、SMAD7、TGIF2、SMURF1はTGF- $\beta$ シグナル経路において重要な役割を果たしている。TGF- $\beta$ は免疫細胞や非免疫細胞において細胞増殖や分化を調節する機能を有していることが報告されている。TGF- $\beta$ シグナルはTGF- $\beta$ が細胞膜に存在する受容体に結合することにより始まる。TGF- $\beta$ が結合した受容体はリン酸化により活性化され、さらに受容体制御型Smad(Smad2、Smad3)をリン酸化する。これらはSmad4と複合体を形成して核へと移行し標的遺伝子の転写を活性化する。このTGF- $\beta$ シグナルはさまざまな抑制因子によって調節を受けている。Smad7はTGF- $\beta$ によって発現が誘導され、受容体制御型SmadのTGF- $\beta$ 受容体への結合を競合阻害する。SMURF1は受容体制御型Smadと複合体を形成してポリユビキチン化およびプロテアソームによる分解を引き起こす。TGIF2は受容体制御型Smadに作用して核内移行を阻害する事で標的遺伝子の転写を抑制する。これらのことより、miR-424はTGF- $\beta$ シグナルの抑制因子であるSMAD7、TGIF2、SMURF1の発現を抑制することで、TGF- $\beta$ シグナル伝達抑制や負のフィードバック調節機能を阻害しTGF- $\beta$ シグナルを増強している可能性が示唆された。しかし、実際にmiR-424がこれらの標的候補遺伝子のmRNAの不安定化やタンパクの発現抑制を行うことでTGF- $\beta$ シグナルの活性化に働いているかを明らかにするためには、miR-424の過剰発現や発現抑制による標的候補遺伝子のmRNA・タンパクの発現量の変化の解析が必要であり、今後の課題である。

#### E. 結論

我々は、マイクロRNAの標的をシステマ

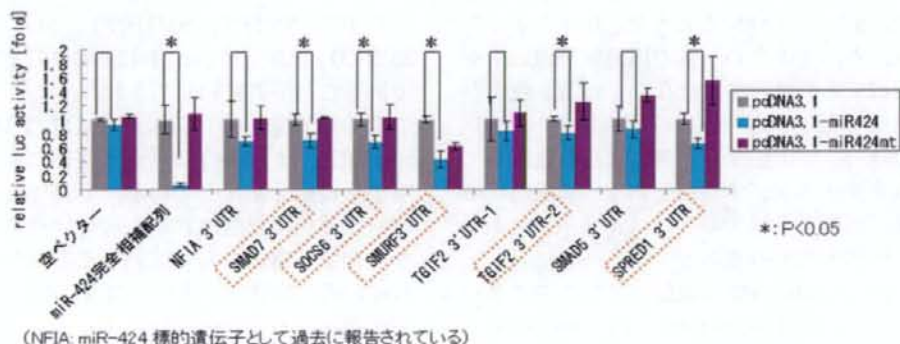


図5 miR-424の標的候補遺伝子に関するレポーターアッセイの結果。未報告の標的遺伝子として5遺伝子が抽出された。これらの遺伝子は、TGF- $\beta$ シグナル伝達に関与する遺伝子群であった。

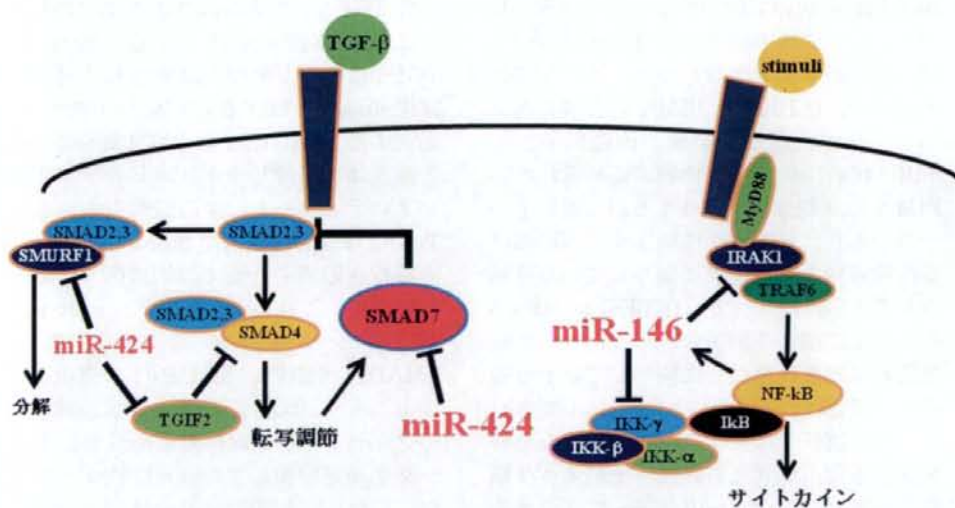


図6 miR-146aとmiR-424の標的遺伝子と各種シグナル伝達系に対する影響。miR-146aとmiR-424は、これらのシグナル伝達系に影響をおよぼすことによってリウマチ性関節炎の発症に関与していると予想される。