

2009230/2A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浅原弘嗣

平成22（2010）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
—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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浅原弘嗣

平成22（2010）年3月

目次

I. 総括研究報告

マイクロ RNA を標的とした疾患診断、治療応用 ----- 1

研究代表者 浅原 弘嗣

研究分担者 川合眞一、蓮沼智子、関敦仁、小林信一、加藤義雄、柳谷隆宏、伊藤義晃、
山下聡

研究協力者 横田俊平、井上敦

II. 分担研究報告

1. リウマチ性疾患・自己免疫疾患に関連したマイクロ RNA の同定と機能解析 ----- 1 1

柳谷隆宏、伊藤義晃、山下聡

2. 自己免疫疾患患者の末梢血リンパ球における X 染色体からの遺伝子発現 ----- 1 7

柳谷隆宏

3. 生細胞で miRNA を検出するための新規ウイルスベクターの開発とモデル解析 ---- 2 5

加藤義雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 3 5

IV. 研究発表一覧表 ----- 4 1

V. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 4 5

I. 統括研究報告書

総括研究報告書

「マイクロ RNA を標的とした疾患診断、治療応用」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

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。これらの疾患患者は成人が多数を占めるが、小児期における発症例も少なくなく、一生、患者の QOL を制限し苦痛を与えることがある。現在、リウマチ性疾患や自己免疫性疾患の治療において、抗体医薬による治療が進められている一方で、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、新しい機能性低分子 RNA 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
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
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
伊藤義晃 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 研究員
山下 聡 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

リウマチ性疾患・自己免疫疾患は根本的治療法のない難病が多い。これらの疾患が小児期において発症した場合、心身の成長発達の妨げとなることや、生涯に渡って QOL を低下させることが懸念されるため、小児における早期診断法の確立と積極的かつ副作用の少ない治療が望まれる。一方で、現在、リウマチ性疾患・自己免疫性疾患の治療において、炎症性サイトカインやそのレセプターに対する抗体を用いた治療が行われている。しかしながら、これらの抗体医薬によって治癒出来ない症例も多く、サイトカインやそのレセプターとは異なる分子を標的にした新しい治療法が開発が待たれている。

私たちは近年、機能性低分子 RNA であるマイクロ RNA に注目し、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 が発現上昇していることを報告している。そこで、本研究班では、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疾患特異的マイクロ 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とマイクロ RNA を標的とした新規治療法の開発を目的に研究を進めてきた。我々ははじめに、成人患者の検体を用いた疾患関連マイクロ RNA の検索を行い、そこで得られた成果を基に、小児性リウマチ疾患に関連したマイクロ RNA の同定を試みた。疾患関連マイクロ RNA に関しては、治療（または診断）の標的となり得るものを絞り込み、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発現系を利用して、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した。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。

B. 研究方法

血液検体の収集 平成20年度に引き続き、成人のリウマチ性疾患・自己免疫性疾患患者の血液サンプルのほか、コントロールとして健常な成人女性ボランティアから採取した血液サンプルを収集した。これらの検体のうち、患者血液サンプルは、東邦大学医療センター大森病院膠原病科に通院している外来患者に対して、研究計画に関する十分な説明を行った上で、研究協力への同意の得られた患者については次回来院時に採血を行った。採血は、他の生化学検査の機会に併せて行うことにより、患者への負担を軽減するよう配慮した。健常な成人女性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所した女性ボランティアに対して十分な研究計画・目的の説明を行った上で、研究協力への同意が得られたボランティアからのみ採血を行った。なお、患者からの採血に関しては、併せて行った生化学検査によって必要な臨床情報を取得しており、のちにマイクロ RNA の

遺伝子発現レベルと臨床情報（各種検査値や疾患活動性など）のデータを比較する場合には、同時に取得したデータを利用できるように情報収集を行った。健常者に関しては、採血時に併せて生化学検査を行い、リウマチ性疾患・自己免疫性疾患ではないことを確認している。遺伝子発現解析のために採血した血液量は、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であった。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正な審査を受け、倫理委員会の承認ならびに機関長（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。5mlの全血に対して等量の balanced salt solution (0.01% anhydrous D-glucose, 0.005uM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.098uM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.54 μM KCl, 0.0145M 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)を分注したのち、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、ピペットを用いて単核球画分 (PBMC 画分)を回収し、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、200 μ lを不死化B細胞株樹立のため、セルバンカーで混和して-80 $^{\circ}$ Cで保存した。また、細胞懸濁液のうち300 μ lについては、ゲノム抽出のために、RLT plus buffer (Qiagen)で溶解して-80 $^{\circ}$ C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、50 μ l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(CD4+/CD8+ cell mixture)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、4 μ lの細胞溶解液を添加してから-80 $^{\circ}$ C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(または24個)、B細胞も8個(または24個)、拾い上げた(図1)。なお、RNA/DNAの抽出は、DNA/RNA Mini Kit、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて行った。

コラーゲン惹起関節炎モデル作製 6週齢

の雄性DBA/1J系マウスを使用し、II型コラーゲン誘導関節炎モデルを作製した。ウ

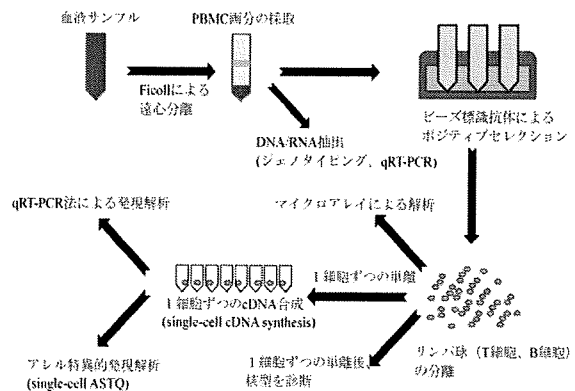


図1 血液検体からの細胞分離の流れ

シII型コラーゲン(chondrex)を0.05M酢酸に溶解し(2mg/ml)、等量のフロイント完全アジュバント(SIGMA)で乳化したエマルジョンを100 μ l尾根部皮内に注射して初回免疫を行った。3週後、同様に調整したウシII型コラーゲンをフロイント不完全アジュバントで乳化し腹腔内に投与することで追加免疫を行った^{1,2}。初回免疫から約4週後で関節炎症状が見られ、7週から8週後に症状はピークとなる。

1) 安倍 千之: 1. 関節炎モデル. VI. 炎症の実験動物モデル. 炎症と抗炎症戦略(室田 誠逸, 柏崎 禎夫 編)医薬ジャーナル社. 東京. 1997. p469-482

2) Hirano S., Wakazono K. et al: Effects of cytogenin, a novel anti-arthritic agent, on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice and adjuvant arthritis in Lewis rats. Int. J. Tiss. React. 16: 155-162, 1999

アデノウイルスベクターの作製とベクター接種・解析 ViraPower™ アデノウイルス発現システム (Invitrogen) により、miR-146a 発現アデノウイルスを構築した。なお、miR-146a の seed 配列に変異を加えた配列を対照として同様に作製する。ベクターpAd/CMV/V5-DEST™はCMVプロモーターを有しており、増殖細胞および非増

殖細胞のいずれにも感染して目的遺伝子を高レベルで一過性に発現させることが可能である。pAd/CMV/V5-DEST™ に LR recombination 反応にて目的配列の挿入を行った後、293A 細胞に遺伝子導入して数回増幅を行った。得られたウイルス液は塩化セシウムによる密度勾配法にて精製を行った後、感染価の確認を行った上で以降の接種実験に用いた。

アバーチン麻酔下にてマウス膝関節を皮切開し、目視で確認した関節包内に miR-146a 発現アデノウイルスベクターをインジェクションして遺伝子導入を行った。1 週間後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させて膝関節を採取した。4%パラホルムアルデヒドにて固定し、45%ギ酸と 20%クエン酸ナトリウム液を等量混合した脱灰液で脱灰を行った。脱水・透徹の後、パラフィン包埋して膝関節矢状断の組織切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色、サフラニン O 染色により miR-146a の関節内強制発現が滑膜や軟骨に及ぼす影響について検討した。また *in situ* hybridization や炎症性細胞の免疫染色により、miR-146a の発現部位の確認を行った。

ハイスループットスクリーニングシステムによる miR-146a の標的遺伝子の検索

前年度までに、マイクロ RNA の標的遺伝子を検索するためのハイスループットアッセイシステムの構築を行っている。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、このハイスループットアッセイシステムを用いている。このハイスループットアッセイシステムは、Gateway システムを用いて約 5,000 種類のヒト cDNA 配列をルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR 部位に導入したルシフェラーゼレポーターライブラリーである (図 2)。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。構築したハイスループットアッセ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。

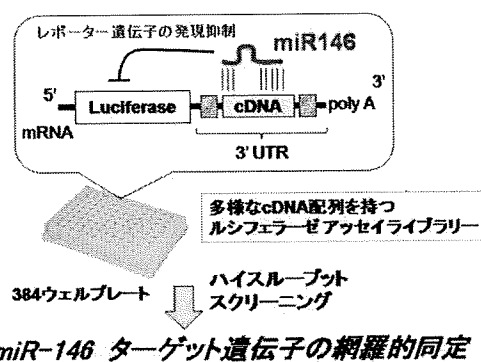


図 2 トランスレーション・アレイを構築することでシステムティックにマイクロ RNA の標的遺伝子を抽出することが可能となる。

C. 研究結果

成人のリウマチ性・自己免疫性疾患患者および健常な成人女性ボランティアの血液サンプルの収集は、平成 21 年度中に終了した。平成 22 年 3 月 31 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 435 検体にのぼり、その内訳は、関節リウマチ (230 検体)、全身性エリテマトーデス (70 検体)、強皮症 (45 検体)、シェーグレン症候群 (40 検体)、橋本病 (26 検体)、混合性結合組織病 (17 検体)、リウマチ性多発筋痛症 (15 検体)、多発性筋炎 (12 検体) となっている。その他の疾患検体については表 1 に示した。これらの検体数は合併症を有している場合もそれぞれの疾患別にカウントしているため (たと

えば、全身性エリテマトーデスと抗リン脂質抗体症候群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。一方、北里大学臨床薬理研究所に来所したボランティアより採取した血液サンプルは、199検体にのぼった。採血に協力いただいたボランティアの年齢分布は図3に示す。

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・保存とDNA/RNAの抽出作業を行った。抽出したRNAサンプルは、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RNAサンプルを用いて、各疾患に特異的な、または共通したマイクロRNAの発現解析を進めている。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の解析を行った。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

表1. 収集した成人患者検体の一覧(数字は当該疾患の診断を受けた総患者数)

関節リウマチ	230
全身性エリテマトーデス	70
強皮症	45
シェーグレン症候群	40
橋本病	26

MCTD	17
PMR	15
多発性筋炎	12
バセドウ病	8
ベーチェット病	7
成人スティル病	6
顕微鏡的多発血管炎	5
UCTD	4
強直性脊椎炎	4
掌蹠膿疱症性関節炎	4
CREST	3
リウマチ性多発性筋痛症	3
皮膚筋炎	3
UA	2
ミクリッツ病	2
悪性関節リウマチ	2
好酸球性筋膜炎	2
高安病	2
ANCA関連血管	1
Buerger病	1
CPPD	1
JIA	1
PM	1
RS3PE症候群	1
アトピー性皮膚炎	1
回帰性リウマチ	1
結節性多発動脈症	1
限定型強皮症	1
好酸球増多症候群	1
抗リン脂質抗体症候群	1
線維筋痛症	1
側頭動脈炎	1
多発性外骨腫	1
多発性筋炎 重複症候群	1
変形性関節症	1

違いを補償されている。しかし、何らかの理由により X 染色体不活性化機構が破綻した場合、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、X 染色体不活性化機構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（分担報告書に記載）。本計画では、1 細胞単位での遺伝子発現解析法を確立して、疾患の発症に関わると思われる遺伝子の発現パターンを疾患患者と健常者との間で比較することを目標としている。

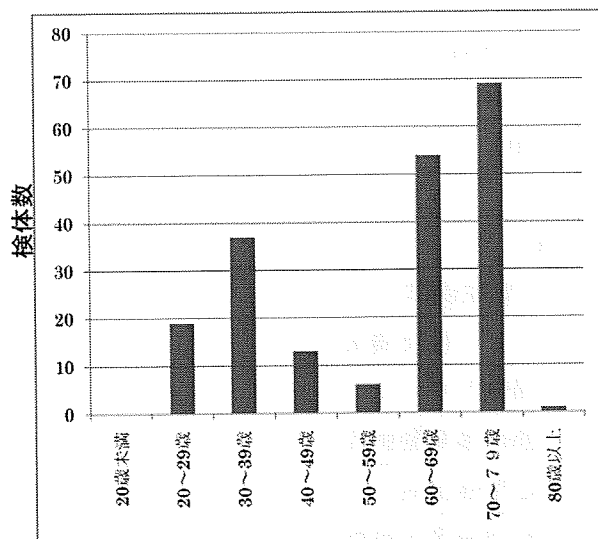


図3 健常者の血液検体の年齢別分布
(総検体数は 199 検体、すべて女性)

一方、リウマチ性関節炎に対する生物製剤は、炎症反応に関与する TNF- α や IL6 などのサイトカインやサイトカインレセプターに対する抗体を用いて、サイトカインの

機能を阻害することにより炎症反応を緩和するものであった。しかし、これらの医薬品では治癒できない症例もあり、また、抗体医薬自体が非常に高価なものであることから、新しい作用機序に基づく、安価で安全な医薬品の開発が望まれている。一方、我々は、リウマチ性疾患に関連したマイクロ RNA を見出すことに成功しており、このマイクロ RNA を分子標的とした新規治療法へ応用することが期待された。そこで、疾患関連マイクロ RNA の疾患発症における役割について明らかにするため、また、新規治療ターゲットとしての可能性について探るため、関節炎モデルマウスにマイクロ RNA のアンチセンスオリゴや過剰発現用アデノウイルスベクターを導入した時の効果についての検討を行った。マイクロ RNA を直接標的にした新規治療法の開発につながるものと期待される本研究課題については、平成 21 年度の研究計画の重点課題の一つであったが、関節炎モデルマウスの作成やアデノウイルスベクターによる mir-146a の過剰発現実験において、十分な検証が出来ておらず、再検証が必要であると判断した。そのため、十分な確証を得よう平成 22 年度において継続研究する。

一方、miR-146a の標的遺伝子に関する研究も継続して行っている。前年度までに標的候補遺伝子を複数見出すことに成功している。この標的候補遺伝子は、我々は世界に先駆けて開発したマイクロ RNA の標的遺伝子のハイスループットスクリーニングシステムを用いて見出したものである。現在、2 次スクリーニングとしてスクリーニングを継続するとともに、別のリウマチ性関節炎に関連したマイクロ RNA である miR-424 の標的候補遺伝子のスクリーニングも行っている。

D. 考察

当初、研究計画で予定していた数の成人患者および健常ボランティアの血液サンプルの収集を終えた。平成 22 年度より国立

成育医療センターに通院する小児患児の血液サンプルの収集を開始する。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。

一方、マイクロ RNA を直接標的にした新規治療法の開発に関する研究や、マイクロ RNA の標的候補遺伝子の検索に関する研究課題については、継続して研究を進める必要がある。特に、関節炎モデルマウスを用いたアデノウイルスベクターによる mir-146a の過剰発現実験については、十分な確証を得るための再検証実験を行う。

E. 結論

当初、研究計画で予定していた数の成人患者および健常ボランティアの血液サンプルの収集を終えた。平成 22 年度より国立成育医療センターに通院する小児患児の血液サンプルの収集を開始する。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

IV. 研究発表一覧表に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告書

「リウマチ性疾患・自己免疫疾患に関連したマイクロ RNA 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 22 塩基程度の non-coding RNA で、配列特異的に標的とする mRNA の 3'UTR 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、自己免疫疾患とマイクロ RNA との関係に注目して、疾患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、疾患発症にどのように関わっているのかについて検討した。

研究分担者

伊藤義晃 国立成育医療センター研究所
研究員

山下 聡 国立成育医療センター研究所
研究員

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、WEB 上で閲覧可能であるマイクロ 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 760 種以上登録されている。1 種のマイクロ RNA は複数の遺伝子を標的としうるため、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。近年、我々は、リウマチ

性関節炎の滑膜組織において発現上昇する miR-146a を同定した。miR-146a については、平成 20 年度までに標的遺伝子の検索や機能解析についての知見を得ており、NF- κ B シグナルに関わる分子の発現を制御していることを見出している。一方、miR-424 についても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ことを認めており（図 1）、標的遺伝子候補についての検索を進めることによって、疾患の発症にどのように関与しているのかについて検討してきた。その結果、TGF- β シグナルに関わる分子に対して、抑制的に機能することを見出した。本研究では、miR-424 に注目し、自己免疫性疾患である関節リウマチで発現上昇していた miR-424 の、関節リウマチ以外の自己免疫性疾患でも発現変化している可能性を考え、様々な自己免疫性疾患での発現解析を中心に進めた。

B. 研究方法

血液検体の収集・末梢血リンパ球の分離
統括研究報告書内に記載
RNA 抽出

RNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いて、末梢血リンパ球より total RNA を抽出した。抽出の際に、以下のように一部方法を変更した。まず、RLT buffer で溶解したサンプルに 100%エタノールを 1.5 倍量加えて、転倒混和した。その後、kit に付属している抽出用カラムを通した。カラムの洗浄作業の際に、kit に付属されている、RW1 buffer は用いず、RPE buffer のみで洗浄した。その後、DEPC-treated water を用いて、RNA をカラムより溶出させた。RNA 溶液は濃度測定後、使用するまで-80°Cにて保存した。

マイクロ RNA の発現解析

末梢血 T 細胞で発現しているマイクロ RNA は、TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) を用いて測定した。使用した Assay ID は次の通り。Assay ID; 000604 (has-miR-424) 、 001048 (has-miR-503)、002240(has-miR-542-5p)、001284 (has-miR-542-3p) 、 002303 (has-miR-450a) 、 002207 (has-miR-450b-5p) 、 002208 (has-miR-450b-3p)、001006 (RNU48)、

一方、疾患患者におけるマイクロ RNA の網羅的発現解析については、TaqMan MicroRNA Array v2.0 を用いて行った。方法は、メーカーのプロトコールに従った。すなわち、total RNA 量として約 30ng 相当分を使用して、megaplex RT primer を用いて複数のマイクロ RNA の multiplex cDNA 合成を行った。その後、特異的プライマーを用いて PCR 法による pre-amplification 反応を行い、PCR 産物の一部を使って、マイクロ RNA の発現解析を行った。

C. 研究結果

miR-424 は、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 として見出された。そこで、関節リウマチ以外の自己免疫性疾患においても発現上昇している可能性を考え、様々な自己免

疫性疾患患者での発現解析を行った。解析対象とする検体は、患者および健常者から採取した末梢血中の T 細胞とした。T 細胞は免疫反応において多彩な機能を有しており、近年では、IL-17 産生ヘルパー T 細胞

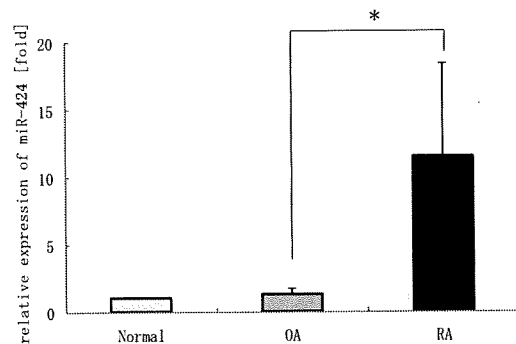


図1 関節リウマチ患者の滑膜組織 (n=4) と変形性関節症患者の滑膜組織 (n=4) と正常滑膜組織 (n=1) での miR-424 の発現。 (*: P<0.05)

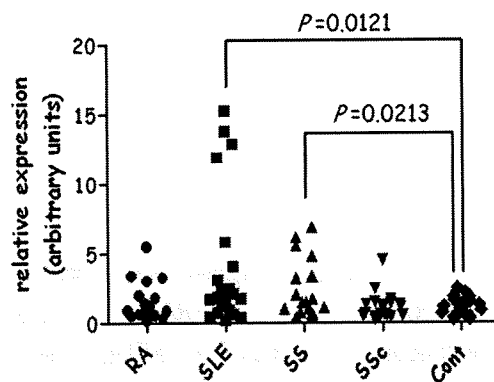


図2 様々な自己免疫疾患患者における miR-424 の発現解析. 末梢血 T 細胞における発現レベルを健常者との間で比較した。

(Th17) や免疫反応の制御に関わる regulatory T 細胞の役割について広く研究されている。そのため、本研究では、末梢血 T 細胞における miR-424 の発現変化について調べることにした。

我々は、解析対象として、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症

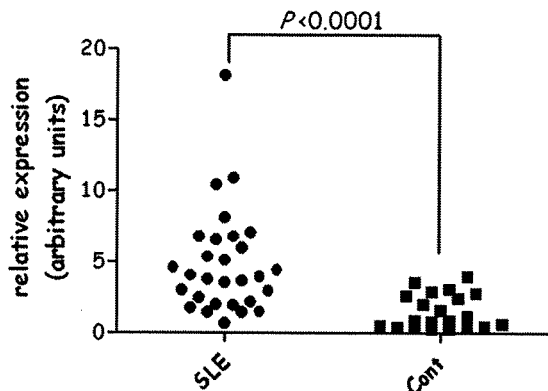


図3 全身性エリテマトーデスにおけるmiR-424の発現解析. 別セットの患者・健常者サンプルを用いて replication studyを行った.

候群、強皮症および健常な女性由来の末梢血 T 細胞を選んだ。TaqMan 法を用いて、miR-424 の発現解析を行ったところ、全身性エリテマトーデス患者群において健常者群よりも発現上昇していることが分かった。加えて、シェーグレン症候群患者においても有意に発現上昇していた (図2)。そこで、全身性エリテマトーデス患者および健常者について、別セットのサンプルを用いて replication study を行った。その結果、確かに、疾患群において miR-424 の発現が上昇していることが確認された (図3)。このことから、miR-424 は、関節リウマチのみならず、全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群の発症にも何らかの関与をしている可能性が強く示唆された。

ところで、miR-424 は X 染色体の長腕上に存在しており、その周辺には複数のマイクロ RNA がクラスターを形成して存在している (図4)。これらのクラスターを形成するマイクロ RNA は polycistronic に発現制御されている可能性が考えられた。そこで、クラスターを形成するマイクロ RNA についても、全身性エリテマトーデス患者における発現解析を行った。その結果、クラスター内のマイクロ RNA のうち、

miR-503、miR-542-5p、miR-450a については全身性エリテマトーデスにおける発現量が有意に上昇していた (図5~7)。さらに、各マイクロ RNA と miR-424 との発現レベルの相関性について調べたところ、正の相関を示すことが分かった (data not shown)。一方、miR-542-3p や miR-450b は発現していなかった。これらの結果から、全身性エリテマトーデスにおいては、miR-424 だけでなく、miR-503、miR-542-5p、miR-450a も疾患の発症に関与している可能性が考えられる。今後、

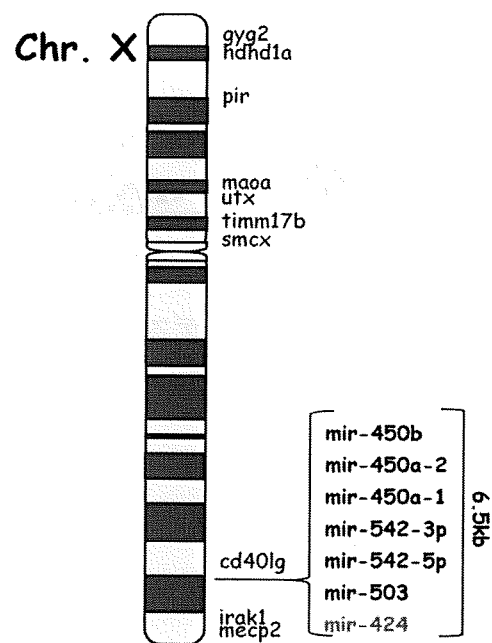


図4 miR-424 は複数のマイクロ RNA とクラスターを形成している。

miR-503、miR-542-5p、miR-450a の標的遺伝子についての詳細な検討を行い、疾患との関わりについて明らかにする必要がある。

miR-424 が全身性エリテマトーデスに関連したマイクロ RNA であることが明らかになったことから、改めて全身性エリテマトーデスに関連したマイクロ RNA の検索を行った。疾患関連マイクロ RNA の検索は、TaqMan MicroRNA Array v2.0 を用い

て行った。患者および健常者の末梢血 T 細胞由来の total RNA (含マイクロ RNA) を解析対象にした。その結果、複数のマイクロ RNA の上昇と減少 (それぞれ 2 倍以上の変化があったものとして) が認められた (data not shown)。今後、これらのマイクロ RNA の絞り込みと標的遺伝子解析、機能解析を行い、疾患の発症にどのように関与しているのかについて解析を進める。

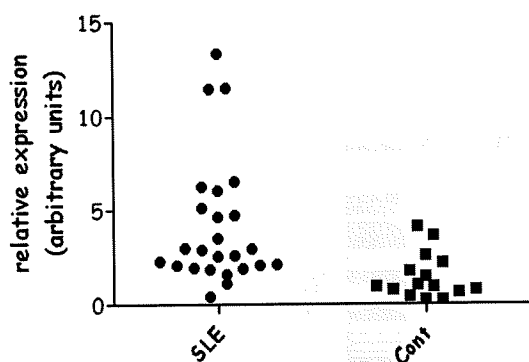


図5 全身性エリテマトーデス患者における miR-503 の発現解析。

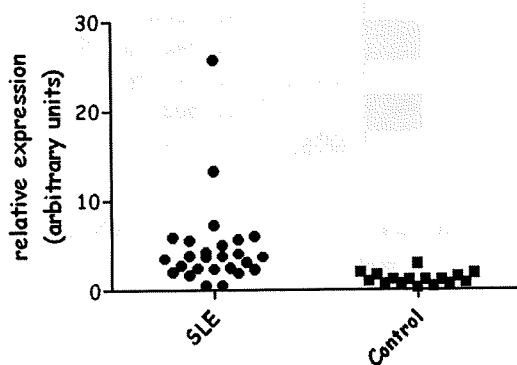


図6 全身性エリテマトーデス患者における miR-542-5p の発現解析。

一方、我々は、miR-424 が疾患発症においてどのように関与しているのかについての検討も進めた。前年度までに、標的遺伝子の検索によって、miR-424 は TGF- β シグナル伝達の抑制に関わる分子群 (SMAD7、

SMURF1、TGIF2) を標的にすることを、レポーター遺伝子を用いた検討によって見出している (図 8、9)。そこで、本年度においては、実際に miR-424 を過剰発現した細胞を TGF- β で刺激したときの反応について調べた。BOSC23 細胞に miR-424 の wild type または mutant をそれぞれ過剰発現して、この細胞を TGF- β で刺激した時に、miR-424 の発現ベクターと一緒にトランスフェクトした TGF- β 刺激に応答するレポーター遺伝子の発現がどのように変化するかについて検討した。その結果、miR-424 wild type を過剰発現した場合、mutant や empty vector を導入した場合よりも、レポーター遺伝子の発現量が高くなっており (図 10)、このことは、miR-424 は TGF- β シグナルを増強する機能があることを示している。すなわち、前年度までの研究成果と併せると、miR-424 は TGF- β シグナルの抑制分子である SMAD7 や SMURF1、TGIF2 などの発現を抑制することにより、結果的には、TGF- β シグナルを増強していることが明らかになった。

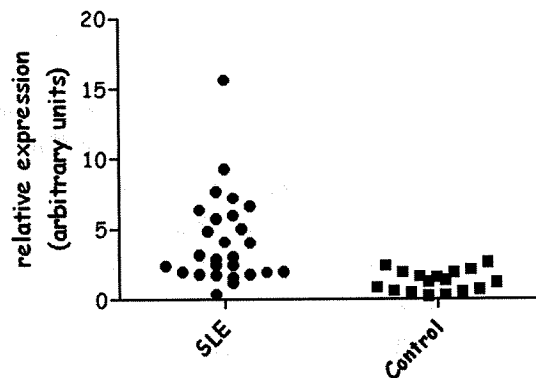
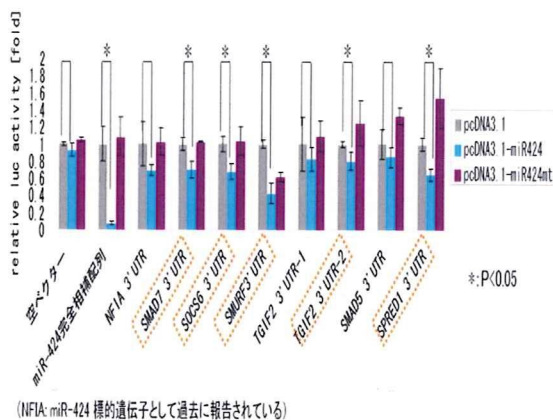


図7 全身性エリテマトーデス患者における miR-450a の発現解析。

D. 考察

今回の研究によって、リウマチ性関節炎に関連したマイクロ RNA として見出された miR-424 は、全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群にも関連していること

が示唆された。さらに、miR-424 とクラスターを形成する miR-503、miR-542-5p、miR-450a も発現上昇していることが示されたことから、今後、miR-424 だけでなく miR-503、miR-542-5p、miR-450a についても疾患発症においてどのように関与しているのかについて明らかにする必要がある。一方、TaqMan MicroRNA Array を用いて全身性エリテマトーデスに関連したマイクロ RNA が複数見出された。これらのマイクロ RNA についても、絞り込みを行い、標的遺伝子の検索や機能解析を通して、疾患発症への関与について明らかにする必要がある。



(NFIA: miR-424 標的遺伝子として過去に報告されている)

図 8 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-β シグナル伝達に関与する遺伝子群であった。

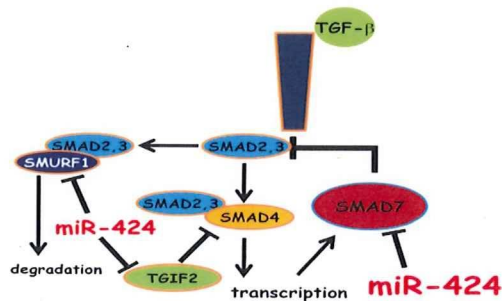


図 9 miR-424 の標的遺伝子と各種シグナル伝達系に対する影響。miR-424 は、これらのシグナル伝達系に影響をおよぼすことによってリウマチ性関節炎の発症に関与していると予想された。

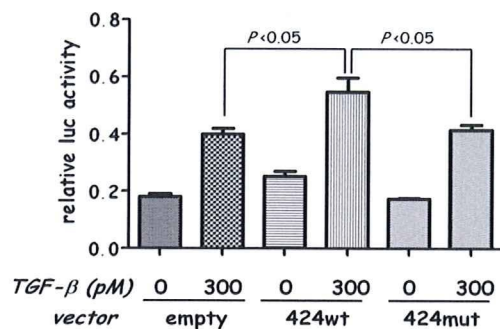


図 10 miR-424 の過剰発現は TGF-β シグナルを増強する。

一方、昨年度までの研究によって、miR-424 は、SMAD7、TGIF2、SMURF1、SOCS6、SPRED1 の発現に抑制的に関与している可能性が示されており、TGF-β シグナリングに影響を及ぼす可能性が示唆されていたが、今回の検討によって、確かに、miR-424 は、TGF-β シグナルを増強することが示された。TGF-β は多彩な機能を有しており、その影響を受ける細胞種は様々である。自己免疫疾患に関連した miR-424 の TGF-β シグナルにおける機能を考えた場合、さらに、今回の研究で miR-424 が全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群の発症に関与している可能性が示されたが、この検討で用いた検体は末梢血 T 細胞であったことを考慮した場合、miR-424 が T 細胞の分化や機能に影響を及ぼしている可能性が考えられた。今後は、そのような可能性について調べていく予定である。

E. 結論

miR-424 は、関節リウマチのみならず、全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群に発症にも関与していることが明らかとなった。

F. 健康危機情報

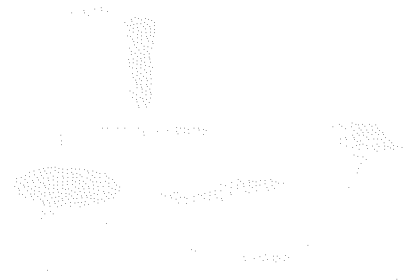
(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

IV. 研究発表一覧表に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



「自己免疫疾患患者の末梢血リンパ球における X 染色体からの遺伝子発現」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

多くの自己免疫性疾患は、男性よりも女性において高頻度に発症することが知られている。疾患と性差を考える上で重要な因子は、男女における「性ホルモン」の違いと「性染色体」の違いである。本研究計画では、性差の認められる自己免疫性疾患の発症における性染色体（X 染色体）の関与について明らかにすることを目的としている。そのために、本研究では、女性の体細胞を検体として、1 細胞レベルで 2 つある X 染色体のどちらから遺伝子が発現しているかを検出する実験系を構築して、疾患患者および健常者における X 染色体からの遺伝子発現パターンの違いについて検討することを目標としている。

A. 研究目的

多くの自己免疫性疾患は、男性よりも女性において高頻度に発症することが知られている。例えば、関節リウマチ（3－4 倍）、全身性エリテマトーデス（9 倍）、シェーグレン症候群（1.4 倍）、強皮症（9 倍）、混合性結合組織病（1.3－1.6 倍）などが挙げられる。性差を生じる原因としては、男女における「性ホルモン」の違いと「性染色体」の違いが考えられる。自己免疫性疾患と性ホルモンの関係については、エストロゲンが免疫反応を亢進するのに対して、アンドロゲンが免疫反応を抑制することが多数報告されている。一方で、小児期に発症する若年性特発性関節炎（若年性関節リウマチ）においては女兒患者の方が多いことや、小児期発症全身性エリテマトーデスの思春期前発症例は女兒の方が多いことから、性ホルモン以外の因子の関与が考えられた。

通常、女性の X 染色体からの遺伝子発現は、X 染色体不活性化機構によって、片方の X 染色体は不活性化され、男性の X 染色体からの遺伝子発現量と同じレベルに制御されている（遺伝子量補償）。しかし、近年

の研究によって、X 染色体不活性化機構を免れて発現する多数の遺伝子の存在が明らかにされた¹⁾。このような遺伝子は、2 つの X 染色体から発現することにより、発現量は正常女性（または正常男性）より多くなっている可能性がある。また、X 染色体不活性化機構を免れる遺伝子の発現パターンは個人によって異なることも示唆されている¹⁾。このことから、X 染色体不活性化機構を免れることにより、結果的に過剰発現状態になっている遺伝子が自己免疫疾患の発症に関与している可能性が考えられた。

体細胞における X 染色体不活性化機構は、1 細胞レベルでランダムに起こっているため、細胞集団を対象にした解析では、平均的な現象しか観察できない。X 染色体不活性化機構の破綻・逸脱について検討するためには、1 細胞レベルでの遺伝子発現解析、しかも、発現するアレルを区別できる解析法が必要であった。そこで我々は、女性の体細胞を検体として、1 細胞レベルで 2 つある X 染色体のどちらから遺伝子が発現しているかを検出する実験系を構築して、疾患患者および健常者における X 染色体からの遺伝子発現パターンの違いについて検討

することを目標とした。

1) Carrel L, Willard HF, Nature (2005) 434(7031): 400-404

B. 研究方法

血液検体の収集

統括研究報告書に記載

末梢血 T 細胞の単離 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。血液サンプルより末梢血リンパ球の分離作業を行った。5ml の全血に対して等量の緩衝液 A (0.01% anhydrous D-glucose, 0.005 μ M CaCl₂ · 2H₂O, 0.098 μ M MgCl₂ · 6H₂O, 0.54 μ M KCl, 0.0145M 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 を分注したのち、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、ピペットを用いて単核球画分(PBMC 画分)を回収し、ここに 3 倍量の緩衝液 A 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。細胞懸濁液のうちの 300 μ l については、ゲノム DNA の抽出のために、RLT plus buffer (Qiagen)で溶解して-80°Cで保存した。なお、このゲノム DNA は、SNP genotyping に用いた。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、50 μ l 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 (CD4+/CD8+ cell mixture) 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、4 μ l の細胞溶解液を添加してから -80°C にて保存した。1 個人由来の末梢血 T 細胞として、8 個から 24 個の細胞を拾い上げた。

DNA 抽出・SNP genotyping

細胞分離の際に回収した PBMC を用いて DNA 抽出を行った。DNA は、DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出した。SNP genotyping は、TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems)を用いて行った。タイピングを行った SNP ID とそれに対する TaqMan SNP Genotyping Assay の Assay ID は次の通り。TFRC (rs406271, C_976917_20)、MECP2 (rs2734647, C_16398_20)、TIMM17B (rs1128363, C_11611029_1)、IRAK1 (rs1059701, C_8966366_1)。なお、SNP genotyping は ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いて行った。

cDNA 合成、RT-PCR

1 細胞レベルでの cDNA 合成は、次のように行った。細胞溶解液 (4 μ l)と細胞 (1 個)の混合液に 16 μ l の逆転写反応液 (5x First-Strand Buffer, 300ng random hexamer, 0.625mM dNTP, 6.25 μ M DTT, 100U SuperScriptIII, 20U RNaseOUT RNase inhibitor, 1000 copies XenoRNA control) を加えて、全量を 20 μ l とした。この反応液を 25°C で 15 分間、42°C で 60 分間インキュベートしたのち、75°C で 10 分間加温した。1unit の RNase H (Invitrogen) を添加したのち 37°C で 20 分間インキュベートした。すべての反応は GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems)を用い