

て行った。合成された cDNA は SNP 周辺領域の増幅のための multiplex RT-PCR のサンプルとした。まず、cDNA 溶液を 7 $\mu$ l ずつに分注して、それぞれに 43 $\mu$ l の multiplex PCR 反応液を加えて全量を 50 $\mu$ l とした。PCR は 95°C で 3 分間の反応ののち、94°C で 20sec, 57°C で 20sec, 72°C で 30sec の反応を 20 サイクル行った。Multiplex PCR に用いたプライマーセットは以下の通り。TFRC; 5'-CTATGAACTTTTCCCTAGGAGGCC-3' and 5'-CTTTATGGTTTCTCCAGGTCCTCTAC-3', TIMM17b; 5'-AGCACAGCCCCGGTCAATG-3' and 5'-GTGCCAATGCTGTGAGGATCC-3', MECP2; 5'-GAATGATGCCACCCAACAGAAGATTG-3' and 5'-ATACTGTATGTCGTCGAGCTCCC-3', IRAK1; 5'-GGCCTGGCTTGGTAGAAGAAG-3' and 5'-ACCTTCCTCTCCCCAGCTTTTC-3', GAPDH; 5'-GCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTG-3' and 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATG-3'

#### アレル特異的発現解析

各アレルからの遺伝子発現については、TaqMan SNP Genotyping Assays のプロトコールに従って調べた。Multiplex PCR 反応液 (計 150 $\mu$ l) のうち、3 $\mu$ l をサンプルとした。TaqMan probe は、TFRC、MECP2 については、SNP genotyping に用いたものと同じ probe を利用した。TIMM17b、IRAK1 については、カスタム合成したプローブ、プライマーセットを用いた。それぞれの配列は次の通り。TIMM17B; 5'-GATAGAGTTCCAGGGATCCTCCTT-3', 5'-GGAGGTAGCTTCGCACTGT-3', 5'-FAM-CACAGTCAATGGTG-NFQ-3', 5'-VIC-CCACAGTCGATGGTG-NFQ-3'.

IRAK1; 5'-GGAGGCCACAGGGAAGC-3', 5'-GGCTCCCAGACCCATTCAG-3', 5'-FAM-AGGGCTTGGGACCAG-NFQ-3', 5'-VIC-AGGGCTTGGGAACCAG-NFQ-3'

各アレルからの遺伝子発現を調べるにあたっては、検量線を用いて発現割合を算出するが、検量線用のサンプルとしては、各 SNP に関して homozygote (遺伝子型が AA/AB/BB となる場合、AA homozygote と BB homozygote) となる不死化 B 細胞由来の 2 種類の DNA の混合サンプル (AA homozygote と BB homozygote の混合比が 10 : 0, 8 : 1, 4 : 1, 3 : 1, 2 : 1, 1.5 : 1, 1 : 1, 1 : 1.5, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 8, 0 : 10 となるように混合したサンプル) を用いた。リアルタイム PCR は ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System を用いて行い、すべてのサイクル数での蛍光強度をモニターした。PCR 終了後、30 または 35 サイクル目での蛍光強度を抽出して、 $\log_2(\text{FAM intensity}/\text{VIC intensity})$  を算出した。検量線のデータに当てはめ、FAM の蛍光に関連するアレルの発現割合を算出した。VIC の蛍光に関連するアレルからの発現割合は、VIC-allele expression (%) = 100 - (% of FAM-allele expression) として計算した。なお、我々は、1 細胞ごとの単離、cDNA 合成や RT-PCR の精度を調べるため、GAPDH の発現解析を併せて行った。もし、細胞の単離が出来ていなかったり、RNA が分解していたり、cDNA 合成・RT-PCR が正確に出来ていなかった場合、GAPDH の発現は検出できなくなる、または、発現量が非常に低く見積もられるので、そのようなことがないかどうかについて調べた (実験や操作精度の検証)。GAPDH の発現解析はリアルタイム PCR によって調べたが、その時に用いたプローブ・プライマーは次の通りである。5'-ATGCTGGCGCTGAGTACGT-3', 5'-AGCCCCAGCCTTCTCCAT-3', 5'-VIC-CTGGCGTCTTCCACCAC-NFQ-3'

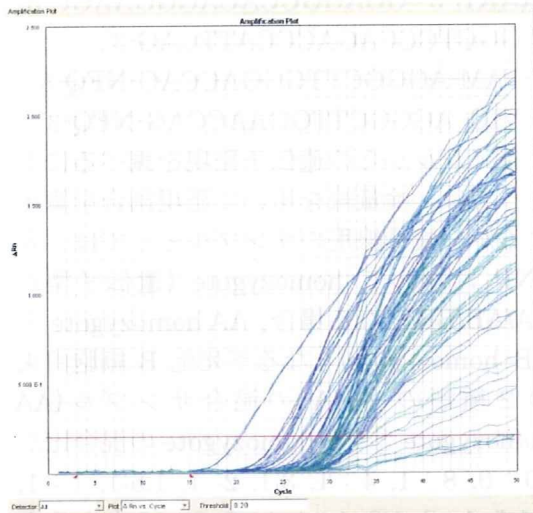


図1 TFRCの1細胞レベルでのアレル特異的発現解析の結果. 蛍光シグナルの増幅曲線から、両アレルからの遺伝子発現を示唆している.

### C. 研究結果

常染色体(第3番染色体)上の遺伝子であるTFRC(トランスフェリンレセプター)を用いて、1細胞レベルでのアレル特異的遺伝子発現解析の実験系の精度の確認を行った。常染色体上の遺伝子であり、刷り込み遺伝子ではないTFRCは、2つのアレル

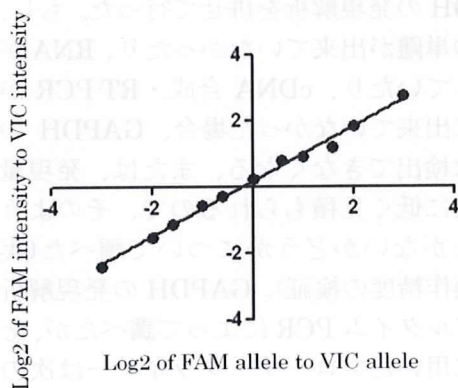


図2 TFRCのアレル特異的発現解析で使用した検量線.

(父方および母方由来の第3番染色体)から遺伝子発現していると予想される。我々が開発・応用する、1細胞レベルでの遺伝子発現解析系において、そのような遺伝子発現パターンを検出できるかどうか調べた。TFRCの3'UTR上に存在するSNP、rs406271は、日本人集団における遺伝子型頻度が0.659(AA)/0.318(AG)/0.023(GG)であり、解析を行う上で必須条件となるAG heterozygoteを効率良く得ることが出来る。

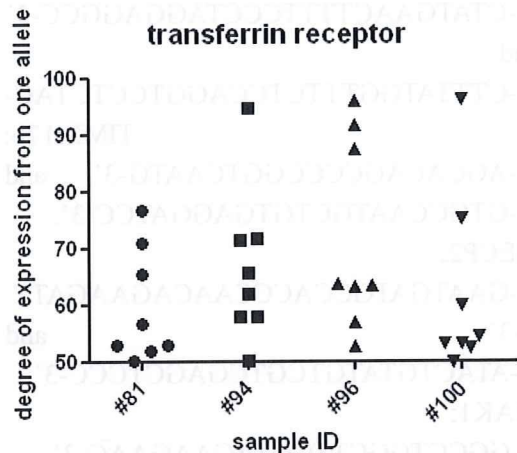


図3 TFRCの1細胞レベルでのアレル特異的発現解析の結果. 検量線を用いて各アレルからの遺伝子発現割合を算出した。グラフの縦軸は片方のアレルからの遺伝子発現割合を示しており、60%の場合、もう片方のアレルからの発現割合は40%であることになる。

そこで、このSNPをマーカーにして、アレル特異的発現解析(1細胞由来のcDNAをテンプレートにしてSNP genotyping probeを用いたリアルタイムPCR)を行ったところ、2つのアレルからの遺伝子発現に基づく蛍光シグナルが得られた(図1)。検量線(図2)を用いて各アレルからの遺伝子発現割合を算出したところ、片方のアレルからの発現割合は約50%~80%の中に集中した(図3)。このことから、TFRCの各アレルからの遺伝子発現比は1:1~1:4程度であることが分かり、同一個人でも細胞

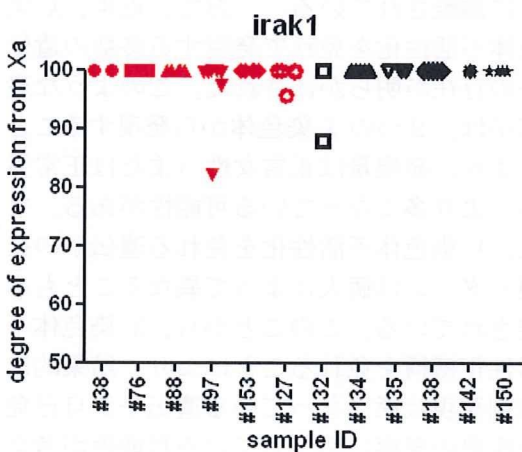
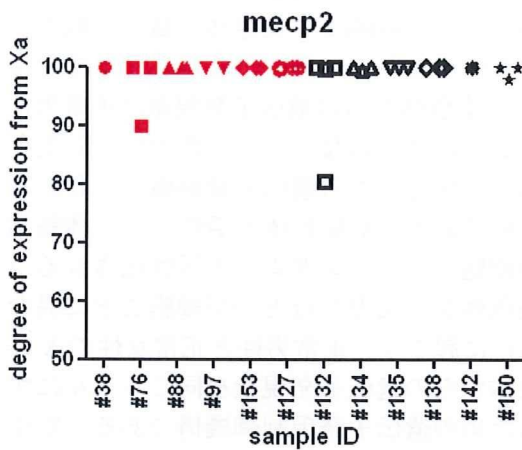
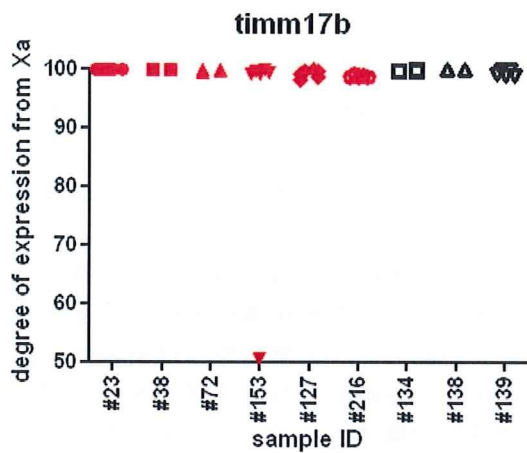


図4 TIMM17B、MECP2、IRAK1に関する1細胞レベルでのアレル特異的発現解析の結果. 赤で示したドットはSLE患者群、黒で示したドットは健常者群を表す. 縦軸は活性化X染色体からの発現割合を示す. 横軸は患者・健常者のID番号を表す. ほとんどの細胞は、縦軸で100%の位置にプロットされており、これは、X染色体不活性化機構が強く働き、不活性化X染色体からの遺伝子発現が起こっていない事を示す. 一方、いくつかの細胞は、100%より小さい数値でプロットされ、特に、TIMM17Bの#153では、50%の位置にプロットされているが、これは、不活性化アレルからの遺伝子発現が少なからずあり、#153ではその比率がほぼ1:1であることを示している.

によって若干の変動があることが分かった. なぜ、細胞によって発現割合が異なるのかについては今後の検討課題であるが、概ね予想の範囲内の変化であると判断した. そこで、次に、X染色体上の遺伝子発現について、同様の解析を行った. 比較的発現量が高いTIMM17bの他、ケースコントロール相関解析によって全身性エリテマトーデス(SLE)の関連遺伝子として報告されているMECP2、IRAK1について、健常者およびSLE患者でのアレル特異的発現解析を行った. TFRCの解析と同様に、まず、適当なマーカーSNPを選択して、genomic DNAを用いてのSNP genotypingを行い、解析可能なheterozygoteを選んだ. その後、cDNA合成やSNP周辺領域のRT-PCRを介して、SNP genotyping probeによるリアルタイムPCRを行った. その結果、TIMM17B、MECP2、IRAK1について増幅蛍光シグナルが得られた. しかし、Ct値を指標にして有効データの振り分けを行ったところ(Ct値が35以上のデータについては信頼性が低いので採用しないという判定)、結果的には、有効データ数は全体の2/3~1/2程度に減ってしまった. 残ったデータ

について、検量線を用いて各アレルからの遺伝子発現割合を算出したところ、TIMM17B、MECP2、IRAK1に共通して、ほとんど細胞で片方のアレルからのみ遺伝子発現が認められた(図4)。これは、X染色体不活性化機構による制御を強く受けていることを示す。疾患群、健常者群の間にも違いは認められなかった。一方で、細胞によっては両アレルからの遺伝子発現を示唆する結果も得られた。特に、TIMM17Bの発現解析においては、#153のように、完全に両アレルから1:1の割合で遺伝子発現しているケースも認められた。今回の検討では、疾患とX染色体不活性化機構の破綻・逸脱との関係は明らかにできなかったが、同一個人であっても細胞によってはX染色体不活性化機構を免れて遺伝子発現する場合もあることが明らかとなった。

#### D. 考察

自己免疫性疾患は、本来、自己以外の異物(細菌、ウイルスなど)やガン細胞などを排除するために備わっている免疫系が、自己の正常な細胞やタンパク質を異物であると認識してしまい、攻撃を加えることで起こる疾患の総称である。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。その例として、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)、多発性硬化症(2-3倍)、多発性筋炎・皮膚筋炎(2倍)、強皮症(9倍)、混合性結合組織病(1.3-1.6倍)、原発性胆汁性肝硬変(8倍)、甲状腺機能低下症(1.0-2.0倍)、甲状腺機能亢進症(3-4倍)などが挙げられる。これらの疾患で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、女児患者の方が多い(2-3倍)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の男女比が1:4であることから、性ホルモン以外の因子の関与が考えられた。

そこで、本研究では、性染色体、特にX染色体に注目した疾患遺伝子研究を進めることを計画した。正常女性の性染色体は、父親由来と母親由来のX染色体を1つずつ受け継いで構成されている。正常男性の性染色体は1つのX染色体と1つのY染色体から成り、単純にX染色体の数を比較すると女性の方が1つ多い。しかし、正常女性のX染色体からの遺伝子発現量は正常男性の2倍にはならない。その理由は、X染色体不活性化による遺伝子量補償が行われるためである。X染色体不活性化は、体細胞の細胞ごとにランダム(不活性化されるX染色体が、父方か母方かが細胞ごとに異なる)に起こり、正常男性と正常女性のX染色体からの遺伝子発現量を同じレベルにするための遺伝子発現制御機構である。X染色体上の遺伝子発現量は男女間で同じレベルに調整されている。一方で、近年、X染色体不活性化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。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。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。本研究は、この点に注目して計画したものである。

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おり、「細胞集団」を対象にした遺伝子発現解析では、平均的な現象しか観察できない。我々

は、このような問題を解消するため、1細胞レベルでX染色体不活性化機構とその破綻による遺伝子発現を検出する方法を開発することを目指した。そして、その方法を用いて、自己免疫疾患患者および健常者におけるX染色体不活性化機構の破綻・逸脱の有無について検討することを目標とした。今回の検討の結果、1細胞レベルでのアレル特異的発現解析の基盤技術開発には成功したが、実際に、X染色体上の遺伝子の発現を調べるにあたって、いくつかの問題点が明らかとなった。それは、解析対象とするX染色体上の遺伝子の発現レベルが低い場合、信頼に足りうるデータを得ることが難しいという点である。今回は、3つの遺伝子(TIMM17B、MECP2、IRAK1)を解析対象としたが、これらの遺伝子の発現量は必ずしも十分に高いとは言えない。データベースを用いた我々による検索によると、本研究計画で解析可能と判断されるX染色体上の遺伝子は約120遺伝子あると計算されるが、発現量までを考慮した場合、いくつかの遺伝子で解析可能かについてはまだ不明である。今後の課題としては、発現量が低くても精度の高い解析を可能にするような改良を行わなくてはならない。

#### E. 結論

1細胞レベルでのアレル特異的遺伝子発現解析法の開発に成功した。今後は、X染色体上のどのような遺伝子を解析対象にするかについて検討する必要がある。また、

今回は、全身性エリテマトーデス患者と健常者の間で比較を行ったが、今後は別の自己免疫性疾患患者におけるX染色体不活性化機構の破綻・逸脱に関する検討を行う。

#### 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

「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」  
に関する研究

研究要旨

マイクロ RNA (miRNA) は、遺伝子発現の制御を司る 22 塩基程度の小さな RNA である。これまでに 700 種類以上の miRNA が発見され、発生や分化において時期特異的・空間特異的に発現していることが示唆されているが、生細胞で miRNA を定量化する技術がないため、詳細な miRNA の解析が行なえていないのが現状である。従来利用されて来たマイクロアレイやノーザンブロットでは生きた細胞では検出できないという問題点があった。我々は本研究を通じ、分化に伴って発現が変動する miRNA をリアルタイムに観測かつ定量化するシステムを開発しており、様々な miRNA を 1 細胞レベルで観測することにより、診断ツールとしても利用できるシステムを確立する。

A. 研究目的

ヒトゲノム中には、タンパク質をコードしていない領域が大量に存在する。このノンコーディング領域の DNA は進化の過程で溜め込まれた「ジャンク DNA」であると考えられてきたが、近年の網羅的発現解析の成果によって、ノンコーディング RNA として機能していることがわかってきた。特に昨今、ノンコーディング RNA として注目されているのが、microRNA (miRNA) である。miRNA は 22 塩基程度の小さな RNA であり、生体の発生段階において時期・組織特異的に発現し、細胞の運命を左右することが分かってきた。また、癌や糖尿病、肝炎など様々な疾病に miRNA が関与していることから、治療や診断の対象分子となると考えられている。

現在、ヒトにはおよそ 1000 種類の miRNA が見出されており、各々の発現量は細胞や組織、あるいは健康人や疾病者において変化する。したがって miRNA を指標とした診断を行なう場合にはこれらの miRNA を並列的に検出する必要がある。これまでに報告されている miRNA の検出法としてはノ

ーザンブロット法が最も利用されてきているが、1000 種類の miRNA を同時並行的に検出する方法としては全く適していない。そこで最近では、miRNA の網羅的検出法として RT-PCR と組み合わせたマイクロアレイ法が利用されている。このマイクロアレイ法は、通常の mRNA を検出するための手法としても頻繁に用いられている。

しかしながら、細胞から RNA を抽出してから解析するマイクロアレイ法などの従来の手法には問題点もある。1つ目は、平均化効果である。「細胞」や「組織」と一口に言ってもそれは均一な細胞集団であるはずもなく、隣り合う細胞でその発現量が異なると考えるのが自然であり、細胞や組織をすり潰して RNA を抽出し、その RNA から miRNA の解析を行ってきた従来の手法では、個々の細胞の個性を消してしまうことになる。また、従来法問題点の 2つ目としては、死んだ細胞を解析するために、外界刺激応答性に対する変化を観測できない点が上げられる。すなわち、従来の方法論では細胞をすり潰して（殺して）RNA を解析するため、生きた細胞で観測できるような

細胞の形態変化や薬剤に対する経時変化を追うことができないのである。

上記のような問題点を解決するために、我々は、生きた細胞で miRNA をリアルタイムで検出する手法の開発に取り組んで来た。本研究プロジェクトの主軸は、小児リウマチ性疾患や自己免疫疾患における miRNA を新規に同定・解析し、これらの miRNA を

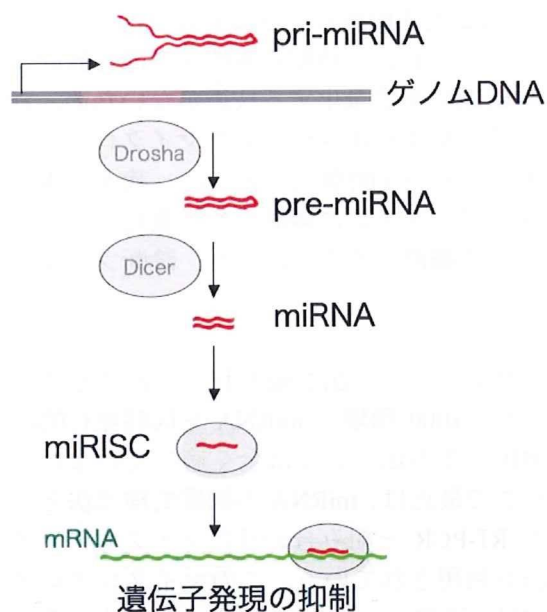


図1 発生や分化における miRNA の役割。時期・組織特異的に転写された miRNA 前駆体 (Pri-miR および Pre-miR) がプロセッシングを受けて短い RNA が生じる。miRNA は塩基配列依存的に標的 mRNA と相互作用して遺伝子の発現を抑制する。

診断や治療に役立てていくことにある。現在までに、自己免疫疾患や関節炎に関与する miRNA として、miR-146 や miR-140 の機能を評価しており、将来的に新たな診断対象と展開して行くことが期待されている。しかしながら現在解析段階ということもあり、新たに開発するシステムを検証するためには、複数のグループから報告され、より一般的に認知されている miRNA をモデ

ルケースとした方が好ましいと思われる。そこで本研究では、筋肉特異的 miRNA として知られている miR-133、およびアデノウイルス由来 miRNA (miR-VAIT5、miR-VAIT3) を指標として、生きた細胞内での miRNA の観測および定量化を試みることにした。

## B. 研究方法

### レトロウイルスベクターの構築

**pMXCRGb**: ブラストサイジン耐性遺伝子と融合した GFP の DNA 断片は、pEGFP-C3 および pTracer を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した: 5' - AGGGATCCGCCACCATGGT GAGCAAGGGCGAG -3'、5' - ACTACTCGAGGTTAACG AATTCTAGCCCTCCCAC -3' および 5' - GACAAAGGCTTGGCCTGGCCATCGATTTGTACAGCT CGTCCATGC -3'。PCR 産物を BamHI、XhoI で切断し、pMX-puro に組み込み、pMXGb を得た。RFP を含む断片は、pRSET-mCherry を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した: 5' - CGGAAGCTTGCCACCATGG TGAGCAAGGGCGA -3' および 5' - AAAAG TCGACTAATCGATCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG -3'。PCR 産物を HindIII、SalI で切断し、pMXGb に組み込み、pMXRGb を得た。CMV プロモーターは、pEGFP-C3 を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した: 5' - AACTCGAGTAG TTATTAA TAGTAATCAATTACGG -3' および 5' - ACAAGCTTCTAGTGATCTGACGGT TCACTAAA -3'。PCR 産物を XhoI、HindIII で切断し、pMXRGb に組み込み、pMXCRGb を得た。

**pMXCRGb[133]**: miR-133 に完全に相補的な標的配列の3回繰り返した DNA 断片は、以下の2つの DNA をアニーリングして調整した: 5' - AATTACAGCTGGTTGAAGGG GACCAACAGCTGGTTGAAGGGGACCAACAGCTGGTTGA AGGGGACCAA -3' および 5' - TCGATTGGTCCCCTTCAACCAGCTG TTGGTCCCCTTCAACCAGCTGTTGGTCCCCTTCAACCA GCTGT -3'。得られた二本鎖 DNA を pMXCRGb の ExoRI、XhoI サイトに組み込み、

pMXCRGb[133]を得た。

### レンチウイルスベクターの作製

レンチウイルスベクターを構築するため、Phusion DNA ポリメラーゼを用いて2つの連結した遺伝子を融合 PCR 法を用いて増幅させた。GFP および RFP は、同じプライマーと制限酵素サイトを用いて互いに可換である。

**pLV. WPRE:** ユニークな制限酵素サイトを導入するため、元ベクターpCMV-GIN-ZEOを組換えることによって新たに pLV. WPRE を基本ベクターとして構築した。WPRE 領域は pCMV-GIN-ZEO を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した：5'-AAAGGCCCTTCGAAGCGGCCCTCGAGGAATCAACCTCTGGATTACAAA-3'、5'-ATGTTTTTCTAGGTCTCGATGATCAGCGGGGAGCGGCCCA-3'、5'-AAAGGTACC TGAGGTGTGAC-3'。PCR 産物は ApaI、KpnI で切断後、pCMV-GIN-ZEO の ApaI/KpnI サイトに挿入し、pLV. WPRE を得た。

**pLV. PtR:** マウスホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーターは、NIH3T3 細胞のゲノム DNA を鋳型として、以下のプライマーを用いて、PCR で増幅した：5'-ACAGCGCCGCAATTCTACCGGGTAGGG-3'、5'-CTTGCTCACCATGGTGGCTAGCGAAAGGCCCGGAGATG-3'。PGK プロモーターに連結した RFP 断片は pRSET- tdTomato と先の PCR 産物を鋳型として、以下のプライマーを用いて、PCR で増幅した：5'-TTCCTCGAGGATCCCGGGAATCATTTGTACAGCTCGTCC-3'、5'-ACAGCGCCGCAATTCTACCGGGTAGGG-3'。モノマーに相当する PCR 産物は、NotI、XhoI で切断後、pLV. WPRE の NotI/XhoI サイトに挿入し、pLV. PtR を得た。

**pLV. SGx. PtR:** SV40 プロモーターに連結した GFP 断片は、pEGFP および pMX-puro を鋳型として以下のプライマーを用いて、PCR で増幅した：5'-AATTGCGGCCGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTA-3'、

5'-TTGCTCACCATGGTGGC

ATCTCCTTCTAGATTTGCAAAAAGCCT

AGGCCTCCAAA-3'、5'-AAATTCGAAATCGATTTGTACAGCTCGTCCAT-3'。PCR 産物は NotI、Csp45I で切断後、pLV. PtR の NotI/Csp45I サイトに挿入して、pLV. SGx. PtR を得た。

**pLV. SG. PtR:** ブラストサイジン耐性遺伝子に連結したポリアデニル化シグナルは、pTracer-EF./Bsd を鋳型として、以下のプライマーを用いて、PCR で増幅した：5'-GGGCCCTTCGAACCATAGAGCCCACCGCATC-3'、5'-CTGGCAACTAGAAGGCA CAGACGCGTGGATCCCGGGAATTCAGCCCTCCACACA CATAACC-3'、5'-AATCTA GACCATGGGAATCGATGGCCAGGCCAAGC-3'。PCR 産物は Csp45I、ClaI で切断後、pLV. SGx. PtR の ClaI サイトに挿入し、pLV. SGb. PtR を得た。

**pHV. SGb. PtR:** RSV プロモーター断片は、pLenti6 を鋳型として、以下のプライマーを用いて増幅した：5'-TGACGTCGACAATGT AGTCTTATGCAATACTCT-3'、5'-ATGTTT TCTAGGTCTCGATGATCAGCGGGGAGCGGCCCA-3'。PCR 産物は SalI、BssHII で切断後、pLV. SGb. PtR の SalI/BssHII サイトに挿入し、pHV. SGb. PtR を得た。

**pHV. SiGb. PtR:** 人工イントロンは、pBIND を鋳型として、以下のプライマーを用いて増幅した：5'-GGAGCCTAGGCTTTTGC AAATTCTGACACAACAGTCTCG-3'、5'-TTGCTCACCATGGTGGCATCTCCTTCTAGATTTGC AAAAGCCTAGGCCTCCAAA-3'。PCR 産物は AvrII、XbaI で切断後、pHV. SGb. PtR の AvrII/XbaI サイトに挿入し、pHV. SiGb. PtR を得た。

**pHV. FtRb. PG:** 伸長因子 1a (EF1a) プロモーターは、pTracer-EF/Bsd を鋳型として、以下のプライマーを用いて増幅した：5'-AAAAAGCGCCGCGGCTCCGGTCCCCGTCA-3'、5'-CCCTCTAGATCACGACACC TGAAATGGAAG-3'。PCR 産物は、NotI、XbaI で切断後、pHV. StRb. PG の NotI/XbaI サイトに挿入し、pHV. FtRb. PG を得た。

### miRNA センサーベクターの構築



VAI RNA の二本鎖領域と相補的な配列の 3 回繰り返しに相当する断片は、T7 DNA ポリメラーゼおよび以下のプライマーを用いて、プライマー自己伸長反応により調整した。得られた断片は、BamHI、EcoRI で切断後、pLV.SGb.PtR の BamHI/EcoRI サイトに挿入した。

VAI T5: 5'-AAGAATTCACCAGACCACGG  
AAGAGTGCCACCAGACCACGGAAGAGTGCCACCAGA  
CCACGGAAGAGTGCCCGGATCCGG-3', VAI T3:  
5'-AAGAATTC  
AAGGAGCGCTCCCCGTTGTCTGAAGGAGCGCTCCCC  
GTTGTCTGAAGGAGCGCTCCCCGTTGTCTGGATCCAG  
-3', VAI A5:  
5'-AAGAATTCACCCCGGTCGTCGCCATGATAACCC  
CGGTCGTCGCCATGATAACCCCGGTCGTCGCCATGA  
TAGGATCCTA-3', VAI A3:  
5'-AAGAATTCATCACGGC  
GGACGGCCGGATCTATCACGGCGACGGCCGGATCTAT  
CACGGCGGACGGCCGGATCCGG-3', miR-1:  
5'-AAGAATTCACA  
TACTTCTTTACATTCCATACATACTTCTTTACATTCCA  
TACATACTTCTTTACATTCCAGGATCCTG-3',  
let-7: 5'-AAGAATTC  
AACTATACAACCTACTACCTCAACTATACAACCTACTA  
CCTCAACTATACAACCTACTACCTCAGGATCCTG-3'.

#### Whole-mount in situ hybridization

Whole-mount in situ ハイブリダイゼーションは従来法どおりに行なった。マウス胚 (E11.5) を、4% PFA、0.2% グルタルアルデヒドで室温 20 分間処理した。ジゴキシゲニン (DIG) 標識されたアンチセンス鎖プローブ (500 ng/ml) を、70° C、14 時間ハイブリダイゼーションさせた。マウス胚は、抗 DIG 抗体のアルカリフォスファターゼ Fab 断片および NBT/BCIP で処理した。pri-miR133a2 の断片は、マウス cDNA を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した: 5' -TCTGCCTTCCCAGAGCCATG-3' および 5' -TAATACGACTCACTATAGGGATCCACTGGGAGGAGAGACTCC-3'。成熟 miRNA 領域は我々の条件下

では、検出には短くすぎたため、primary 領域を使用しているが、LNA プローブの検討も可能である。DIG 標識されたプローブは DIG-RNA 標識キットおよび T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写させた。

#### 筋分化の誘導

マウス筋芽細胞 C2C12 は、10%ウシ血清および DMEM から構成される増殖培地 (GM) にて培養した。C2C12 を高密度になるまで培養した後、2%ウマ血清および DMEM から構成される分化誘導培地 (DM) に置き換えた。

#### レトロウイルスの作成と感染

レトロウイルスパッケージング細胞株 Plat-E は、10%ウシ血清、1μg/ml ピューロマイシン、10 μg/ml プラストサイジンおよび DMEM から構成される培地にて培養した。細胞には、TransIt-293 を用いてトランスフェクションを行なった。80%密度の細胞にレトロウイルスベクターをトランスフェクションしてから 18 時間後、培養培地を新しいものに置き換え、さらに 30 時間後に培地を回収して 0.45μm のフィルターで濾過した。フィルター濾過したウイルス入の培地は、5μg/ml のポリブレンとともに、C2C12 筋芽細胞へと感染させた。遺伝子導入された細胞は、適宜選択後、顕微鏡下にて観察した。

#### レンチウイルスの作製と感染

293T および HT1080 細胞は、10%ウシ血清、DMEM 培地で培養した。プラスミドは、TransIt-293 を用いてトランスフェクションを行なった。6 ウェルに播種した 293T 細胞が 80%コンフルエントになった時、レンチウイルスベクター (0.8μg)、pMDL-gp-RRE (0.4 μg)、pRSV-Rev (0.4 μg)、pCMV-VSVG (0.4 μg) をトランスフェクションした。18 時間後、培地を新しいものと交換した。さらに 30 時間後、培地を回収し、0.45 μm フィルターで濾過した。濾過されたウイルス溶液をポリブレン (5 μg/ml) とともに

HT1080 細胞に添加し感染させた。感染から 2 日後、細胞にブラストサイジン (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し選択した。組換えウイルスの操作にあたっては、遺伝子組み換えの安全指針に従って適切におこなった。

### ノーザンブロット

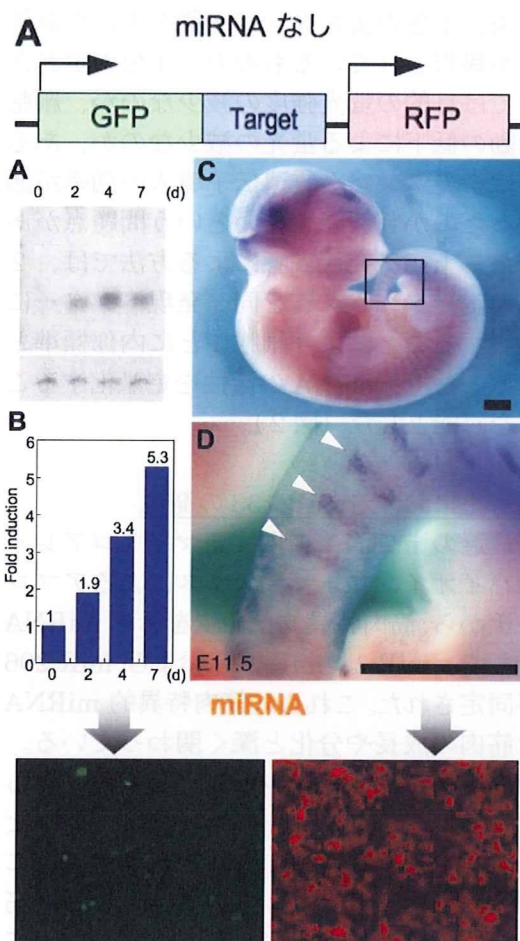
ISOGEN 試薬を用いて RNA を抽出・精製し、12%ポリアクリルアミド電気泳動 (8M 尿素存在下) を行なった。電気泳動後、エレクトロブロットティングにより RNA を Hybond-XL 膜へと固定化した。 $^{32}\text{P}$  標識された RNA プローブを用いて、miRNA の検出を行なった。

### アデノウイルスの FACS 解析

組換えアデノウイルス Ad2/ $\beta\text{Gal}$ -4 を HT1080 細胞に感染させた後、5 日目に細胞をトリプシン処理して FACSaria で解析を行った。GFP および RFP の蛍光シグナルは、488nm のレーザーで励起された後、515-545 nm (FL1) および 562-588 nm (FL2) バンドパスフィルターで蛍光を測定した。RFP の発現が高い場合、GL2 フィルターにおける GFP の漏れ込みは、補正を行わずとも無視できる程度であった。

### C. 研究結果

生きた細胞内の miRNA の発現をリアルタイムで観測することができれば、その細胞がまさに miRNA を発現しつつあるという状況を捉えることができる。しかし、miRNA を直接的に定量するためには、現状では細胞を殺して RNA を抽出せざるを得ない。一方で、miRNA を間接的に検出する方法として、miRNA による遺伝子発現抑制効果を利用する方法が報告されている。miRNA に完全に相補的な配列をレポーター遺伝子の下流に組み込むと、そのレポーター遺伝子の発現が抑制されることが知られており、これまでの報告例では、ルシフェラーゼや  $\beta$ -ガラクトシダーゼといったレポーター遺伝子を用いて miRNA の活性



が評価されてきた (Zeng ら, Mol. Cell, 2002)。しかしながら、細胞を溶解または固定化させなければならず、不均一な細胞集団の中で miRNA を発現する細胞を特定することは困難であった (Brown ら, Nat. Med., 2006)。

そこで我々は、レポーター遺伝子として

緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (RFP) を採用し、生きた細胞内で miRNA の活性を測定することを試みた。従来、1 色の蛍光タンパク質を用いた評価系が報告されているものの、1 色の蛍光だけでは目的の蛍光強度の減少なのか、細胞活動の低下による蛍光の減少なのか、あるいは蛍光タンパク質遺伝子導入の効率が悪かったのか判別できないという問題点があった。上記研究代表者による方法では、2 色の蛍光タンパク質を同一発現ベクターに搭載することにより細胞ごとに内部標準とすることで、miRNA の活性を定量化することを可能とした (図 2)。

### 筋分化における miR-133 の発現

最近の miRNA に関するマイクロアレイやバイオインフォマティクスによるアプローチから、筋肉特異的な発現を示す miRNA として、miR-1、miR-133 および miR-206 が同定された。これらの筋肉特異的 miRNA は筋肉の成長や分化と深く関わっている。miR-1 と miR-133 はショウジョウバエからヒトに至るまで進化的に保存された miRNA である。miR-133 は筋肉の分化に伴って発現が上昇する一方で、miR-133 筋芽細胞の増殖を促進することが報告されている。これは、筋分化を促進する miR-1 や miR-206 とは逆方向の働きを持っていることを示している。

C2C12 細胞は、マウス骨格筋の筋芽細胞であり、培養状態において、間葉系細胞として多分化能を有する。C2C12 筋芽細胞が筋分化誘導時において、miR-133 の発現が上昇することが報告されている。我々もノーザンブロット解析において他のグループと同様の結果を得ており、増殖培地 (GM) から分化誘導培地 (DM) へと培養条件を変えることによって、4-7 日の間に 6 倍程度発現が上昇することを確認した (図 3)。miR-133 の発現についてさらに、定量 RT-PCR 解析を行ない、およそ 5 倍の発現上昇を確認した。筋分化に伴う miR-133 の

発現は、myoD や myogenin といった古典的な筋肉マーカーと同様に、分化の指標として新たに利用できる可能性がある。次に我々は、発生時における miR-133 の役割を

図 3 miR-133 の発現プロファイル。A. C2C12 を分化誘導させた際の miR-133 の発現変動。B. RT-PCR 定量解析。C, D. *in situ* ハイブリダイゼーションによる miR-133 局在の確認。

解析するため、whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。

miR-133 (今回解析したのは前駆体である pri-miR-133) は、マウス胚の体節で強く発現していることが明らかとなった。しかしながら、上に記載したノーザンブロット法、RT-PCR 法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を含めた従来の方法論では、細胞や組織をホモジェナイズあるいは固定化しなければならず、筋分化における miR-133 の発現挙動を追跡する上では、あまり適した方法ではない。

### 緑色および赤色蛍光タンパク質を搭載したレトロウイルスベクター

筋分化を生きた細胞で観測するため、我々は 2 種類の蛍光タンパク質を搭載した独自のレトロウイルスベクターを用いて、2 色同時測定する系を構築した。前項 (研究方法) で記載した通り、レトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス (M-MLV) ベクター pMX に基づいている。このレトロウイルスベクターは、自己不活性型 (SIN) ではなく、2 つの活性型 LTR を有しているため、レトロウイルスがゲノム DNA へ挿入された後においても、上流 LTR からの転写が起きる。その結果、プロウイルスは 2 つの独立した転写産物を発現ことになる。一つは、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター駆動で赤色蛍光タ

ンパク質 (RFP) を発現し (transcript 1)、もう一方は、LTR プロモーター駆動で GFP を発現する (transcript 2)。後者の転写産物 (transcript 2) は、RFP および GFP 両方の配列を有してはいるが、真核生物では二つ目の ORF からは翻訳が起きないため、事実上、GFP しか発現しない。3'LTR 中の R 領域は、両方の転写における共通のポリアデニル化シグナルとして働く。

蛍光タンパク質の近年の凄まじい発展によって、従来利用されてきた水色 (CFP) や黄色 (YFP)、緑 (GFP)、赤 (DsRed) の他にも、様々な色の蛍光タンパク質が利用できるようになってきた。特に赤色においては、波長特性や蛍光収率が飛躍的に向上し、マルチカラー観測に応用されるようになってきた。波長が重複しないように観測するためには、緑色と赤色の組合せは、水色と黄色よりも好ましい。GFP とともに利用することができる RFP の最適な組合せを探るため、RFP 発現プラスミドをトランスフェクションしたところ、明るさとしては tdTomato > mCherry ~ mOrange > DsRed であった。しかしながら我々の蛍光顕微鏡のフィルターセットでは、mOrange、tdTomato、DsRed が、緑色蛍光とオーバーラップしてしまうことが明らかとなったため、以降の実験では RFP として mCherry を用いている。

我々が構築したレトロウイルスベクターを用いて miR-133 の発現を観測するために、miR-133 と相補的な配列を pMXCRGb プラスミドの GFP と CMV の間に挿入し、pMXCRGb[133] を作製した。miRNA は標的 mRNA に相補的に相互作用してその発現を抑制するため、miR-133 と相補的な配列を持つ GFP の mRNA は、miR-133 の発現に伴って減少することになる。この際、RFP の発現レベルは変化しない。標的配列を 3 回繰り返すことによって、1 つの標的配列よりも発現抑制効果が高くなることが報告されている。レトロウイルスはゲノム DNA にランダムに挿入されるため、挿入位

置によってはレトロウイルスからの遺伝子発現が変動することがある。そのため、RFP はその発現変動を補正する意味合いがある。

### 筋分化における miR-133 のリアルタイム観測

構築したプラスミド (pMXCRGb または pMXCRGb[133]) を 293T ヒト腎細胞由来の Plat-E パッケージング細胞にトランスフェクションした後、培養上清を回収して組換えレトロウイルス粒子を得た。レトロウイルスを C2C12 筋芽細胞に感染後、ブラストサイジン薬剤で感染細胞だけを選択した。ブラストサイジン耐性遺伝子は、GFP との融合遺伝子となっている。レトロウイルス (MXCRGb または MXCRGb[133]) が導入された C2C12 筋芽細胞では、GFP および RFP の蛍光が観測された (図 4 左)。GM 培地で培養されているこの段階の細胞では、miR-133 は発現していない (図 2 A)。

次に、内在性の miR-133 の発現を観測するため、レトロウイルスを導入した細胞を DM 培地で 6 日間培養したところ、細胞は通常通り分化した。分化誘導に伴って、MXCRGb[133] が導入された C2C12 筋芽細胞では、GFP 発現の減少が見られた (図 4 右)。特に、筋管細胞において GFP 蛍光の顕著な減少が確認された。RFP 蛍光には影響がなかったことから、この蛍光変化は GFP に特異的なものである。一方、miRNA の標的配列が含まれていない MCRGb が導入された C2C12 では、筋管細胞へと分化誘導しても、GFP 蛍光に変化は見られなかった。これらの結果から、筋管細胞へと分化している細胞において、miR-133 が発現しているものと考えられる。筋管細胞は、細胞同士が融合して大きな細胞塊を形成するため、フローサイトメトリー解析を用いた定量解析ができない。そこで、顕微鏡像を画像解析することによって分化前後の細胞の蛍光強度を測定することにした。その結果、筋管細胞での GFP の蛍光強度が顕著に減少していることが明らかとなった。興味

深いことに、GFP の発現は筋管細胞形成に先立って減少しており、miR-133 は表現型の変化よりも前に発現していることが示唆された。我々の解析結果は他の報告を裏付けるものであり、筋分化における生きた細胞内での miR-133 の動的挙動を明らかにするものである。

#### 新規レンチウイルスベクターへの展開

我々はこのベクターをさらに発展させ、新たにレンチウイルスベクターを構築した。この際、特に重要視したのは GFP と RFP の発現の相関性である。GFP と RFP の発現が常に(i)転写干渉を引き起こさないようにするため 2 つのプロモーターを逆向きに配置する離散型 (divergent) 転写ユニットの採用、および(ii)クロマチン制御を受けやすい YY1 転写因子結合配列を有する CMV プロモーターを使わない様に、レンチウイルスベクターを数十種類構築した。その中から最もウイルス作製の力価が高く、GFP および RFP の発現量が高いベクター pLV.SGb.PtR を採用することとした。

この最適化したベクターを用いることにより、緑色・赤色蛍光タンパク質の発現量の相関性が飛躍的に向上した。実際に、研究代表者が発見したアデノウイルス由来 miRNA (miR-VAIT3 および miR-VAIT5) の標的遺伝子をタンデムに連結したインジケータベクターを上記のレンチウイルスベクターを用いて構築し、HT1080 細胞に感染させたところ、フローサイトメトリー解析において斜めの線状プロットを示した (図 5)。これは緑色・赤色蛍光タンパク質の発現量が相関していることを示している。さらに、この細胞にアデノウイルスを感染させたところ、細胞集団全体が左側に移動した。すなわち、アデノウイルス由来 miRNA の発現に伴って、標的配列を有する GFP の発現量が低下したことを示している。同様の方法で内在性発現の miRNA 「let-7」を検出することに成功している。

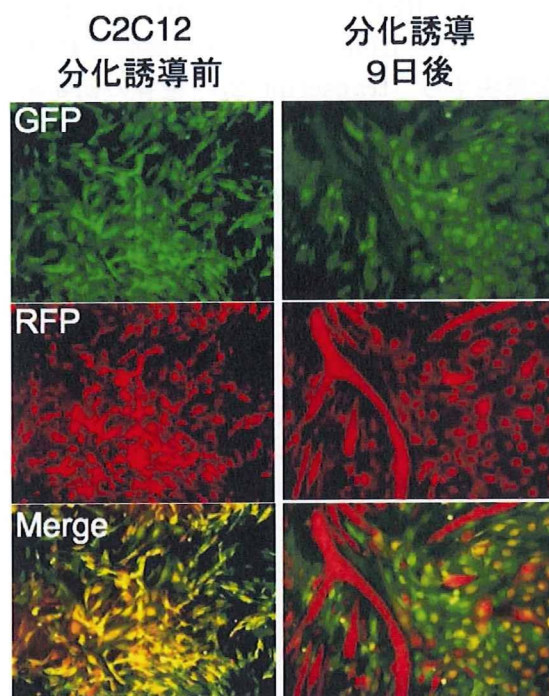


図 4 骨格筋特異的な発現を示す miR-133 の発現を、生きた細胞内で可視化することに成功した。GFP および RFP を搭載したレトロウイルスベクターを用い、マウス筋芽細胞 (C2C12) に感染させた。筋分化する際に miR-133 が特異的に発現することを見出した。

#### D. 考察

##### 分化における miRNA 可視化の重要性

今回システムの検証のために利用した miR-133 は、筋肉特異的な miRNA であるが、他にも組織特異的な miRNA が数多く知られている。また、疾病特異的 miRNA なども報告されるようになってきており、miRNA を標的とした分子診断の重要性は年々高まりつつある。

miR-133 においては、miR-133 の発現を調節する転写因子、血清応答因子 (SRF) が標的であることが最近明らかとされた。転写因子と miRNA は様々な生命現象において相互に調節し合うことが示唆されている。一つの miRNA が複数の遺伝子を標的

とし、また一つの遺伝子が複数の miRNA から調節されることを考えると、miRNA が関与している筋分化もまた、複雑な分子ネットワークを構築していると考えられる。これまでの知見に加えて、今回の解析結果から新たに、筋管形成に先立って miR-133 が発現してくることが明らかとなった。分化時の 1 細胞レベルにおける miRNA 発現のリアルタイム解析は、筋肉特異的 miR-133 だけではなく、他の miRNA 発現変動にとっても今後重要な解析ツールとして用いられることが期待される。

#### miRNA の継続的観測ツールとしてのレトロウイルスベクター

今回の研究では、2 色の蛍光タンパク質を使って miRNA を生きたまま観測するレトロウイルスベクター系を設計した。GFP 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-133 の標的配列を連結し、また、同一ベクター上に内部コントロールとして機能する RFP が独立して発現させた。配列内部リボソーム進入部位 (IRES) は、1 つの mRNA 上から複数のタンパク質を翻訳させることが知られているが、IRES が連結された mRNA は、siRNA によって mRNA が分解されてしまうことが知られている。したがって、今回の目的に IRES は使用できない。我々は今回 miR-133 による GFP の現象を観測したが、miR-133 の標的が無い場合 (MXCRGb) には変化が無かったことから、これはプロモーター影響によるものではない。同様のレンチウイルスベクター系を用いることによって、他の種類の miRNA、例えば、内在性の let-7 やアデノウイルス由来 miRNA も検出することが可能であった。また、レト

ロウイルスベクター中の miRNA 標的配列が繰り返されていることにより、内在性の miRNA が捕捉されて阻害を受けることが懸念されるが、我々の行なった C2C12 の誘導実験の結果を見る限りではそのような影響は無いようである。この件に関しては、miRNA の標的配列が完全に相補的であるならば、過剰に発現されていたとしても、素早いターンオーバーによって、miRNA の調節に影響を与えることはないとの報告例がある。

筋分化や筋管形成には通常 1 週間程度かかるため、レポーター遺伝子はその間、定常的に発現していなければならない。トランスフェクションから 3-4 日で減少してしまうプラスミドの導入とは違って、レトロウイルスベクターはゲノム DNA に挿入され、細胞分裂後も娘細胞へと伝播されていくため、恒常的な遺伝子の発現が期待できる。しかしながら、レトロウイルスベクターはランダムな位置でゲノム DNA に挿入されるため、挿入位置によっては、導入した遺伝子の発現に影響を受けるかもしれない。

現在、レトロウイルスベクターの欠点を補った新たなレンチウイルスベクターを開発中である。感染性を脊椎動物へと広げることによって miRNA の解析を *in vitro* の培養細胞だけでなく、*in vivo* の組織にも応用できることが期待される。我々の miRNA 可視化システムは、様々な生物学的現象における種々の miRNA の解析へと応用できるだろう。

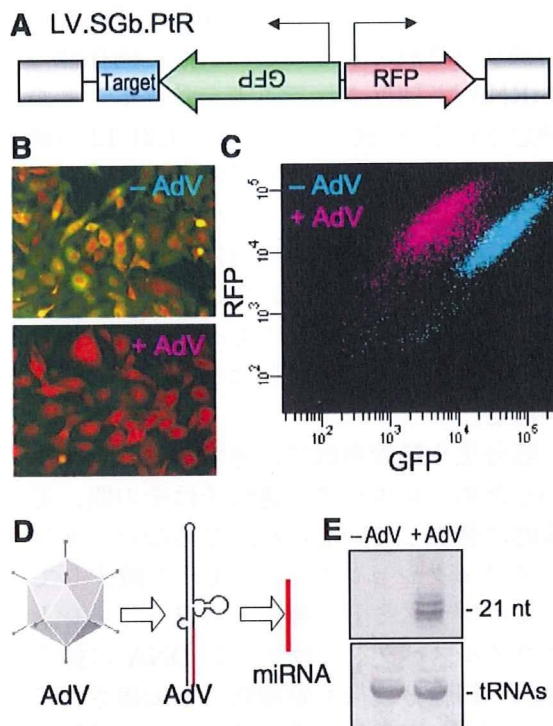


図5. 新規レンチウイルスベクター。A. ベクターの構造。B. アデノウイルスを感染させると (+AdV) 緑色蛍光が減少する。C. FACSを用いた蛍光強度の定量解析。D. E. アデノウイルス由来 miRNA の発現様式と、ノーザンプロットによる発現確認。

#### E. 結論

蛍光タンパク質遺伝子の非翻訳領域に、miRNA と完全に相補的な配列を挿入したウイルスベクターを構築し、miRNA の発現を生きた細胞内で検出する方法を構築した。筋肉特異的に発現する miR-133 について、筋芽細胞から筋細胞へと分化する際に発現上昇する miR-133 の様子を生きた細胞内でレシオイメージングすることが可能であった。生きた哺乳動物細胞内で miRNA を定量的に観測することに成功した世界初の例であり、今後様々な miRNA の解析に展開して行くことが期待される。

#### F. 健康危険情報

(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

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表



1. 書籍 なし

2. 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Ito Y</u> , Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, <u>Asahara H</u> .	The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation.	Proc Natl Acad Sci U S A.	in press		
Miyaki S, Sato T, <u>Inoue A</u> , Otsuki S, <u>Ito Y</u> , Yokoyama S, <u>Kato Y</u> , Takemoto F, Nakasa T, <u>Yamashita S</u> , Takada S, Lotz MK, Ueno-Kudo H, <u>Asahara H</u> .	MicroRNA-140 plays dual roles both in cartilage development and homeostasis.	Genes Dev.	in press		
Yokoyama S, <u>Ito Y</u> , Ueno-Kudoh H, Shimizu H, Uchibe K, Albini S, Mitsuoka K, Miyaki S, Kiso M, Nagai A, Hikata T, Osada T, Fukuda N, <u>Yamashita S</u> , Harada D, Mezzano V, Kasai M, Puri PL, Hayashizaki Y, Okado H, Hashimoto M, <u>Asahara H</u> .	A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58.	Dev Cell.	17(6)	836-848	2009
Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, <u>Inoue A</u> , <u>Kato Y</u> , Sato T, Lotz MK, <u>Asahara H</u> .	MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates IL-1 responses.	Arthritis Rheum.	60(9)	2723-2730	2009
Furumatsu T, Ozaki T, <u>Asahara H</u> .	Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin.	Int J Biochem Cell Biol.	41(5)	1198-1204	2009

Nishino J, Tanaka S, Matsui T, Mori T, Nishimura K, Eto Y, Kaneko A, Saisho K, Yasuda M, Chiba N, Yoshinaga Y, Saeki Y, <u>Seki A</u> , Tohma S.	Prevalence of joint replacement surgery in rheumatoid arthritis patients: cross-sectional analysis in a large observational cohort in Japan.	Mod Rheumatol.	19(3)	260-264	2009
関敦仁, 森澤妥, 高山真一郎, 日下部浩, 松本浩明, 高尾英龍, 池田幹則.	楔状採取骨の組み替えにより骨切り術を行った Madelung変形の1例.	第20回日本整形外科学会骨系統疾患研究会記録集.		47-49	2009
日下部浩, 高山真一郎, <u>関敦仁</u> , 森澤妥.	いわゆる成長痛と器質的要因による下肢痛との鑑別診断について.	日小整会誌.	18(1)	22-26	2009
Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, <u>Kawai S</u> , Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N.	A combination of biochemical markers of cartilage and bone turnover, radiographic damage and body mass index to predict the progression of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis treated with disease-modifying anti-rheumatic drugs.	Mod Rheumatol.	19(3)	273-282	2009
Nishio S, Yamamoto T, Kaneko K, Tanaka-Matsumoto N, Muraoka S, Kaburaki M, Kusunoki Y, Takagi K, <u>Kawai S</u> .	Pharmacokinetic study and Fcy receptor gene analysis in two patients with rheumatoid arthritis controlled by low-dose infliximab.	Mod Rheumatol.	19(3)	329-333	2009

Kojima F, Kapoor M, <u>Kawai S</u> , Yang L, Aronoff DM, Crofford LJ.	Prostaglandin E <sub>2</sub> activates RAp1 via EP2/EP4 receptors and cAMP-signaling in rheumatoid synovial fibroblasts: Involvement of Epac1 and PKA.	Prostaglandin s Other Lipid Mediat.	89(1-2)	26-33	2009
Inoue S, Hashiguchi M, Takagi K, <u>Kawai S</u> , Mochizuki M.	Preliminary study to identify the predictive factors for the response to methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis.	Yakugaku Zasshi.	129(7)	843-849	2009
Kunisch E, Jansen A, Kojima F, Löffler I, Kapoor M, <u>Kawai S</u> , Rubio I, Crofford LJ, Kinne RW.	Prostaglandin E <sub>2</sub> differentially modulates proinflammatory/prodestructive effects of TNF- $\alpha$ on synovial fibroblasts via specific E prostanoid receptors/cAMP.	J Immunol.	183(2)	1328-1336	2009
Inoue S, Hashiguchi M, <u>Kawai S</u> , Mochizuki M.	Erythrocyte methotrexate-polyglutamate assay using fluorescence polarization immunoassay technique: application to the monitoring of patients with rheumatoid arthritis.	Yakugaku Zasshi.	129(8)	1001-1005	2009

Koike R, Harigai M, Atsumi T, Amano K, <u>Kawai S</u> , Saito K, Saito T, Yamamura M, Matsubara T, Miyasaka N.	Japan College of Rheumatology 2009 guidelines for the use of tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in rheumatoid arthritis.	Mod Rheumatol.	19(4)	351-357	2009
Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, <u>Kawai S</u> , Takeuchi T, Azuma J.	Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study.	Ann Rheum Dis.	68(10)	1580-1584	2009
Kusunoki Y, Tanaka N, Kaneko K, Yamamoto T, Endo H, <u>Kawai S</u> .	Tacrolimus therapy for systemic lupus erythematosus without renal involvement: a preliminary retrospective study.	Mod Rheumatol.	19(6)	616-621	2009
<u>Kato Y</u> , Miyaki S, Yokoyama S, Omori S, <u>Inoue A</u> , Horiuchi M, <u>Asahara H</u> .	Real-time functional imaging for monitoring miR-133 during myogenic differentiation.	Int J Biochem Cell Biol.	41(11)	2225-2231	2009

3. 知的財産権の出願・登録状況 なし