

201018004B

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

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—

総合研究報告書

平成20年度～平成22年度

研究代表者 浅原弘嗣

平成23（2011）年3月

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

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—

総合研究報告書

平成20年度～平成22年度

研究代表者 浅原弘嗣

平成23（2011）年3月

目次

I. 総合研究報告書	
1. 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-----	1
2. 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-----	9
3. リウマチ性疾患、自己免疫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-----	15
4. 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に関する研究-----	21
5. リウマチ性関節炎に関連したマイクロ RNA を利用した関節炎治療に関する研究--	25
6. 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-----	29
7. 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-----	35
8. マイクロ RNA を検出するための蛍光プローブの設計と解析に関する研究-----	43
9. 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-----	49
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	59
III. 研究発表一覧表-----	75
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	85

I. 総合研究報告書

「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 国立成育医療研究センター研究所
システム発生・再生医学研究部部長

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 東邦大学医学部内科学講座（大森）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 国立成育医療研究センター外科系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
伊藤秀一 国立成育医療研究センター内科系専門診療部腎臓・リウマチ・膠原病科 医長
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 国立成育医療研究センター研究所システム発生・再生医学研究部 研究員
伊藤義晃 国立成育医療研究センター研究所システム発生・再生医学研究部 研究員
山下 聡 国立成育医療研究センター研究所システム発生・再生医学研究部 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 国立成育医療研究センター研究所システム発生・再生医学研究部 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來所した女性ボラ

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 CaCl₂ · 2H₂O, 0.098uM MgCl₂ · 6H₂O, 0.54μM 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 を不活化 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、細胞懸濁液のうちの 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。

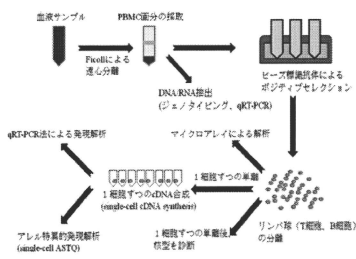


図 1 血液検体からの細胞分離の流れ

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。ウシ II 型コラーゲン (chondrex) を 0.05M 酢酸に溶解し (2mg/ml)、等量のプ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%, 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-arthritis agent, on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice and adjuvant arthritis in Lewis rats. Int. J. Tiss. React. 16: 155-162, 199

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。

アパ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、サフランin 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。

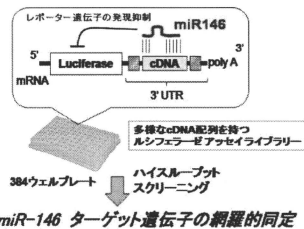


図 2 トランスレーション・アレイを構築することでシステムティックにマイクロ RNA の標的遺伝子によることが可能となる。

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康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院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さ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。

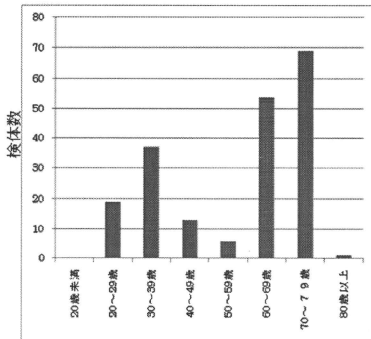


図3 健常者の血液検体の年齢別分布 (総検体数は 199 検体、すべて女性)

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康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康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

「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

柳谷隆宏 国立成育医療研究センター研究所
研究員

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

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。

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 Medium1640 (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% CO₂ 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

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

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 2×10^6 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 μ 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'-AAGTACCCGGTGGGTTTTG-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 で一晩固定した。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 μ 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 μ 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 Ptoeinase 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 μ l 添加してカバーガラスをかけ湿箱の中で 65°C 一晩反応させた。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 μ 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 μ l 添加してカバーガラスをかぶせて 4°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 μ 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)。

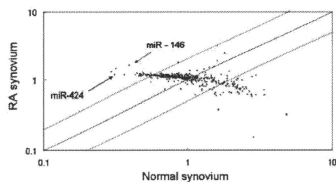


図 1 マイクロアレイ解析によるリウマチ性関節炎特異的マイクロ RNA の同定。

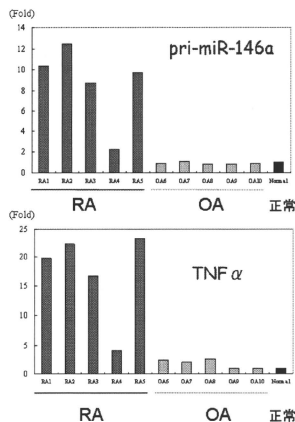


図 2 **miR-146a** は関節リウマチ特異的に発現上昇している。

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

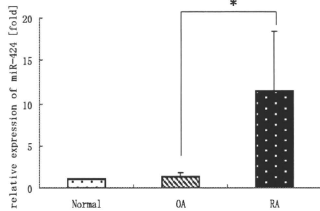


図3 関節リウマチ患者の滑膜組織 (n=4) と変形性関節症患者の滑膜組織 (n=4) と正常滑膜組織 (n=1) での miR-424 の発現. (*: P<0.05)

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 との相対値と比較した。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。

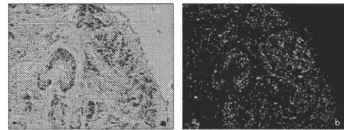


図4 滑膜細胞における miR-424 の局在。a) pri-miR-424 に対するプローブを用いて行った *in situ hybridization*。b) DAPI 染色。独立した実験を 3 回繰り返し、miR-424 が滑膜細胞に存在する全体の細胞で発現している事を確認した。

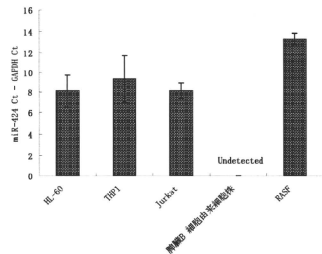


図5 各種細胞株での miR-424 の発現。左から、ヒト単球系由来細胞 HL60、THP1、ヒト T 細胞由来細胞株 Jurkat T 細胞、ヒト B 細胞由来細胞株、関節リウマチ滑膜繊維芽細胞 RASF。それぞれの細胞での miR-424 の発現を GAPDH で補正した。(n=4)

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 国立成育医療研究センター研究所
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 国立成育医療研究センター研究所
共同研究員

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 部位に導入したレポーターライブラリーを構築した (図 1)。

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

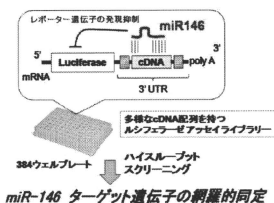


図1 トランスレーション・アレイを構築することでシステムティックにマイクロRNAの標的遺伝子を抽出することが可能となる。

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℃、5% CO₂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見した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。

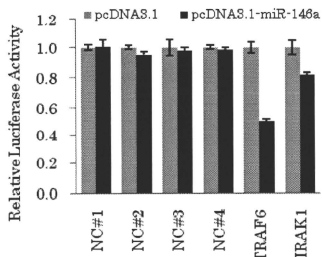


図2 ハイスループットスクリーニングシステムの検証結果。miR-146aの標的遺伝子であることが報告されているTRAF6、IRAK1を用いたポジティブコントロール群では、ルシフェラーゼ活性の低下が見られるが、ネガティブコントロール（NC#1~#4）群ではルシフェラーゼ活性の変化は見られない。

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	MOBK12A
302	10	SERPINF2
44	14	CASP10
84	15	KCNA2
86	17	SLC39A11
77	18	IKBKKG
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、IKBKKG 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、ハイスルーブ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。

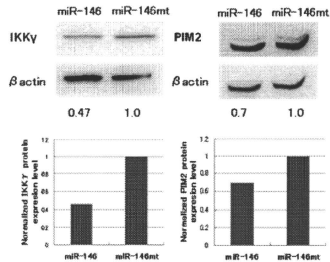


図4 miR-146a の標的候補遺伝子の miR-146a による発現抑制。ハイスルーブットスクリーニングシステムを利用して見出した miR-146a の標的候補遺伝子のうち、IKK γ (IKBKKG) と PIM-2 について、Western Blotting によって検証した結果、確かに miR-146a によってタンパク質レベルでの発現抑制が認められた。

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ブ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- β 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- β 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が可能にするものである。