

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つたため、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- κ 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- β 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、文献などから自己選別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- β シグナル経路において重要な役割を果たしている。TGF- β 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- β シグナルは TGF- β 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- β 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- β 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- β によって発現が誘導され、受容体制御型 Smad の TGF- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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 の標的をシステミックに探索する世界初の実験的スクリーニング系を開発・運用することに成功した。今後は、これまでの研究成果を踏まえて、マイクロ RNA の標的遺伝子がどのようにしてリウマチ性疾患の発症に関わっているのかについて明らかにする。リウマチ性疾患特異的マイクロ RNA である miR-146a の標的遺伝子のうち IKBKG は、NF- κ B の活性化に関わる因子や細胞増殖に関わる因子であり、miR-424 の標的遺伝子 (群) は、TGF- β シグナルの抑制因子である。これらの標的

遺伝子とマイクロ RNA の関係を詳細に調べ、マイクロ RNA の発現が上昇することによって上記シグナル伝達系にどのような影響を与え、結果としてどのような変化が起こるのかについて明らかにする。

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

F. 健康危機情報
(総括研究報告書に記載)

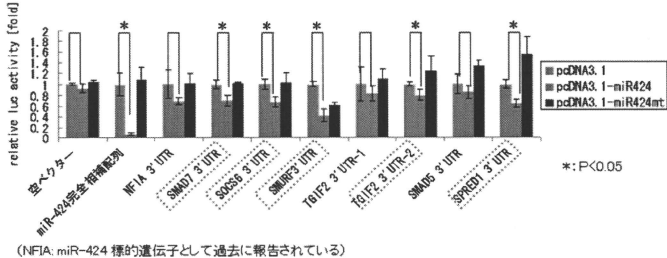


図5 miR-424の標的候補遺伝子に関するレポーターアッセイの結果。未報告の標的遺伝子として5遺伝子が抽出された。これらの遺伝子は、TGF- β シグナル伝達に関与する遺伝子群であった。

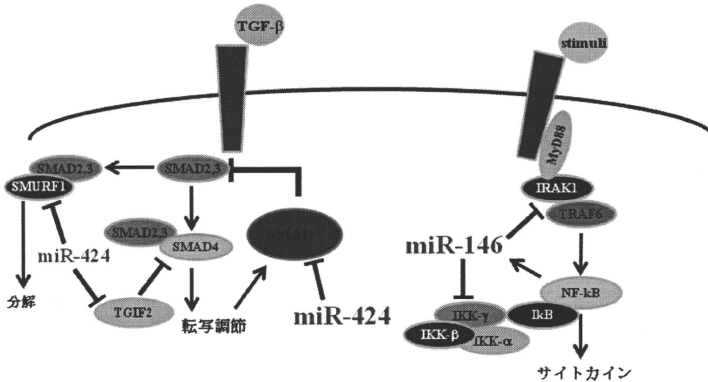


図6 miR-146aとmiR-424の標的遺伝子と各種シグナル伝達系に対する影響。miR-146aとmiR-424は、これらのシグナル伝達系に影響をおよぼすことによってリュウマチ性関節炎の発症に関与していると予想される。

「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 の障害核酸の治療効果の検討」に関する研究

研究要旨

リウマチ性関節炎とそれに伴う関節破壊には、現在の生物製剤治療では治癒できない症例も多く、既存の医薬品とは異なった作用機序による新しい治療法の開発が期待される。

従来の抗リウマチ生物製剤は、炎症反応に関与するサイトカインの機能を阻害して炎症反応を緩和することを目的とした抗体医薬であった。一方、我々が見出したリウマチ性関節炎に関連したマイクロ RNA はリウマチ性関節炎の発症において重要な役割を果たしていると考えており、このマイクロ RNA の機能を阻害したり、または、高めたりすることによって、リウマチ性関節炎の治療に応用する可能性が考えられた。そこで、本研究では、マイクロ RNA を分子標的とした新しい治療法を開発するための基盤研究を推進するため、関節炎モデルマウスを使った予備検討と本実験のための実験系の構築を行った。

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

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

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うための基盤研究を行った。

B. 研究方法

マイクロ RNA のアンチセンスオリゴ導入による関節炎への影響 6 週齢の雄性 DBA/1 マウスに抗 II 型コラーゲン抗体カクテル(chondrex)を 200 μ l 尾静脈投与し、2 日後に腹腔内に LPS 投与を行うことで関節炎モデルを作製した。この 2 日後、アパーチン麻酔下にて膝の皮切開を行い、目視下で確認した関節包内に LNA 付加した miR-146a の相補配列、antisense-miR-146a を 10 μ g インジェクションして、炎症状態における miR-146a の抑制作用を検討した。なお、対照群には miR-146a の seed 配列に変異を加えたアンチセンス鎖を同様に作成して関節内投与を行った。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て、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い、脱水・透徹後、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 染色により滑膜を中心とした関節構成体への影響を検討した。

コラーゲン惹起関節炎モデル作製 6週齢の雌性 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 型コラーゲンをプ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 cytoenin, a novel anti-arthritis agent, on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice and adjuvant arthritis in Lewis rats. Int. J. Tiss. Reac. 16: 155-162, 1999

アデノウイルスベクターの作製 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う。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。

ベクター接種・解析 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% 硝酸と 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。

C. 研究結果

今回、行ったアンチセンスオリゴを用いた miR-146a の機能阻害によるリウマチ性関節炎に対する影響を調べた検討では、安定した結果が得られず、最終的な結論を得ることは出来なかった。一方、miR-146a 過剰発現実験のためのアデノウイルス発現ベクター、およびコントロールベクターはすでに構築が完了しており (図 1)、現在、II 型コラーゲン誘導関節炎モデルマウスを用いた検討を開始している。今年度中での結論は得られなかったものの、来年度における研究計画での最重要課題として位置づけ、研究を進める。

D. 考察

miR-146a のアンチセンスオリゴを抗 II 型コラーゲン抗体カクテル惹起マウスの関節に導入した実験では、安定した結果が得られず結論を得ることは出来なかった。その理由として、1) 抗 II 型コラーゲン抗体カクテル誘導による関節炎は体内での T 細胞・B 細胞の免疫反応をスキップしているため、関節リウマチに見られるような免疫反応の関与が少ない炎症反応のみが主体のモデルであり、2) 関節炎症状もピークを過ぎると急激に低下することから、急性炎症を反映するモデルであったためであると

考えられる。そこで、以後、より関節リウマチに発生機序の近いコラーゲン惹起関節炎モデルを用いて実験を進めることとした。

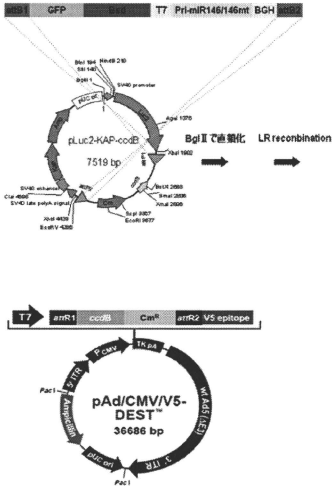


図1 miR-146a の過剰発現実験用のアデノウイルスベクター. 同様の方法で miR-424 の発現ベクターも構築した.

また、今後の研究では、慢性炎症状態だけでなく正常滑膜を始めとする関節構成体への miR-146a の作用を検討するため、miR-146a を発現するアデノウイルスベクターを用いた関節内での強制発現実験を進める。また、miR-424 に関しても、同様の実験を進める予定である。miR-424 の過剰発現用アデノウイルスベクターおよびコントロールベクター(miR-424 の seed 配列部分に変異をいれたもの)の構築は完了しており、来年度中に一定の成果を得ることを目標としている。

E. 結論

今回の検討では、疾患モデルマウスの作

成方法に欠点があったため、miR-146a のアンチセンスオリゴによる機能阻害と関節炎への影響については、結論を見出すことが出来なかった。今後は、コラーゲン惹起関節炎モデルマウスを作成して、このマウスに対する miR-146a の過剰発現実験やアンチセンスオリゴの導入実験を行い、miR-146a の疾患発症における役割についての解析や治療ターゲットとしての可能性についての検討を行う。また、同様の検討を、miR-424 に関しても行う。

F. 健康危機情報
(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

「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

研究要旨

我々は、リウマチ性疾患に関連したマイクロ RNA、miR-146a を見出し、miR-146a に着目した関節炎治療への応用が期待された。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、新規治療法の確立における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 miR-146a の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検討を進めた。

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

A. 研究目的

従来、リウマチ性関節炎の薬物治療において、NSAIDs や DMARDs、ステロイド、免疫抑制剤などが個々の症状に併せて適応されてきた。近年においては、リウマチ性関節炎に対する生物製剤が開発され、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治療が試みられている。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、miR-146a を見出し、miR-146a に着目した関節炎治療への応用が期待された。リウマチ性関節炎の滑膜組織においては、miR-146a の過剰発現状態が観察される。miR-146a は、TNF- α によるシグナル伝達を抑制する役割が考えられており、関節リウマチのような慢性的な炎症状態においては、TNF- α の作用が上回って、ブレーキとなる miR-146a の効果が不十分となっており、それを補償するために結果的に過剰発現状態を惹起するものと考えられている。そのため、関節炎患部において miR-146a

を過剰発現させることにより、TNF- α の作用を減弱させ慢性化した局所炎症を緩和する可能性が考えられた。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、新規治療法の確立における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 miR-146a の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検討を進めた。

B. 研究目的

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)、等量のフロイント完全アジュバント (4mg/ml *M. tuberculosis* strain H37Ra, chondrex) 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。21 日後、同様に調整したウシ II 型コラーゲン (2mg/ml) をフロイント不完全アジュバント (chondrex) で乳化し腹腔内に 100 μ l 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, 199

関節炎の評価 初回免疫より 28 日目より関節炎による関節部の腫脹や皮膚などの赤変についてスコア化して記録した。スコアは、四肢の腫脹・炎症を 0 から 4 までの 5 段階で評価した。0 点は全く変化が見られない場合、4 点は赤く大きく腫れた状態の場合に用いた (Brand DD. et al., *Nat Protoc* 2007;2(5))。1 個体当たり最高 16 点を関節炎の評価のスコアとした。

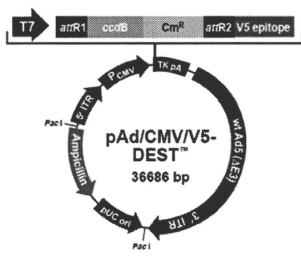


図1 miR-146a の過剰発現実験用のアデノウイルスベクター。同様の方法で変異 146a、LacZ の発現ベクターも構築した。

アデノウイルスベクターの作製
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。同時に、LacZ 遺伝子を導入したベクターも準備した。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、HEK293 細胞に遺伝子導入して

数回増幅を行う。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。

ベクター接種・解析 各群 (146a wild type 群、146a mutant 群、lacZ 群) のマウスの関節炎症状のスコアが 6 点前後になったところで (初回免疫より 35 日目)、アデノウイルスベクターの導入を行った。インフルラン吸入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 10 μ l (1.0E+8 PFU) インジェクションして遺伝子導入を行った (両膝関節包内)。さらに、踵周辺の皮下と前肢にもそれぞれ 10 μ l (1.0E+8 PFU) インジェクションした。本実験に際して、PBS 投与群も作成して、膝関節、踵・前肢に PBS を各 10 μ l づつ投与した。初回免疫より 55 日目までスコアを記録したあと、マウスを頸椎脱臼により安楽死させて膝関節、および踵部を採取した。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。

C. 研究結果

昨年度までに構築を終わらせている miR-146a 過剰発現実験のためのアデノウイルス発現ベクター、およびコントロールベクターを用いて実験を行った (図 1)。II 型コラーゲン誘導関節炎モデルマウスを作製したところ、初回免疫から 5 週間後までには明らかな関節炎症状が認められた (図 2)。本計画は、miR-146a によるリウマチ性関節炎の「予防効果」を見出すことに主眼を置いた研究ではなく、関節炎発症後の「治療効果」に注目したものであるため、明らかな関節炎症状が発症したのちにアデ

ノウイルスベクターの接種を行う必要があった。そこで、関節炎症状を評価するときのスコアの最大値の1/3の値に達した時点で各種アデノウイルスベクターの接種を行い、その後の症状の変化について追跡することとした。また、治療効果の評価はスコアの値を用いて行うため、スコア化の対象となる四肢にアデノウイルスベクターを接種する必要があった。そこで我々は、前肢（手～首）、後肢（踵、膝）にアデノウイルスを接種した。

その結果、miR-146aのwild typeを過剰発現させた群は、その他の群に比べて有意にスコアの値が低くなった(図3)。なお、LacZ群に関しては、実験の後半で不慮の事故のため最終日までの検討を行う事が出来なかったが、途中経過について解析すると、やはりwild type群の方がLacZ群よりもスコアの値が有意に低くなる事が分かった。これらの結果は、miR-146aが炎症の慢性化を抑制することによって関節炎症状を悪化させない働きがあることを示唆している。

D. 考察

マイクロRNA(miR)は、遺伝子発現を転写後調節する機能性RNA分子であり、発生や細胞分化などの重要な細胞プロセスに関与している。これまでに我々は、リウマチ性関節炎の滑膜組織において発現上昇する疾患関連マイクロRNAとしてmiR-146aを同定している。miR-146aは、炎症性サイトカインであるTNF- α のシグナル伝達に関わる分子(IRAK1, TRAF6)の発現を抑制する。

一方で、TNF- α は、リウマチ性関節炎における病態の進行や増悪に関わる分子であり、患者においては何らかの理由で発現制御が破綻して過剰発現していることが知られている。そこで、我々は、リウマチ性関節炎のモデルマウスを作成し、関節炎の病態形成においてmiR-146aがどのような影響を及ぼすのかについて検討した。本課題は、

miR-146aを利用したリウマチ性関節炎の治療を目指した研究である。

A) normal



B) CIA (day 35)



図2 II型コラーゲン誘導関節炎モデル。II型コラーゲン非投与群。B)II型コラーゲン投与群(初回免疫より5週間経過)

関節炎モデルマウスは、DBA1/JにウシII型コラーゲンとフロイント完全アジュバントを投与して作成した。初回免疫から21日後にウシII型コラーゲンとフロイント不完全アジュバントを投与して、マウスの四肢の浮腫を指標にスコア化(最大16点)して観察を行った。スコアが6点(最大値の約1/3)を超えた頃(初回免疫から32日目)、マウスmiR-146aの過剰発現システムとしてアデノウイルスベクターを両手、両足首、膝関節に投与した。これは、本計画がmiR-146aによるリウマチ性関節炎の「予防効果」を見出すことに主眼を置

いた研究ではなく、関節炎発症後の「治療効果」に注目したものであるためであった。

その結果、miR-146a を過剰発現させた群は、他の3群に比べて有意にスコアが低下していた。この結果は、1) 初期の段階で関節炎はすべての群で同様に発症したが、2) miR-146a を過剰発現させた群では TNF- α によるシグナル伝達、または TNF- α による自身の発現ループを遮断することにより関節炎が慢性化・増悪化しなかったものと考えられる。一方、3) 他の3群では TNF- α による炎症反応が増悪してしまったのではないかと考えられる。現在、上記の研究について切片の解析を行うとともに、再現性の確認、および、miR-146a を過剰発現させるタイミングを変えた場合の効果について調べている。

E. 結論

今回の検討によって、miR-146a を過剰発現させることにより、関節炎の慢性化・増

悪化を抑制することが示された。今後、同様の実験によって再現性を得る必要があるものの、他の炎症指標や炎症性サイトカインの発現レベルなども併せて調べ、miR-146a の過剰発現による炎症局部での変化の本質を明らかにしなければならない。

F. 健康危機情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

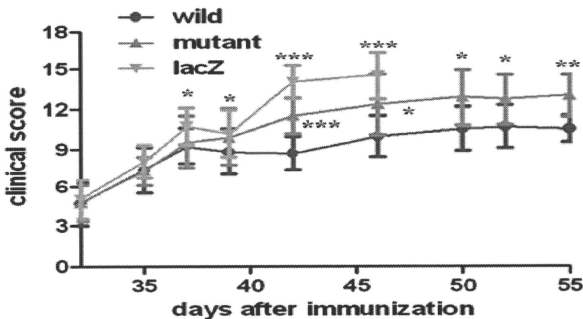


図3 関節炎モデルマウスにおける miR-146a の過剰発現による関節炎症状の緩和。miR-146a wild type を過剰発現させた群では、他の群 (146a mutant, lacZ) に比べて関節炎症状のスコアの値が有意に低下していた。 *;p<0.05, **;p<0.01, ***;p<0.001, Mann-Whitney U test

「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

柳谷隆宏 国立成育医療研究センター研究所
研究員
伊藤義晃 国立成育医療研究センター研究所
研究員
山下 聡 国立成育医療研究センター研究所
研究員

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。

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するため、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

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℃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

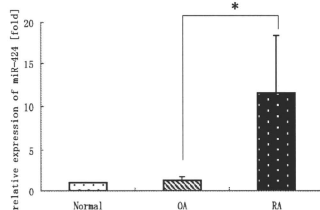


図1 関節リウマチ患者の滑膜組織 (n=4) と変形性関節症患者の滑膜組織 (n=4) と正常滑膜組織 (n=1) での miR-424 の発現 (*: P<0.05)

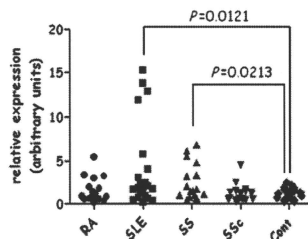


図2 様々な自己免疫疾患患者における miR-424 の発現解析。末梢血 T 細胞における発現レベルを健常者との間で比較した。

(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、シェーグレン症候群、強皮症および健常な女性由来の末梢

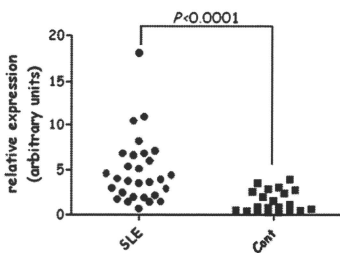


図3 全身性エリテマトーデスにおけるmiR-424の発現解析。別セットの患者・健康者サンプルを用いて replication study を行った。

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康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康者について、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、

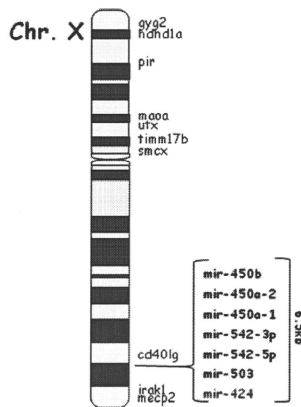


図4 miR-424 は複数のマイクロ RNA とクラスターを形成している。

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。患者および健康者の末梢血 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。

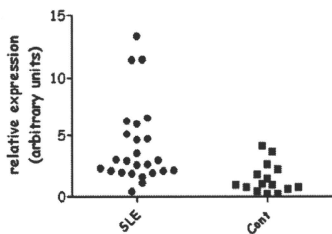


図5 全身性エリテマトーデス患者における miR-503 の発現解析。

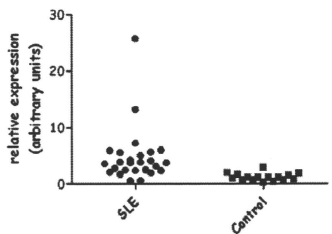


図6 全身性エリテマトーデス患者における miR-542-5p の発現解析。

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。

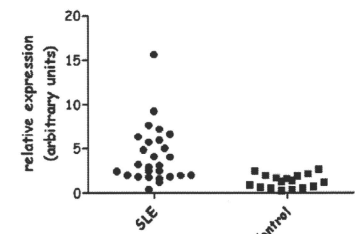


図7 全身性エリテマトーデス患者における miR-450a の発現解析。

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

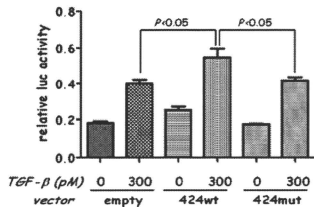
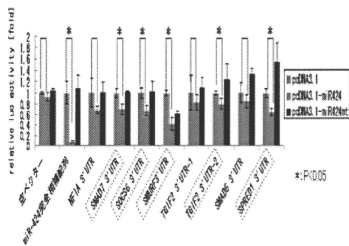


図10 miR-424 の過剰発現は TGF-β シグナルを増強する。



(P<0.05) miR-424 標的遺伝子に対して過剰に発現されている

がある。

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。

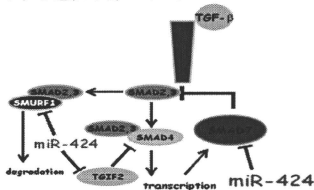


図9 miR-424 の標的遺伝子と各種シグナル伝達系に対する影響。miR-424 は、これらのシグナル伝達系に影響をおよぼすことによってリウマチ性関節炎の発症に関与していると予想された。

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。

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

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 XenonRNA 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。1 unit 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 μ l ずつに分注して、それぞれに 43 μ l の multiplex PCR 反応液を加えて全量を 50 μ l とした。PCR は 95°C で 3 分間の反応のち、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'-CTATGAACCTTTCCCTAGGAGGCC-3' and 5'-CTTTATGTTTCTCCAGGTCCTCTAC-3', TIMM17b; 5'-AGCACAGCCCCGGTCAATG-3' and 5'-GTGCCAATGCTGTGAGGATCC-3', MECP2; 5'-GAATGATGCCACCCAACAGAAGATTG-3' and 5'-ATACTGTATGTGTCGAGCTCCC-3', IRAK1; 5'-GGCCTGGCTTGGTAGAAGAAG-3' and 5'-ACCTTCTCTCCCCAGCTTTTC-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 150μl) のうち、3μl 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'-GGAGGTAGCTTCGCAGTGT-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-AGGGCTTGGAACCCAG-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 (%) = $100 - (\% \text{ of FAM-allele expression})$ 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-CTGGCGCTTCCACCAC-NFQ-3'

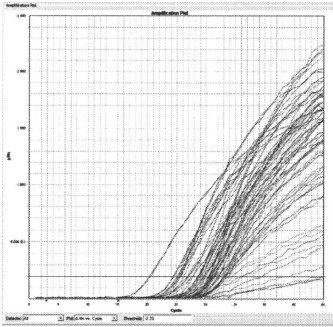


図1 TFRC の1細胞レベルでのアレル特異的発現解析の結果。蛍光シグナルの増幅曲線から、両アレルからの遺伝子発現を示唆している。

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

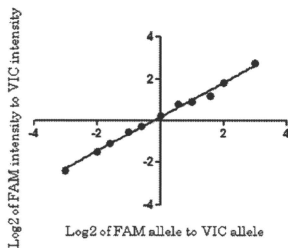


図2 TFRC のアレル特異的発現解析で使用した検量線。

（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。

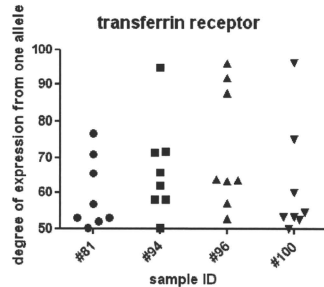


図3 TFRC の1細胞レベルでのアレル特異的発現解析の結果。検量線を用いて各アレルからの遺伝子発現割合を算出した。グラフの縦軸は片方のアレルからの遺伝子発現割合を示しており、60%の場合、もう片方のアレルからの発現割合は40%であることになる。

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

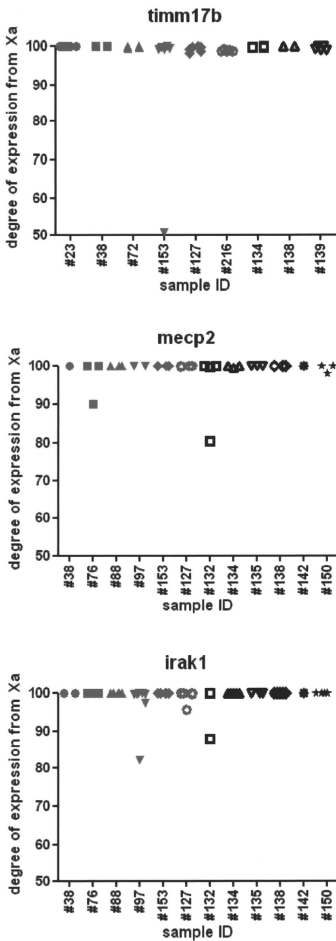


図4 TIMM17B、MECP2、IRAK1に関する1細胞レベルでのアレル特異的発現解析の結果。赤で示したドットはSLE患者群、黒で示したドットは健康者群を表す。縦軸は活性化X染色体からの発現割合を示す。横軸は患者・健康者のID番号を表す。ほ

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、健康者および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、健康者群の