

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出
2. 研究開発課題名：RNA 階層における炎症の時間軸制御機構の解明
3. 研究開発代表者：浅原 弘嗣

(東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 システム発生・再生医学分野 教授)

## 4. 研究開発の成果

## (A) miRNA の網羅的同定と個体レベルでの miRNA の炎症制御機能の解析

新規 miRNA の一つは RA 滑膜で発現が上昇していることが明らかとなったが、滑膜細胞と血球系細胞を分離し発現を調べると、血球系の細胞に発現していた。そこで、どの血球細胞に発現しているかを特定するため、細胞を分画に分けて解析したところ、顆粒球に高発現していることが明らかにされた。

滑膜組織には過去に報告のあるエディティングが検出された。これらのエディティングがどの細胞内で誘導されているのかを同定したところ、滑膜表層または表層直下の細胞であることが明らかとなった。滑膜細胞へ miRNA を移入することにより、細胞増殖の抑制や細胞外基質遺伝子発現の低下が誘導された。動物実験により同様の作用が確認され関節炎が抑制されたことにより、注目した miRNA が RA においても関節炎に抑制的に作用していることが示唆された。また、miRNA にエディティングが誘導されることによりその抑制作用が増幅されている可能性が示された。

## (B) miRNA および RNA 結合タンパク質のターゲットの同定と制御機構の解析、および miRNA のターゲット認識機構の検討

miRNA のターゲットを同定するシステムとして、ルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に全長 cDNA 配列を導入したレポーターライブラリーを構築し、miRNA 発現ベクターとコトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイをすることで、標的遺伝子をスクリーニングする手法を開発した。本スクリーニング法により、miRNA のターゲット遺伝子の同定を行った。これにより、miRNA によって直接制御される既知および未知の標的遺伝子を同定することに成功し、標的遺伝子のスクリーニングシステムが有用であることを示した。

## (C) miRNA の発現制御機構の解明

炎症を抑制する miRNA である miR-146a は炎症刺激後すぐに転写されるが、成熟 miR-146a は 24h ほどで発現のピークを迎える。そのためこのプロセッシングの制御機構の破綻が炎症の慢性化に関わっている可能性がある。miR-146a のプロセッシングの制御因子を同定するために、miR-146a の相補配列をルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に持つセンサーレポーターと約 6000 遺伝子の発現ベクターをコトランスフェクションし、センサーレポーターの活性を変化させる遺伝子のスクリーニングを行い、その中で miR-146a のプロセッシングを促進する遺伝子を同定した。

## (D) 転写後調節ネットワーク、miRNA 非依存性制御機構の解明

慢性炎症の病態形成に必須の IL-6 などのサイトカインを RNA レベルで制御する RNA タンパクの細胞レベルでのスクリーニングを行い、サイトカインの mRNA の安定性や翻訳効率を制御する分子を同定した。上記遺伝子を欠失したマウスを作製し、サイトカインの発現に重要な役割を果たすことを明らかにし、その詳細なメカニズムを検討した。一部のタンパクは関節リウマチの患者サンプルにおいて発現が上昇していることから、慢性炎症疾患の病態における機能が示唆された。