

●ファイザーフェローシップ報告

肺組織修復とマイクロ RNA

—そして再生へ—

佐藤 匡

緒 言

2007年度(第7回)日本呼吸器財団ファイザーフェローシップによる助成を受け、2007年4月から2010年3月までの3年間にわたり、アメリカ・ネブラスカ州のネブラスカ大学メディカルセンターでの研究留学の機会を得ることができた。師事した Dr. Stephen I. Rennard は、慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) を主な対象疾患とし、多くの日本人研究者と数多くのすばらしい研究をされている。本稿では、著者が留学中に行った研究について報告する。

研究の背景：マイクロ RNA とは

これまで、遺伝形質の発現は、DNA 複製→転写→RNA 発現・翻訳→蛋白質合成の経路を経て遺伝情報が伝達された結果であるとする、セントラルドグマ仮説に基づいて説明されてきた。しかし近年、DNA 配列の変化を伴わない遺伝子変異機構、すなわちエピジェネティクスの機構が見いだされてきた。さらに、DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティクスの制御に、マイクロ RNA と呼ばれる低分子 RNA が重要な役割をもつことが明らかとなりつつある。

マイクロ RNA とは、約 22 塩基の短い一本鎖 RNA で、蛋白質への翻訳がなされないノンコーディング RNA の一種である。マイクロ RNA の端緒は、1993年に Lee らによる線虫 *Caenorhabditis elegans* の研究において、small temporal RNA として記述された lin-14 とされているが¹⁾、その後マイクロ RNA はさまざまな植物および動物で確認されており²⁾、ヒトにおいてもこれまでに 1,000 種類近くのマイクロ RNA が同定されている。マイクロ RNA の発現は、発生段階、組織または細胞種によりそれぞれ異なっており、翻訳レベルで遺伝子発現を

制御、おもに抑制すると考えられる。最近では、全遺伝子の約 60% がマイクロ RNA によって制御されていると推測されている³⁾。これまでに、マイクロ RNA は、発生や細胞死、細胞増殖といった多くの生物学的プロセスに関与することがわかってきており、さまざまな疾患との関連についての報告が増え続けている。

近年のマイクロ RNA 研究の進捗に合わせて、肺・呼吸器領域においてもマイクロ RNA 関連の報告が増加しており⁴⁾、さまざまな呼吸器疾患の病態における重要な役割が今後さらに解明されていくものと予想される。また、マイクロ RNA が呼吸器疾患における新たな治療ターゲットとなる可能性も期待される。

肺組織修復とマイクロ RNA

Rennard らは肺組織修復における線維芽細胞の役割に注目し、COPD 患者由来の肺組織から分離培養された線維芽細胞の解析を行った。線維芽細胞が産生する主要な炎症メディエーターであるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) は、線維芽細胞上にある受容体を介して、線維芽細胞自体の遊走、増殖、細胞外基質産生能を低下させることがわかっており⁵⁾⁶⁾、さらに COPD 由来の線維芽細胞では、定常状態での PGE₂ の産生が非 COPD 喫煙者由来の線維芽細胞と比べて高くなっており、遊走能などの細胞機能も低下していることが報告されている⁷⁾。

そこで我々は、ほぼ同様の喫煙歴を有する COPD と非 COPD コントロール肺由来の線維芽細胞に、インターロイキン (IL)-1 β および腫瘍壊死因子 (TNF)- α といった炎症性サイトカインを反応させたところ、COPD 線維芽細胞では、コントロール細胞よりも格段に多くの PGE₂ が産生されることを見いだした⁸⁾。そのメカニズムとして、PGE₂ 産生に関わる酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX)-2 のメッセンジャー RNA (mRNA) の安定性が、COPD において有意に亢進していることを見いだした。COX-2 mRNA の安定性に何らかのマイクロ RNA が関与するのではないかという仮説から、マイクロ RNA 解析を用いて肺線維芽細胞のマイクロ RNA の発現解析を行った。炎症性サイトカインにより発現が

連絡先：佐藤 匡

〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1

順天堂大学大学院医学研究科呼吸器内科学

(E-mail: satotada@juntendo.ac.jp)

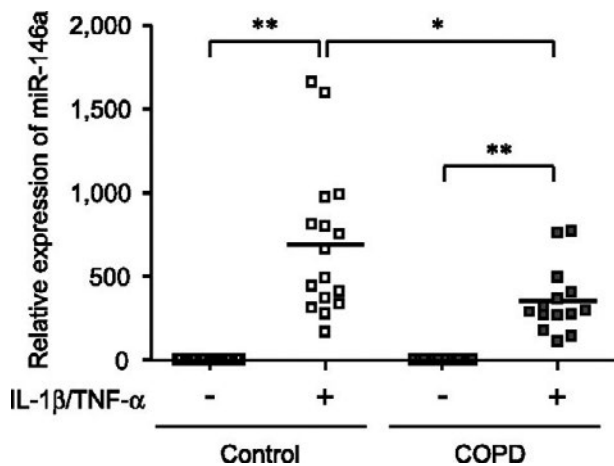


Fig. 1 MiR-146a expression following IL-1 β and TNF- α (IL-1 β /TNF- α) stimulation by COPD and control fibroblasts. Effect of IL-1 β /TNF- α on miR-146a expression by real-time PCR. Fourteen COPD and 16 control cell strains were stimulated with or without cytokines (2 ng/ml each) for 24 h. MiR-146a expression is normalized to the amount of rRNA and expressed as $2^{-\Delta\Delta C_T}$ values. Each dot represents a separate subject. * $p < 0.01$, ** $p < 0.0001$.

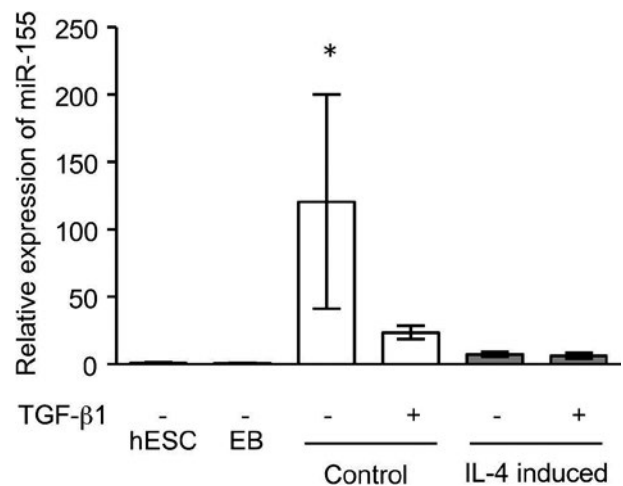


Fig. 3 MiR-155 expression in undifferentiated hESCs, EBs, and differentiated fibroblast-like cells. Cell layers of differentiated cells were extracted after 48 h treatment with or without TGF- β 1 (100 pM). MiR-155 expression by real-time PCR is normalized to the amount of rRNA and expressed as $2^{-\Delta\Delta C_T}$ values. * $p < 0.01$, compared with other groups.

誘導され、かつ、COPD 肺線維芽細胞とコントロール細胞で発現が異なるものを抽出し、さらにオンラインデータベースを利用したマイクロ RNA のターゲット遺伝子解析により COX-2 との対合性があるものを絞り込み、最終的に miR-146a を候補マイクロ RNA として抽出した。

miR-146a は、炎症性サイトカインなどで誘導されるマイクロ RNA として、免疫応答あるいは発癌に関連した報告がなされている⁹⁾¹⁰⁾。我々は、定量 PCR 法を用いて、肺線維芽細胞での miR-146a 発現を検討した。その結果、COPD 細胞、コントロール細胞とも定常状態では低発現で、IL-1 β および TNF- α により著明に発現が誘導された。しかしながら、COPD 肺線維芽細胞ではコントロールと比べて、miR-146a の発現誘導が有意に軽度であった (Fig. 1)。さらに、miR-146a が COX-2 mRNA に直接結合し、その安定性を低下させることで、COX-2、さらには PGE₂ の発現に対して抑制的に働くことを確認した。COPD においては炎症性サイトカイン刺激に伴う miR-146a の発現誘導が不十分であるために、COX-2 および PGE₂ が過剰に上昇し、炎症が遷延すると考えられた (Fig. 2)。すなわち、miR-146a は、COPD の重要な病態である「異常な炎症反応」を制御することで、肺組織修復の新たなメディエーターとなりうると考えられる。

また、別のプロジェクトとして、我々は ES 細胞あるいは iPS 細胞といった未分化幹細胞から、コラーゲンゲル内 3 次元培養を用いて、線維芽細胞を分化誘導する方

法を確立した¹¹⁾。さらに、3 次元培養中の培地に IL-4 を添加すると、分化誘導された線維芽細胞は、通常の培地を用いて誘導された細胞 (コントロール細胞) と比べ、コラーゲン収縮能、遊走能、フィブロネクチン産生能の亢進といった「fibrogenic」なフェノタイプをもつことを見いだした¹²⁾。こうして誘導された線維芽細胞に対して、マイクロ RNA プロファイリングを行ったところ、IL-4 を用いて分化誘導された細胞において miR-155 が極端に低発現であることがわかった (Fig. 3)。

miR-155 は多機能性マイクロ RNA として知られ、悪性腫瘍、関節リウマチ、心血管疾患などとの関連が報告されている。呼吸器疾患では Pottier らが、keratinocyte growth factor を標的遺伝子として、肺線維化に関わることを報告している¹³⁾。今回、miR-155 低発現である IL-4 誘導の線維芽細胞に miR-155 のトランスフェクションを行ったところ、コラーゲン収縮能、遊走能、フィブロネクチン産生能がそれぞれコントロール細胞と同程度に制御されるという結果を得た (Fig. 4)。このことから、miR-155 もまた、線維芽細胞が関与する組織修復の制御因子となりうると考えられる。

そして再生へ

肺・呼吸器に対する再生研究は、その発生学および構造学的複雑性から他臓器に比較して立ち遅れているのが現状である。今回の一連の研究より、miR-146a、

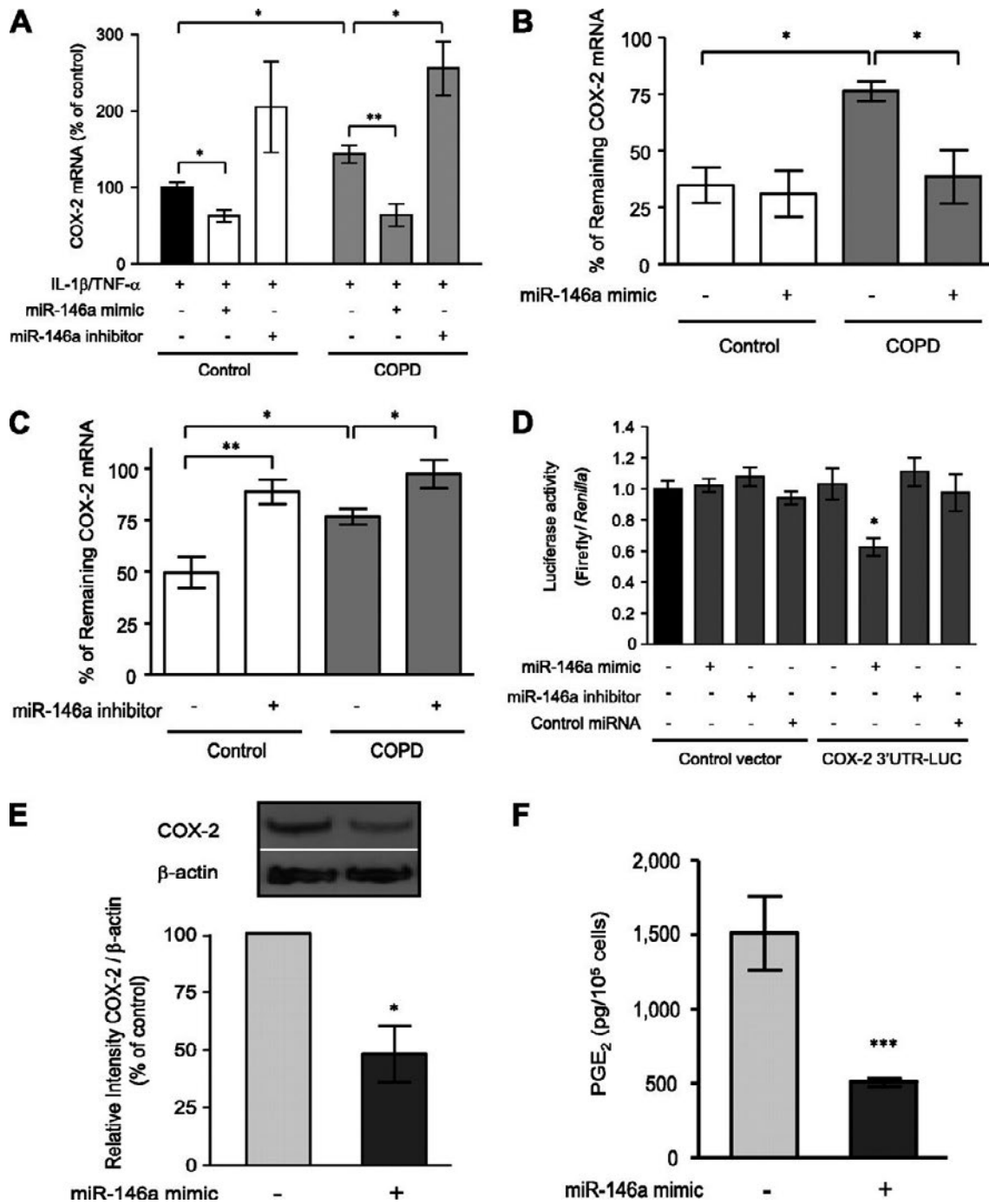


Fig. 2 MiR-146a regulates COX-2 expression and PGE₂ production via a direct binding to 3' UTR of COX-2 mRNA. (A) Effect of miR-146a mimic or inhibitor on COX-2 mRNA expression. COX-2 mRNA expression represented as a percentage of control (indicated as a black bar). (B) Effect of miR-146a mimic on COX-2 mRNA stability. (C) Effect of miR-146a inhibitor on COX-2 mRNA stability. COX-2 mRNA was assessed after 6 h treatment of actinomycin D (2 μ g/ml) following IL-1 β and TNF- α stimulation and is expressed as a percentage of mRNA level at the time of adding actinomycin D. (D) Direct binding of miR-146a to COX-2 3' UTR-LUC construct. Cells were cotransfected with a COX-2 3' UTR-LUC construct, control vector, miR-146a mimic, miR-146a inhibitor, and control miRNA. Cell layers were harvested 48 h after transfection, and LUC activities were determined by Dual-Luciferase assay. Data are normalized to *Renilla* LUC activity and expressed as a relative value to control (indicated as a black bar). (E) Modulation of COX-2 protein in cytokine-treated COPD fibroblasts by miR-146a mimic. Densitometric quantification of COX-2 is expressed relative to control after normalization to β -actin. (F) Effect of miR-146a mimic on PGE₂ production by cytokine-treated COPD fibroblasts. Two strains each of COPD or control cells were evaluated on three separate occasions in all experiments. Values are mean \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

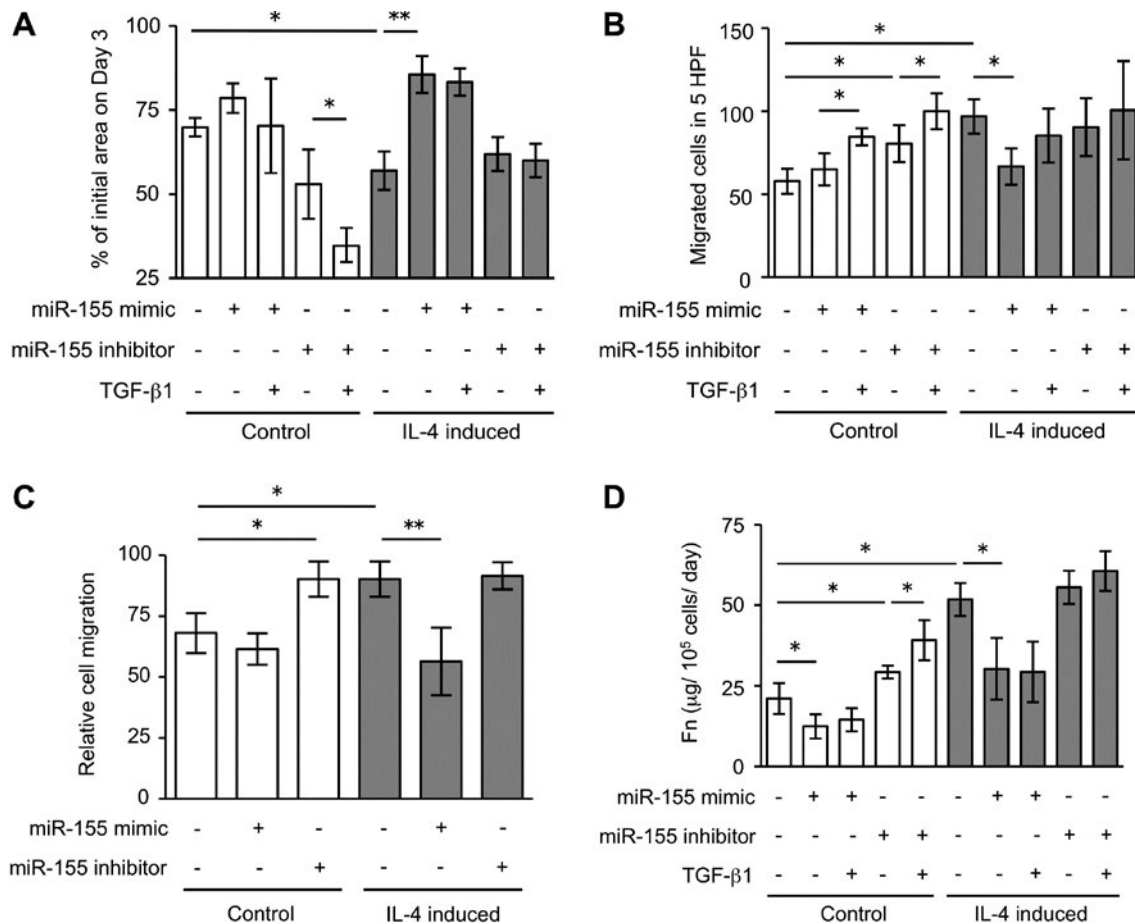


Fig. 4 MiR-155 regulates the differentiated fibroblast-like cell phenotype. (A) Collagen gel contraction on day 3. (B) Chemotaxis toward fibronectin. (C) Cell migration by wound closure assay. (D) Fibronectin production. Three different batches of control and IL-4-induced cells were evaluated on three separate occasions in all experiments. Values are mean \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01.

miR-155 といったマイクロ RNA は組織修復において重要な因子となると考えられ、病的細胞から正常細胞への治療に応用できる可能性があると考えている。肺の再生という「夢」の実現へのプロトコールはまだ明らかとはなっていないが、肺の修復および再生を制御するマイクロ RNA を探索していくことは、その手がかりとなりうるのではないかと期待される。

謝辞：留学の機会を与えてくださった順天堂大学医学部呼吸器内科 高橋和久教授，瀬山邦明先任准教授，福地義之助客員教授および順天堂大学医学部呼吸器内科医局の先生方に深甚の謝意を表します。また，今回の留学および研究は，日本呼吸器疾患研究基金ファイザーフェローシップ，上原記念生命科学財団ならびにネブラスカ大学メディカルセンター基金 (The Larson Endowment) の援助によりなされたものです。

引用文献

- 1) Lee RC, et al. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.
- 2) Baulcombe D. DNA events. An RNA microcosm. *Science* 2002; 297: 2002-3.
- 3) Friedman RC, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.
- 4) Nana-Sinkam SP, et al. Integrating the MicroRNome into the study of lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 4-10.
- 5) Kohyama T, et al. Prostaglandin E(2) inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L1257-63.
- 6) Huang S, et al. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived nor-

- mal lung fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L405-13.
- 7) Togo S, et al. Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 248-60.
 - 8) Sato T, et al. Reduced miR-146a increases prostaglandin E₂ in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 1020-9.
 - 9) Williams AE, et al. Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 1211-5.
 - 10) Li L, et al. MicroRNA-146a and human disease. *Scand J Immunol* 2010; 71: 227-31.
 - 11) Togo S, et al. Differentiation of embryonic stem cells into fibroblast-like cells in three-dimensional type I collagen gel cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011; 47: 114-24.
 - 12) Sato T, et al. IL-4 induces differentiation of human embryonic stem cells into fibrogenic fibroblast-like cells. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1595-603.e9.
 - 13) Pottier N, et al. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One* 2009; 4: 6718.