

博士論文

マイクロ RNA31 は TGF- β によって誘導される
内皮間葉移行と関連分泌現象を制御する

桂 彰宏

目次

目次	1
略語一覧	2
要旨	4
第一章 序文	5
第二章 結果	21
第三章 考察	61
第四章 材料と方法	70
第五章 引用文献	82
謝辞	95

略語一覽

α -SMA: α -smooth muscle actin

APA: alternative polyadenylation

Angptl2: angiopoietin-like 2

Arhgef: aplysia ras-related homolog guanine nucleotide exchange factor

BMP: bone morphogenetic protein

CCL: chemokine (C- C motif) ligand

CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand

EMT: epithelial-to-mesenchymal transition

EndMT: endothelial-to-mesenchymal transition

EndMT-SP: EndMT-associated secretory phenotype

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FAME: functional assignment of microRNAs via enrichment

FSP-1: fibroblast specific protein-1

GAP: GTPase activating protein

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GSEA: gene set enrichment analysis

IPA: ingenuity pathway analysis

IPAS: internal poly(A) sequence

LNA: locked nucleic acid

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MMP: matrix metalloproteinase

MRTF: myocardin-related transcription factor

MS-1: Mile Sven-1

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1

PAS: polyadenylation signal

RISC: RNA-induced silencing complex

SM22 α : smooth muscle 22 α

SRF: serum response factor

Stk40: serine/threonine-protein kinase 40

TAK1: TGF- β activated kinase 1

TGF- β : transforming growth factor- β

TNF- α : tumor necrosis factor- α

UTR: untranslated region

VAV3: vav guanine nucleotide exchange factor 3

要旨

TGF- β は内皮間葉移行 (EndMT) に対し中心的な役割を果たす。EndMT の正の調節因子として、miR-31 は α -SMA など間葉系遺伝子の発現誘導、アクチン再構築、MRTF-A の活性化に必要で、多くの炎症性ケモカインやサイトカインの誘導に寄与した。miR-31 の標的遺伝子として MRTF-A の活性やアクチン再構築を調節する VAV3 と炎症応答の負の調節因子である Stk40 を同定した。後者では TGF- β により Stk40 mRNA の 3'非翻訳領域長が短縮することで miR-31 の発現変動に関係なく miR-31 による抑制効果が促進され、EndMT では恒常的に発現する miRNA が重要であることを示した。

第一章 序文

1. 細胞運命・細胞可塑性を決定する分子基盤

多細胞生物を構成する個々の細胞は一つの細胞である受精卵をその起源とし、ほぼ同一のゲノムを有する。一方で、これらの細胞群は受精卵からの多段階の分化過程を経て、多様な細胞形質を備えるに至り、さらに機能的に連動することによって、個体を形成している。同一ゲノムの情報に基づいて、どのように異なる形質の細胞が生み出されるのか、そのメカニズムの理解は生物学において中心的な課題であるとともに、細胞の分化制御が関連する多くの疾患の病態の理解、および治療法の開発においても極めて重要である。また、目的の細胞種の分化誘導が重要となる再生医学においても、その分子基盤として重要である。

これまでの膨大な研究結果の蓄積により、組織特異的な発現パターンを示すマスター転写因子と呼ばれる転写因子群と、エピジェネティック制御因子が、協調的に組織・細胞種特異的な遺伝子発現調節ネットワークを構築していることが明らかになっている (1)。その一方で、各々の臓器を構成する各種細胞群は、環境変化に適応するためにその機能を変化させ、場合によっては、臓器を再構築するべく、その形態や細胞としてのアイデンティティすら変化させること

が知られている (1)。こうした細胞運命の可塑性の厳密な制御は、環境変化に対応する生命応答において必須であるが、一方で可塑性の制御異常は様々な疾患の背景要因ともなりうる。

2. microRNA による転写後遺伝子制御ネットワークの調節と細胞の分化制御

近年の研究により、細胞の分化運命決定・可塑性の制御において、細胞種特異的な遺伝子の転写レベルでの調節だけではなく、転写後の調節が重要であることが明らかになり、注目されている。こういった転写後調節ネットワークは、後述する microRNA (miRNA) などの低分子 RNA による調節、long non-coding RNA による調節、RNA スプライシングや RNA 修飾による調節の他、様々な RNA 結合タンパクによる調節など、多面的な調節機構により制御されている (2-4)。miRNA は 20-23 塩基の 1 本鎖の低分子 RNA 分子であり、様々な生物種における転写後調節ネットワークにおいて中心的な役割を果たす (5)。

miRNA は、哺乳類細胞において、以下のような多段階の過程を経て産生される (図 1) (6-9)。miRNA 遺伝子は主に RNA ポリメラーゼ II によってヘアピンループ型の 2 本鎖 RNA 構造を含む 1 本鎖 RNA へと転写される。この数百から数千塩基長の長鎖 RNA は miRNA 一次転写産物 (primary miRNA, pri-miRNA) と呼ばれる。核内において pri-miRNA は Drosha という酵素によって一部が切断され、

約 70 塩基長ほどのステムループ構造の precursor miRNA (pre-miRNA) となる。

Pre-miRNA は exportin-5 による細胞質への輸送後、Dicer という酵素によってさらに切断され、20-25 塩基長の 2 本鎖 miRNA となる。2 本鎖 miRNA は Argonaute タンパク質と結合し、1 本の RNA 鎖が除去され、Argonaute タンパク質と 1 本の RNA 鎖の複合体が形成される。Argonaute タンパク質に取り込まれた miRNA 鎖

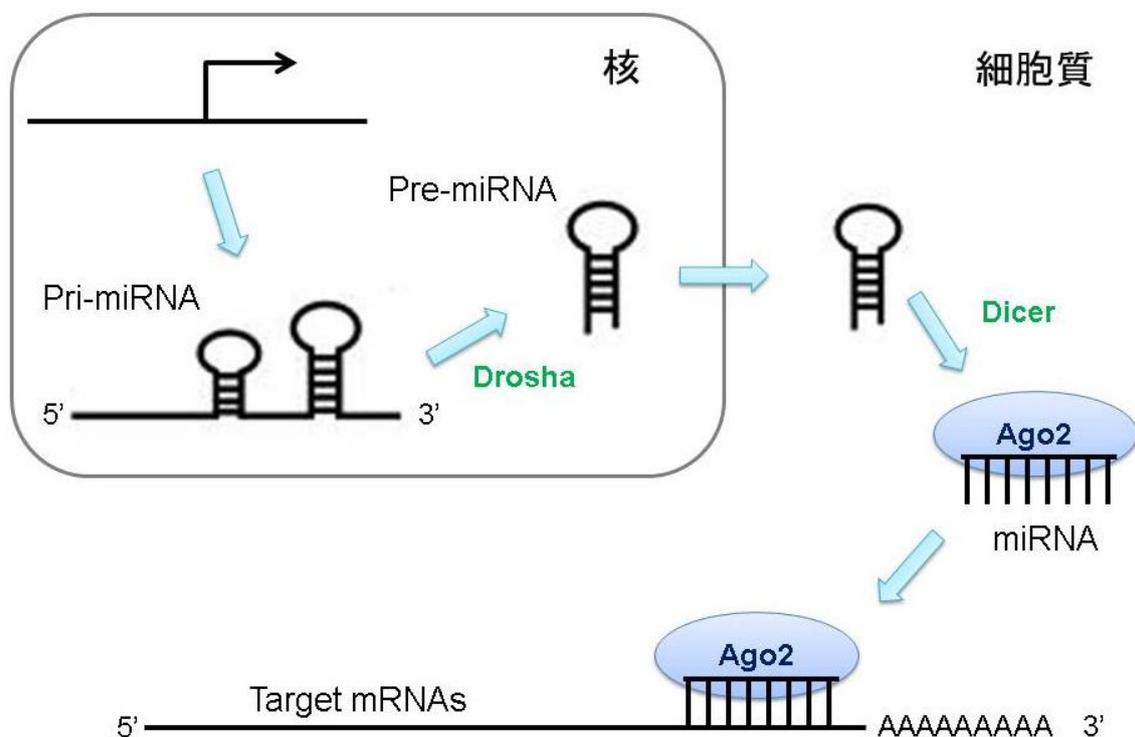


図 1. microRNA の生合成と作用機構

microRNA (miRNA) は 20-23 塩基の 1 本鎖の低分子 RNA であり遺伝子の転写後発現調節に関与する。miRNA は Drosha と Dicer の 2 つのリボヌクレアーゼによって、pri-miRNA および pre-miRNA を経て産生される。Argonaute タンパク質と結合した後に、標的遺伝子の 3'UTR の相補配列に結合してその遺伝子の発現を抑制する。

を成熟型 miRNA (mature miRNA) とよび、最終的に形成された複合体は RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる。この RISC が miRNA を介した遺伝子発現制御において中心的な役割を果たす。Mature miRNA の塩基配列の 5'末端側より 2~8 番目までの 7 塩基はシード配列と呼ばれ、哺乳類細胞における一般的な miRNA の作用原理として、miRNA のシード配列と標的遺伝子の 3'非翻訳領域 (3' untranslated region, 3'UTR) の認識配列が結合し、標的 mRNA を不安定化させる、または、標的 mRNA の翻訳を抑制することでその遺伝子の発現を抑制する (図 1)。

1 種類の miRNA は多数の遺伝子の発現制御に関与し、ヒトにおいては 2000 以上もの miRNA がゲノム上にコードされていると考えられている (5)。miRNA はこのような原理に基づき、細胞増殖、分化、発生、代謝、アポトーシスなどの多方面にわたる生物学的プロセスに密接に関与している。miRNA は多数の標的遺伝子を調節することにより、様々な転写因子と同じように、多様な細胞種の正常分化や可塑性の制御において重要な役割をもつことが明らかになっている (10)。例えば、miR-143、miR-145 といった miRNA は平滑筋細胞の機能に係る主要な転写因子である KLF4、myocardin、ELK1 を標的とし、平滑筋細胞の分化運命の決定や分化後の可塑性を制御することが報告されている (11)。

3. 上皮間葉移行

細胞の分化運命の決定機構・可塑性の調節機構は様々な生物学的・医学的モデルで検証されている。上皮間葉移行 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) は、組織・器官の上皮を構築する上皮細胞が、間葉系細胞の状態に移行する現象であり、細胞の可塑性を考える上で非常に重要な生物学的モデルでもある (12,13)。EMT は、原腸陥入、神経堤細胞の脱上皮化などの初期発生の重要なプロセスだけでなく、がんの転移、臓器線維症、創症の治癒過程などの病態にも関与し、精力的に研究が進められている (12,13)。EMT とがんとの関連は近年とくに注目されている領域であり、がんの浸潤・転移やがん幹細胞の生成・機能維持における EMT の役割が報告されている (14)。一方で最近のマウスモデルを用いた検討では、EMT は運動・浸潤能獲得による転移の増加より、むしろ化学療法への耐性に寄与するとの報告もなされている (15,16)。また、EMT は、*in vitro* において培養上皮細胞に transforming growth factor- β (TGF- β) などを添加したときに再現性高く観察される現象でもあり、こうした *in vitro* モデルは分子メカニズムの解析に汎用されている。これらの研究の進展を反映して、EMT およびその逆の現象である間葉上皮移行 (mesenchymal-to-epithelial transition: MET) を制御する分子メカニズムについては多くの知見が蓄積してきた (12-14)。EMT を誘導する細胞外シグナルとして、TGF- β や骨形成因子 (bone morphogenetic protein:

BMP)、Notch、Wnt、FGF、Hedgehog などの多くのサイトカインが知られており (13,17)、中でも TGF- β は EMT を誘導する中心的なサイトカインである。

4. TGF- β シグナル

TGF- β は TGF- β ファミリーと呼ばれる一群のサイトカインの代表的な因子である (18)。TGF- β ファミリーは TGF- β を始め Activin、Nodal や BMP などの 30 種類以上の構造が類似したタンパク質からなる (18)。TGF- β ファミリーの生理作用は、細胞の増殖、分化、運動、接着、アポトーシス、免疫系の制御など多岐にわたり、TGF- β ファミリーによって誘導されるシグナル経路の破綻は多様な病態に関与している。TGF- β は哺乳類においては TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 と呼ばれる 3 種類のアイソフォームがあり、いずれも同じ受容体を介して細胞内にシグナルを伝達する。TGF- β は細胞表面のセリン・スレオニンキナーゼ型受容体を介して、細胞内にシグナルを伝達する。受容体は I 型、II 型の 2 つのサブファミリーからなり、リガンドが結合すると II 型受容体は I 型受容体をリン酸化し、細胞内へシグナルを伝達する。I 型受容体としては 7 種類が同定されており、Activin receptor-like kinase (ALK)-1~7 と呼ばれている。血管内皮細胞では ALK-1 の発現が高く、TGF- β や BMP-9, BMP-10 が結合する。

細胞内では TGF- β ファミリーのシグナルは、主に Smad と呼ばれるタンパク質

によって伝達される。Smad は Smad1～8 の 8 種類が同定されており、機能的に特異型 Smad (receptor-regulated Smad: R-Smad) である Smad1、2、3、5、8、共有型 Smad (common-mediator Smad: Co-Smad) である Smad4、抑制型 Smad (inhibitory Smad: I-Smad) である Smad6、7 に分類される。前述した I 型受容体によって R-Smad はリン酸化を受ける。リン酸化された R-Smad は Co-Smad である Smad4 と複合体を形成して核内に移行し、種々の転写因子や転写共役因子と結合して plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) などの標的遺伝子の転写を調節する (Smad 経路) (図 2)。

R-Smad と Co-Smad がシグナルを正に伝える一方で、I-Smad である Smad6、7 は I 型受容体に結合して R-Smad のリン酸化を競合的に阻害するほか、R-Smad と Co-Smad との複合体形成を阻害するなど、多彩なメカニズムでシグナルを負に制御している。また、TGF- β は Smad に依存的な伝達経路である Smad 経路以外に、ERK、JNK、p38 などの mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーや PI3 キナーゼ/Akt などを活性化し (図 2)、これらの分子の下流のシグナルを制御する (non-Smad 経路) (19,20)。Non-Smad 経路も細胞の増殖や分化に重要な役割を果たすことが知られている。

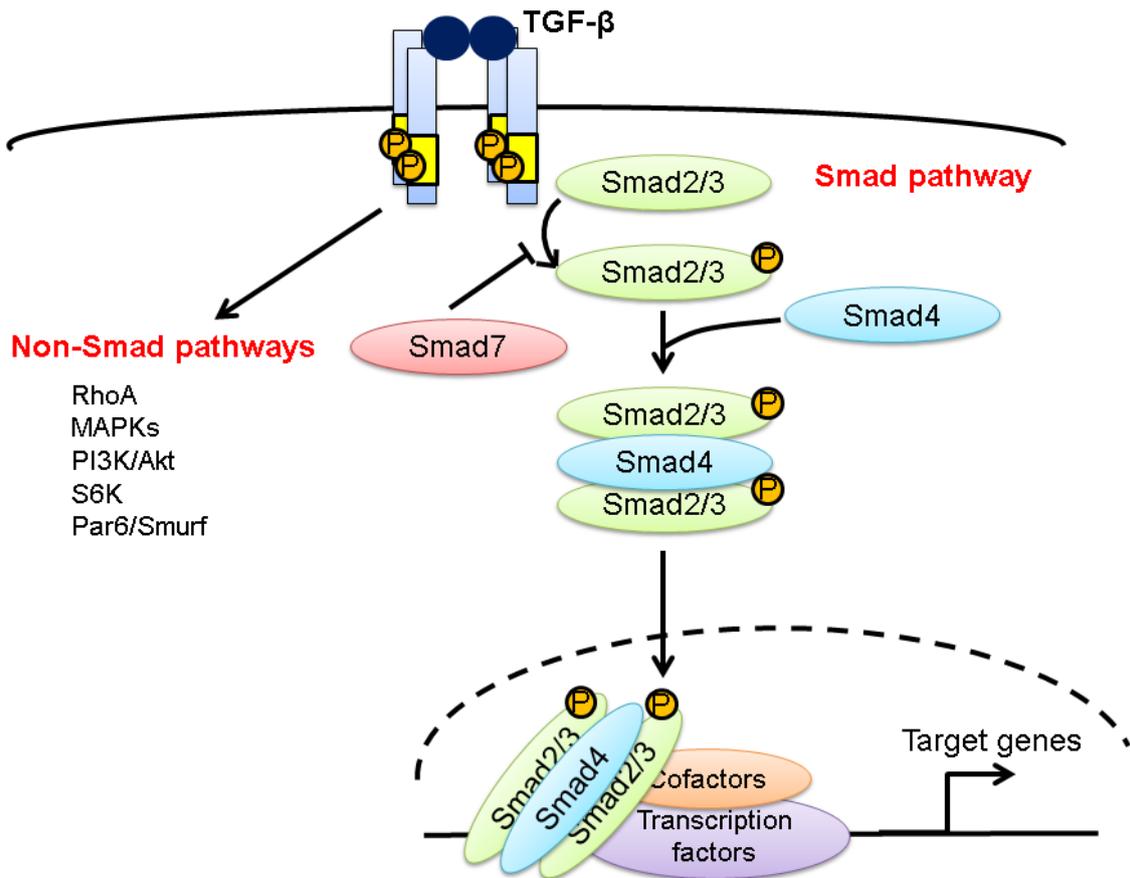


図 2. TGF-βシグナル伝達経路

TGF-βが細胞表面の II 型、I 型 TGF-βの受容体に結合すると、II 型 TGF-β受容体が I 型 TGF-β受容体 (主に ALK-5) をリン酸化し I 型 TGF-β受容体のセリン・スレオニンキナーゼが活性化されて R-Smad (主に Smad2 / Smad3) がリン酸化される。リン酸化された R-Smad は Co-Smad である Smad4 と複合体を形成して核内移行して標的遺伝子の転写を調節する。この Smad 経路は TGF-βに特異的な主たる細胞内シグナル伝達経路であるが、他にも Smad に依存しないシグナル伝達経路が存在する (non-Smad 経路)。

5. TGF- β シグナルによる上皮間葉移行の制御機構

上皮細胞が間葉系細胞へと変化する EMT における主な細胞形質の変化として、上皮細胞特異的なマーカー分子 (E-カドヘリン、クローディンなど) の発現低下、間葉系細胞に特徴的な分子 (α -smooth muscle actin (α -SMA) など) の発現上昇、上皮細胞間の細胞間接着の喪失、運動能の亢進、細胞外マトリクスの分泌亢進などが挙げられる (図 3) (12)。TGF- β シグナルによる EMT 誘導の分子メカニズムはこれまでに詳細に検討されており、様々な転写調節因子がその誘導において重要であることが示されている。

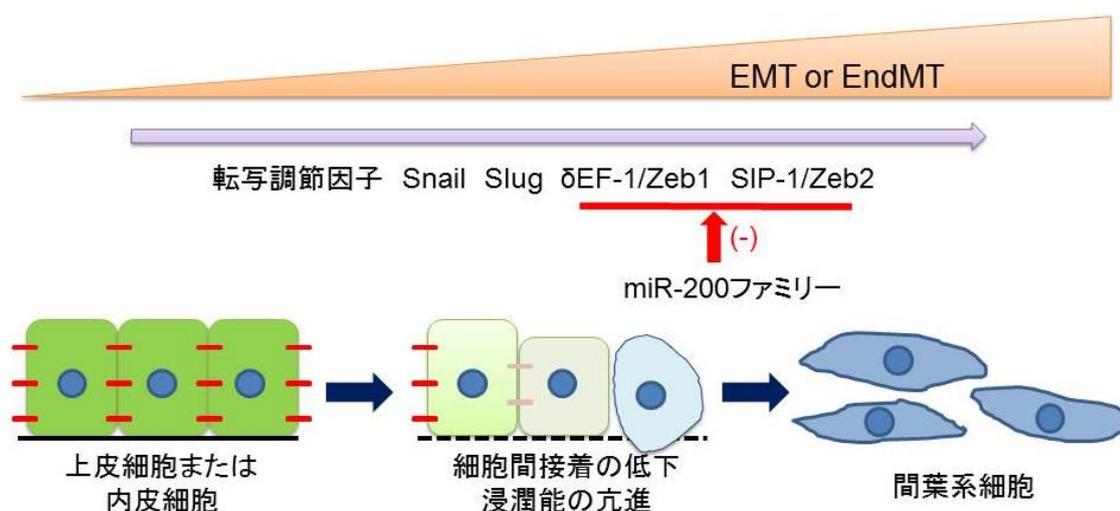


図 3. EMT および EndMT の模式図

上皮細胞もしくは血管内皮細胞は通常では隣接する細胞同士が密着して基底膜の上に整然と並んでいる。EMT および EndMT の過程においては、まず細胞間接着が消失し基底膜が分解されて、運動能が亢進するとともに間葉系細胞へと変化する。

Snail、Slug、 δ EF-1/Zeb1、SIP-1/Zeb2 などの Zn フィンガー型転写因子は、EMT に伴って誘導され、アドヘレンスジャンクションを構成する E-カドヘリンや、タイトジャンクション・ギャップジャンクションなどを構成する分子の発現を抑制する (21-25)。一方で、myocardin 転写因子ファミリーに属する A 型 myocardin 関連転写因子 (myocardin-related transcription factor-A: MRTF-A) は、筋細胞分化を促進する転写因子である serum response factor (SRF) のコファクターとして機能し、Slug や α -SMA の転写を促進する (24,26,27)。TGF- β は Snail、Slug、 δ EF-1/Zeb1、SIP-1/Zeb2 の発現を誘導し、また、Rho シグナルを介した MRTF-A の活性化・核内移行を誘導する。Rho シグナルの活性化はアクチンストレスファイバーの形成にも関与することが報告されている(17)。

miRNA と EMT についても様々な報告がなされており、中でも miR-200 ファミリーは、EMT の調節因子、および再生医学におけるリプログラミングの調節因子として注目されている (28)。miR-200 ファミリーは上皮細胞で豊富に発現しており、EMT に伴ってその発現が顕著に低下する (29)。miR-200 は E-カドヘリンの抑制に重要な Zeb1 や Zeb2 を抑制し、Zeb1 や Zeb2 は逆に miR-200 を抑制することにより、負のフィードバックループを形成している (29)。TGF- β は miR-200 を抑制するとともに Zeb1 や Zeb2 の発現を誘導する。miR-200 の強制発現は TGF- β による EMT を抑制するのに十分であり、また miR-200 の発現低下自

体が EMT を誘導することから (29)、miR-200 ファミリーは EMT 誘導において極めて重要であることが示唆されている。miR-200 以外にも miR-205、miR-155 や miR-29b が EMT を調節することが報告されている (29-31)。

6. 内皮間葉移行と心臓の発生

内皮間葉移行 (endothelial-to-mesenchymal transition: EndMT) は、血管内腔を構成する血管内皮細胞が、間葉系細胞の状態に移行する現象であり、EMT に類似した現象として、近年注目されている。

EndMT は生理的過程として心臓の発生において最初に報告され、心組織の形態形成に大きく寄与することが知られている (図 4)。初期発生において心臓の形成は、一層の血管内皮細胞、心筋細胞層、および細胞外基質からなる心ゼリー層によって構成される原始心筒と呼ばれる拍動する環状構造が複雑に形態変化を遂げることによって達成される。原始心筒は、円錐動脈幹、右心室、左心室、心房を形成する部位に区分されるが、左心室と心房の区分は、原始心筒における対応する部分での心ゼリー層の隆起によって確立される。この心ゼリー層の隆起は心クッションと呼ばれる (31)。心クッションは、血管内皮細胞の性質を持ち、原始心筒の内層を構成する心内膜細胞が EndMT の結果変化した間葉系細胞と、間葉系細胞の産生する細胞外基質によって構成される (31,32)。心クッシ

ヨンは、最終的に、心室膜様部中隔、心房中隔、僧帽弁、三尖弁などの各構造へ移行する (33)。

この心臓形成過程において、EndMT の誘導不全は心クッションの低形成につながり得ることから、中隔欠損、未熟房室弁などに関係していることが示唆されている (34,35)。一方で、間葉系細胞の異常な増殖は、肥厚弁 (異形成弁) などに関連することが示唆されている (36,37)。

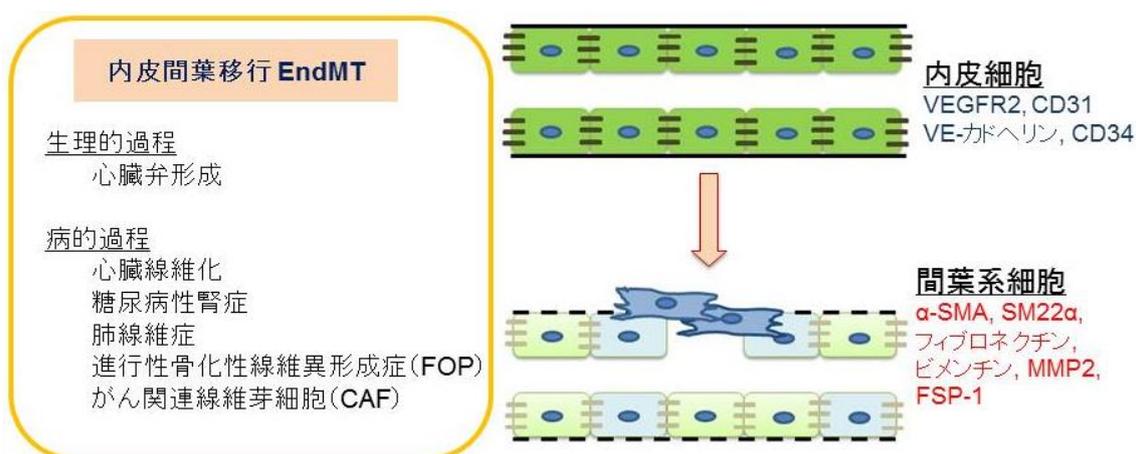


図 4. EndMT と病態との関連、および、EndMT に伴うマーカーの変化

EndMT は心臓弁形成などの生理的過程のみならず各臓器の線維化といった病的過程にも関与する。血管内皮細胞では VEGFR2 や CD34 といったマーカーが発現しているが EndMT によって間葉系細胞になると α -SMA や SM22 α といったマーカーの発現が上昇する。

7. EndMT の病態における意義

EndMT は、初期発生後、成熟した個体における様々な疾患の病態においても

重要であることが示唆されており (図 4)、肺、腸管などの線維化や糖尿病に関連した心臓、腎臓などにおける線維化、心筋梗塞などの虚血部位での組織修復などにも関与していると考えられている (38-42)。線維化の要因となる線維芽細胞の起源の一部が血管内皮細胞であることがトランスジェニックマウスを用いた細胞系譜解析法により示されており (40)、EMT や EndMT は線維化の要因となる線維芽細胞のソースとして重要であると考えられる。例えば、進行性骨化性線維異形成症 (fibrodysplasia ossificans progressiva: FOP) では、BMP の I 型受容体の一つである ACVR1/ALK2 遺伝子の変異によって血管内皮細胞が間葉系幹細胞様の形質を獲得し、これらの細胞が骨格筋や筋膜、腱、靭帯に集積して異所性骨化が引き起こされることが報告されている(43)。また、近年、がんの微小環境において重要であると考えられているがん関連線維芽細胞も、EndMT によって血管内皮細胞が線維芽細胞様に変化した結果生じた細胞であることが報告されており (44)、様々ながんの進展においても EndMT が関与していると考えられる。

8. EndMT による細胞形質の変化と内皮機能消失

EMT と同様に、EndMT における主な細胞形質の変化として、内皮細胞特異的なマーカー分子の発現低下、間葉系細胞に特徴的な分子 (α -SMA など) の発現

上昇、細胞間接着の喪失、運動能の亢進、細胞外マトリクスの産生亢進などが挙げられる (図 3) (45)。

EndMT において発現が低下する内皮細胞のマーカー分子として、VE-カドヘリン、CD31、CD34 などがあり、一方、発現が上昇する間葉系細胞マーカーとして、 α -SMA、smooth muscle 22 α (SM22 α)、フィブロネクチン、ビメンチン、matrix metalloproteinase-2 (MMP2)、線維芽細胞特異的タンパク (fibroblast specific protein-1: FSP-1) などがある (図 4) (45)。これらの分子の発現変動は、培養内皮細胞に TGF- β などのサイトカインを加えて EndMT が誘導された際に観察される (40,44,46-50)。こうしたマーカーの変動のみならず EndMT を起こすことは血管内皮としての性質を失うことにつながる。EndMT によって内皮細胞が間葉系細胞となった部位では機能的に組織還流不全となり、その結果組織障害を来す。例えば外傷性脊髄障害では障害部位の血管で TGF- β シグナルの活性上昇とそれに伴った EndMT による二次的組織障害が問題となっている(51)。

9. EndMT における TGF- β シグナルと miRNA の役割

TGF- β は EMT、EndMT の主たる誘導因子であり、これまでのところ TGF- β による EMT 誘導の分子機序が詳細に検討されている一方で EndMT の分子機序については不明な点が多い。EndMT を誘導する因子や、その結果変動するマーカー

一分子については EMT ほどではないものの近年いくつか知られてきているが、その発現変化を誘導する機構については、TGF- β による EndMT 誘導機構を含め、依然不明な点が多く残されている。

Mihira らは、これまでに、マウスの膵臓由来血管内皮細胞である MS-1 (Mile Sven-1) 細胞を用いて、TGF- β による EndMT のメカニズムを解析し、Snail が MS-1 細胞における EndMT には必須ではないこと、一方で、TGF- β による Smad を介した Rho シグナルと MRTF-A の活性化が EndMT において重要であることを見出している (52)。一方で、miRNA と EndMT の関係については、miR-21、miR-23、miR-302c が EndMT に関与していることが示唆されているが (53-56)、不明な点が多いのが現状である。

本研究では、まずマウスの膵臓由来血管内皮細胞である MS-1 細胞において TGF- β による EndMT に伴うトランスクリプトームの変化を網羅的に解析し、機能的スクリーニングにより恒常的に発現している miR-31 が TGF- β によって誘導される EndMT を正に調節することを見出した。miR-31 は TGF- β によってその発現は誘導されないが、MRTF-A と NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 経路の活性を調節する分子群を調節し、間葉系マーカーのみならず複数のケモカインやサイトカインの誘導に必要であることを見出した。これらの結果から、内在性の miRNA が TGF- β によって誘導される

EndMT とそれに伴った分泌表現型の獲得において重要な役割を果たすことが示唆された。

第二章 結果

1. マウス血管内皮細胞 MS-1 細胞における TGF- β 2 による EndMT の誘導

TGF- β は EndMT の誘導において中心的な役割をもつことが示唆されているが、EndMT の *in vitro* モデルとして、これまでに、ウシ大動脈、マウス肺動脈、マウス脾臓由来血管、ヒト冠動脈、ヒト皮膚微小血管、ヒト臍帯静脈などの様々な血管由来の血管内皮細胞が TGF- β の刺激により間葉系細胞への変化を呈することが示されている (40,44,46-50)。TGF- β は、その生理活性を有する主たるアイソフォームとして TGF- β 1、 β 2、 β 3 の 3 種類がある。初期発生および EndMT が寄与する胎生期の心内膜床形成においては、TGF- β 2 のノックアウトマウスの解析から、TGF- β 2 が特に重要であることが示唆されている (57-59)。また、Mihira らは、マウスの脾臓由来血管内皮細胞である MS-1 細胞を用いた解析で、TGF- β 1、 β 2、 β 3 のすべてが MS-1 細胞において同程度に EndMT を誘導することを報告している (52)。

Hashimoto らは、MS-1 細胞で 24 時間の TGF- β 刺激と Ras の恒常的活性化の組み合わせが協調的に EndMT を誘導することを報告しているが、一方で同報告では、24 時間の TGF- β の単独刺激は EndMT の誘導、特に間葉系細胞マーカーの誘導には不十分であることが示されている (39)。既報では、様々な血管内皮細胞

が 48 時間～6 日といった TGF- β 長期刺激により EndMT の表現型を示すことが報告されており (40,44,46-50)、Mihira らも、MS-1 細胞が、血清存在下の通常培養条件のもとで、TGF- β 2 の刺激 48 時間以降、間葉系細胞マーカーの代表である α -SMA の継続的な上昇を示すことを見出している (52)。

これらの報告を考慮し、本研究では、TGF- β が誘導する EndMT における miRNA の役割を検討するにあたって、MS-1 細胞を EndMT の *in vitro* モデルの対象として使用し、主に TGF- β 2 に対するより長期的な (48-72 時間) 応答を検討した。EndMT では血管内皮細胞から間葉系細胞に変化するにあたって細胞間接着の消失や細胞骨格の形態変化を起こすことが知られている。既報の通り (52)、TGF- β 2 を投与して 72 時間培養すると、MS-1 細胞が敷石状から紡錘形へと形態が変化することを確認した (図 5)。

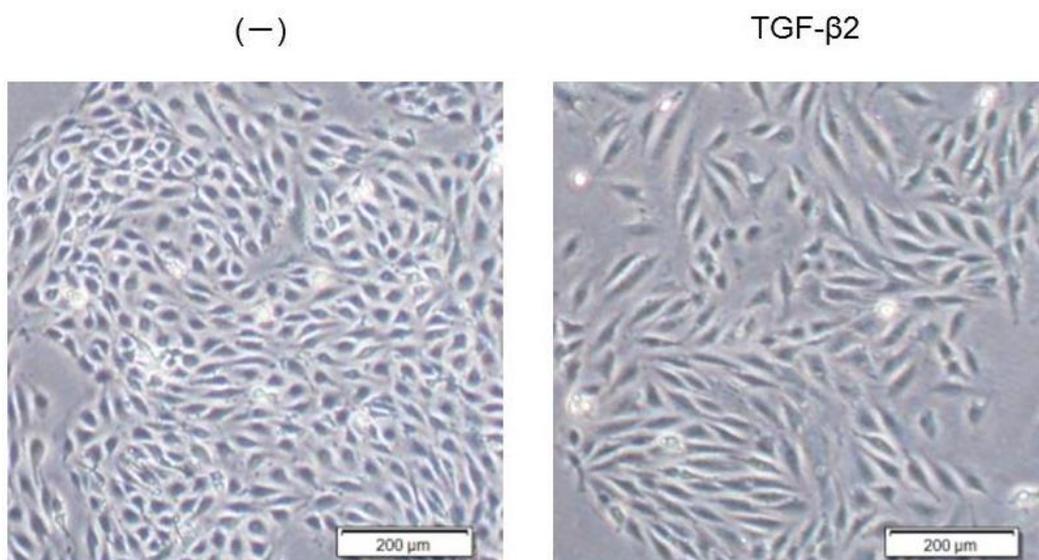


図 5. TGF- β 2 による MS-1 細胞の形態変化

MS-1 細胞を TGF- β 2 (1 ng/ml) で刺激し 72 時間後に光学顕微鏡で細胞形態を観察した。(一) は TGF- β 未処理を示す。

2. cDNA マイクロアレイによる MS-1 細胞における TGF- β 標的遺伝子の発現変化の検討

MS-1 細胞における TGF- β 2 による全般的な標的遺伝子の発現変化を検討するため TGF- β 刺激の有無で 24 時間、72 時間後の MS-1 細胞のサンプルを用いて cDNA マイクロアレイを行った。cDNA マイクロアレイの解析結果から TGF- β 刺激後 24 時間では Smad7、Fn1 (Fibronectin1)、Serpine1 (PAI-1)、Thbs1 (Thrombospondin1)、Pdgfrb (PDGFR β)、Skil (SnoN) などの Smad の標的遺伝子の上昇が認められた。さらに、TGF- β 刺激後 24 時間では Mkl1 (MRTF-A)、Arhgef5 や Arhgef18 (aplysia ras-related homolog guanine nucleotide exchange factor 18) など EndMT の誘導に関与している遺伝子の発現が誘導され、それらに引き続くように TGF- β 刺激後 72 時間では Acta2 (α -SMA) や Tagln (SM22 α) といった間葉系マーカーの発現が誘導されており、以前の報告とも合致していた (52)。さらに TGF- β は Kdr (VEGFR2)、CD34、Cdh5 (VE-cadherin) といった血管内皮マーカーを低下させた (図 6)。

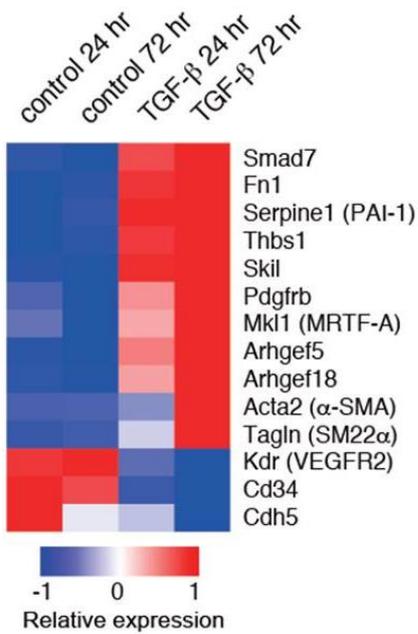


図 6. TGF-βによる TGF-β標的遺伝子、EndMT 関連遺伝子、内皮関連遺伝子の発現変化の誘導

MS-1 細胞を無処理もしくは TGF-β2 (1 ng/ml) 存在下で培養し、刺激から 24、72 時間後に RNA を回収し cDNA マイクロアレイ解析を行った。代表的な TGF-β 標的遺伝子、EndMT 関連遺伝子、内皮関連遺伝子の遺伝子発現変化を heatmap で示す。

3. TGF- β による EndMT に関与している microRNA としての miR-31 の同定

TGF- β によって誘導される遺伝子発現の変化には、Smad などの転写因子を中心とした転写調節に加えて、miRNA による転写後調節機構が関与している可能性がある。miRNA は標的となる mRNA の発現をゆるやかに低下させることが報告されており (60,61)、トランスクリプトームの変化から miRNA の活性を類推する *in silico* のアプローチもいくつか提案されている (62-64)。そこで、TGF- β によるトランスクリプトームの変化から miRNA の活性の変化を類推することを試みた。TGF- β によって変化するトランスクリプトームを解析し、TGF- β によって発現が低下する遺伝子群からそれらを標的としうる miRNA を絞り出すことで、TGF- β によって活性が上昇すると推察された miRNA として miR-128、miR-300、miR-31 などが候補として挙げられた (図 7A、B)。具体的には、TGF- β 処理後のマイクロアレイのデータに対して、miRNA の標的遺伝子セットを用いた Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (65) を実施し、miRNA の標的遺伝子候補の内、TGF- β によって発現が低下するものと発現が上昇するものを抽出した。さらにこの内、TGF- β によって発現が低下する miRNA 標的候補遺伝子群に対する、個々の miRNA の標的遺伝子の enrichment を、miRNA と標的遺伝子の相互作用の強弱を加味したアプローチである FAME (Functional Assignment of MicroRNAs via Enrichment) (66) により算出した。この解析手法は、GSEA-FAME analysis (GFA)

と称する (64,67)。

次に EndMT に関与する miRNA を同定するため Tough Decoy (TuD) RNA システム (68,69)を用いて (図 8A、B)、EndMT 誘導中に活性が強まると考えられた miRNA の機能の特異的に弱め、EndMT のマーカーである α -SMA の上昇がどのように変化するかを検討した。定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) の結果から miR-128 や miR-300 の機能を低下させても α -SMA の発現は抑制されなかったが、miR-31 の機能を弱めると MS-1 細胞において TGF- β によって誘導される α -SMA の上昇が抑制されることが見出された (図 8C、D)。miRNA の活性を検出する miRNA のセンサーベクターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイで、MS-1 細胞では内在性の miR-31 の活性が高く (図 8E)、TuD RNA システムによって限定的ではあるもののその miR-31 の活性が抑制されることを確認した。

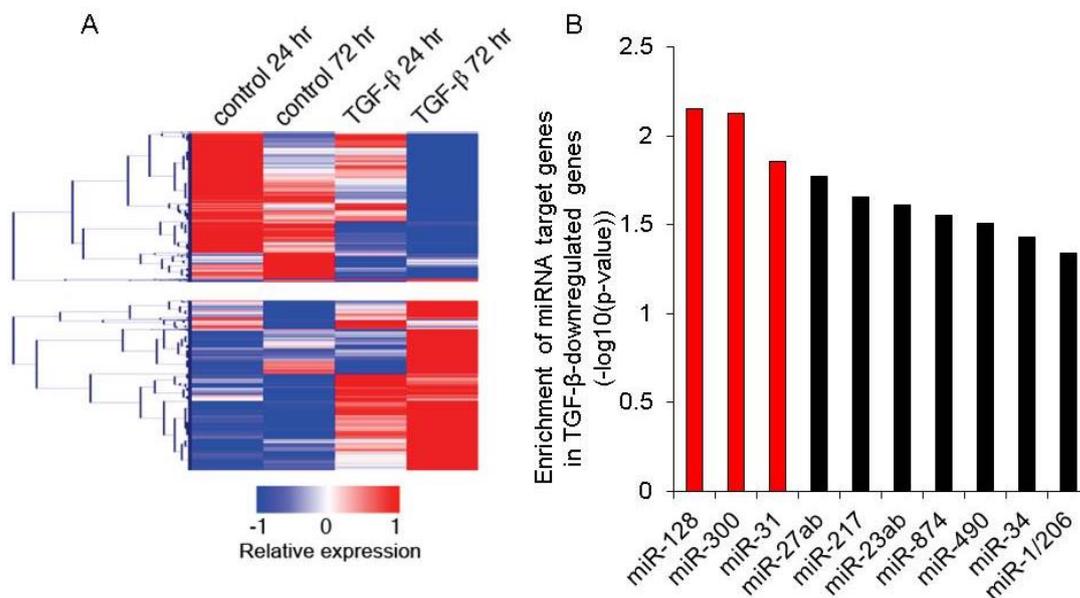


図 7. GSEA-FAME 解析による miRNA の標的遺伝子に対する enrichment score の評価

(A) TGF-βによって発現変動を示す miRNA の標的遺伝子を GSEA を用いて抽出した。上段が発現が低下した遺伝子、下段が発現が上昇した遺伝子を表す。

(B) (A) の TGF-βによって発現が低下する遺伝子について FAME 解析を実施し、TGF-βによって発現が低下した miRNA の標的候補遺伝子群に対する miRNA 標的遺伝子セットの enrichment を算出した。

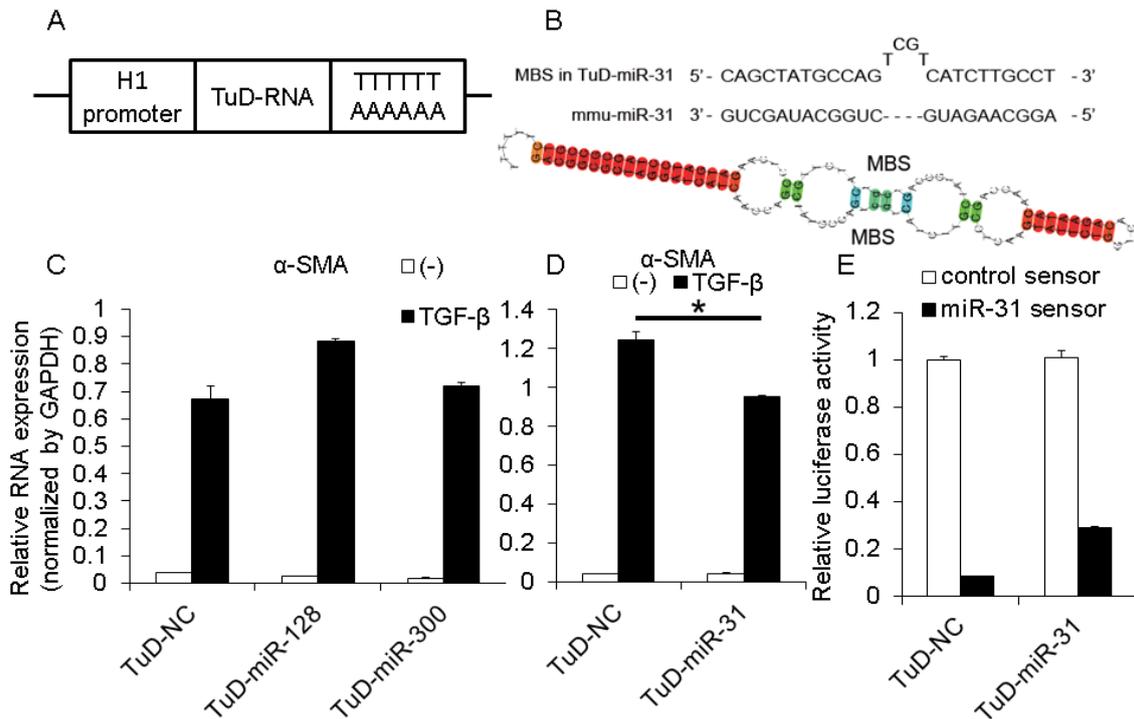


図 8. TuD RNA システムによる miRNA の EndMT への関与の検討

(A, B) TuD RNA 発現ベクターの構造 (A) と塩基配列 (B)。miR-31 に対する TuD RNA は miR-31 に対する部分的相補配列を内部に含む。

(C, D) TuD RNA の EndMT に与える効果。TuD RNA を発現するレンチウイルスを感染させた MS-1 細胞を TGF-β2 (1 ng/ml, 48 h) で刺激し 48 時間後に RNA を回収し、α-SMA の誘導を qRT-PCR によって解析した。エラーバーは標準偏差を示す。* p < 0.05。

(E) TuD RNA レンチウイルスベクターを感染させた MS-1 細胞と miR-31 の活性を検出する miR-31 センサーベクターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ。miR-31 センサーベクター (miR-31 sensor) は、ルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR に miR-31 に対する完全相補配列を含み、miR-31 によってルシフェラーゼの発現が抑制される。この miR-31 によるルシフェラーゼの発現抑制効果が、miR-31 に対する TuD RNA により軽減されることが確認された。miRNA 相補配列を含まないセンサーベクターをコントロールとして使用した (control sensor)。

4. TGF- β は miR-31 の発現上昇を誘導しない

GSEA-FAME 解析から TGF- β によって miR-31 の活性上昇が誘導されることが予測された。しかし、実際に MS-1 細胞で TGF- β による miR-31 の発現変化を検討したところ、TGF- β による miR-31 の有意な発現誘導は認められなかった (図 9)。

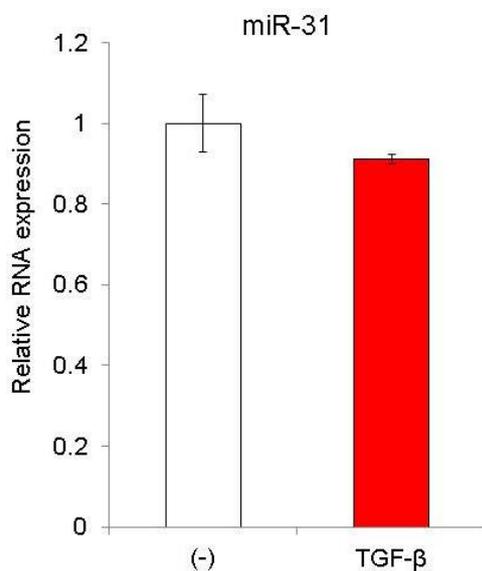


図 9. TGF- β による MS-1 細胞での miR-31 の発現変化

MS-1 細胞を TGF- β 2 (1 ng/ml) で刺激し、48 時間後に RNA を回収し、qRT-PCR により miR-31 の発現を検討した。エラーバーは標準偏差を示す。

5. TGF- β が誘導する EndMT に miR-31 は不可欠である

TuD RNA システムによる miR-31 活性の抑制は限定的であったため、さらなる解析にあたって miR-31 に対する阻害剤として Locked Nucleic Acid (LNA) miRNA-31 inhibitor (LNA-miR-31) を用いた。MS-1 細胞での miR-31 センサーベクターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによる検討では LNA-miR-31 は miR-31 の高い活性をほぼ完全に打ち消していた (図 10A)。興味深いことに LNA-miR-31 を用いて miR-31 の機能を抑制すると TGF- β による α -SMA や SM22 α といった間葉系マーカーの発現誘導が著明に低下した (図 10B)。その一方で TGF- β によって誘導された Smad7 や Fibronectin1 などの発現は LNA-miR-31 により強くは抑制されなかった。PAI-1 については抑制される傾向が見られたが、 α -SMA や SM22 α と比較して弱いものであった (図 10C)。TGF- β によって抑制される VEGFR2 や CD34 などは LNA-miR-31 によって変化がなかった (図 10D)。

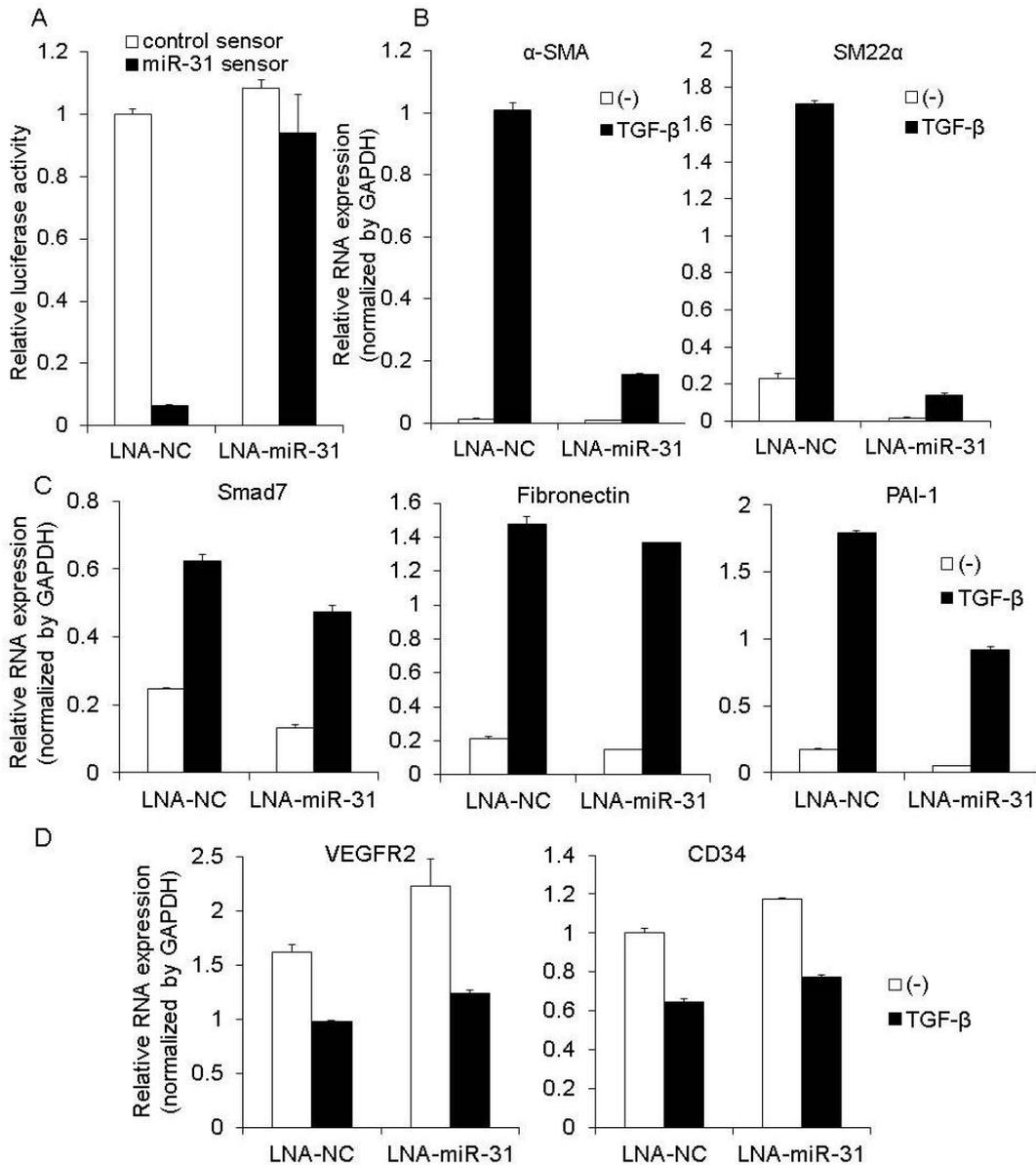


図 10. miR-31 の抑制は TGF-β による EndMT を抑制する

(A) LNA-miR-31 による内源性 miR-31 の活性の抑制の検討。MS-1 細胞に miR-31 センサーベクターとコントロール LNA インヒビター (LNA-NC) または LNA miRNA-31 inhibitor (LNA-miR-31) (50 nM) をトランスフェクションし、48 時間後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。

(B - D) miR-31 の活性抑制による TGF-β 標的遺伝子 (A: EndMT 関連遺伝子、B: 代表的な TGF-β 標的遺伝子、C: 内皮関連遺伝子) の発現変化の検討。MS-1 細胞を撒き、コントロール LNA インヒビター (LNA-NC) または LNA miRNA-31 inhibitor (LNA-miR-31) (50 nM) をトランスフェクションし、TGF-β₂ (1 ng/ml) による刺激 72 時間後に qRT-PCR を実施した。エラーバーは標準偏差を示す。

6. miR-31 の活性を増強すると TGF- β による EndMT が促進する

EndMT における miR-31 の役割を明確にするために、今回は miR-31 の機能を強めた際の前述のマーカーの発現について検討した。まず miR-31 センサーベクターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイで MS-1 細胞において miRNA の活性を模倣する合成 miRNA2 本鎖 (miRNA duplex, miR-31 mimic) の導入により miR-31 の活性が上昇していることを確認した (図 11A)。miR-31 mimic で miR-31 の機能を強めると TGF- β によって誘導された α -SMA や SM22 α の発現が促進された (図 11B)。また Smad7、Fibronectin1 や PAI-1 の誘導、VEGFR2 や CD34 への抑制に対する影響は限定的であった (図 11C、D)。以上から、内在性の miR-31 の活性が TGF- β によって誘導される EndMT の程度を制御することが明らかになった。

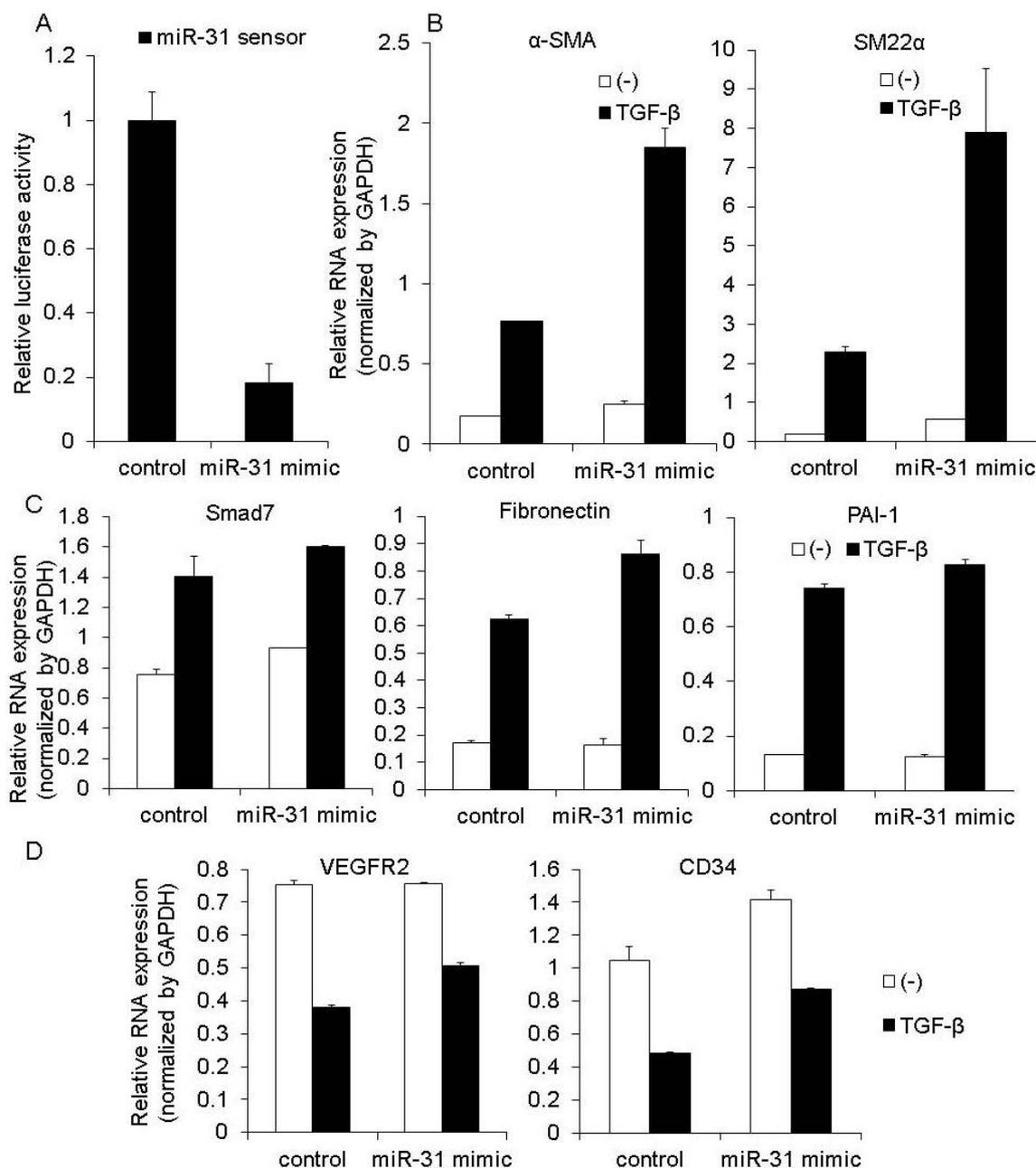


図 11. miR-31 の導入により TGF-β によって誘導する EndMT は促進される

(A) miR-31 mimic による miR-31 の活性変化の検討。MS-1 細胞に miR-31 センサーベクターとコントロール siRNA (control) または miR-31 mimic (50 nM) をトランスフェクションし、48 時間後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。

(B - D) miR-31 mimic の導入による TGF-β 標的遺伝子 (A: EndMT 関連遺伝子、B: 代表的な TGF-β 標的遺伝子、C: 内皮関連遺伝子) の発現変化の検討。MS-1 細胞を撒き、コントロール siRN (control) または miR-31 mimic (50 nM) をトランスフェクションし、TGF-β2 (1 ng/ml) による刺激 72 時間後に qRT-PCR を実施した。エラーバーは標準偏差を示す。

7. TGF- β による MRTF-A の活性化・アクチンの再構築に対する miR-31 の作用

上皮細胞では TGF- β は RhoA、RhoB、Rac や Cdc42 などの多種多様な Rho GTPase を活性化し、それに引き続いて ROCK/LIMK/cofilin 経路の活性化を介してアクチン骨格の再構築を促す (70-72)。その一方で Rho シグナル経路の活性化は MRTF の核内移行を誘導し、MRTF と Smad3 の転写複合体は Slug の転写を活性化する (73)。そして MRTF は SRF と結合することで α -SMA の発現を上昇させることが知られている (73)。Mihira らは、これまでに TGF- β が RhoA や MRTF-A の活性を上昇させ、これらの活性変化が TGF- β による α -SMA の発現上昇に必須であることを MS-1 細胞で示した (52)。そこで、EndMT の際に miR-31 が特異的に間葉系マーカーを調節することに関連して、TGF- β による MRTF-A の活性化とアクチンの再構築に対する miR-31 の潜在的な寄与について検討を行った。最初に MRTF-A の機能を検討するために MRTF-A によって活性化される α -SMA プロモーターを含むレポーターベクターを用いたレポーターアッセイを行った。TGF- β のみでは α -SMA プロモーターの活性に差が見られなかったが、MTRF-A 存在下では TGF- β は α -SMA プロモーター活性を促進した。さらにその効果は miR-31 の活性を低下させることで抑制された (図 12)。

さらに MS-1 細胞において miR-31 の活性を抑制すると TGF- β による太いストレスファイバーの形成が抑制された (図 13A)。逆に miR-31 の活性を強めるとス

トレスファイバーの形成が促進された (図 13B)。これらの結果から miR-31 は TGF- β によるアクチンの再構築と MRTF-A の活性化を調節することで間葉系マーカーを調節することが示唆された。

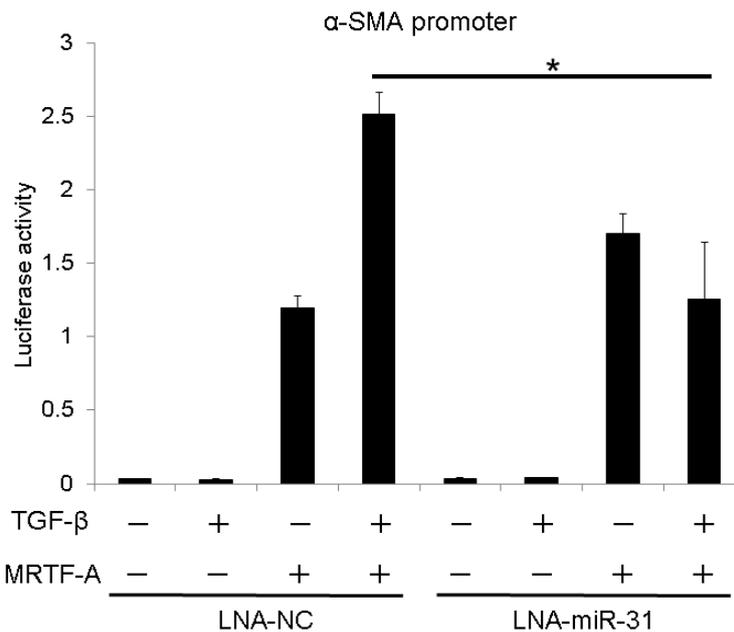


図 12. LNA-miR-31 が TGF- β による MRTF-A の活性上昇に与える影響

MS-1 細胞に α -SMA プロモーターを含むレポータープラスミド、MRTF-A 発現プラスミド、miRNA 阻害剤 (LNA, 20 nM) をトランスフェクションし、TGF- β 2 (1 ng/ml) 刺激 48 時間後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。エラーバーは標準偏差を示す。* p < 0.05。

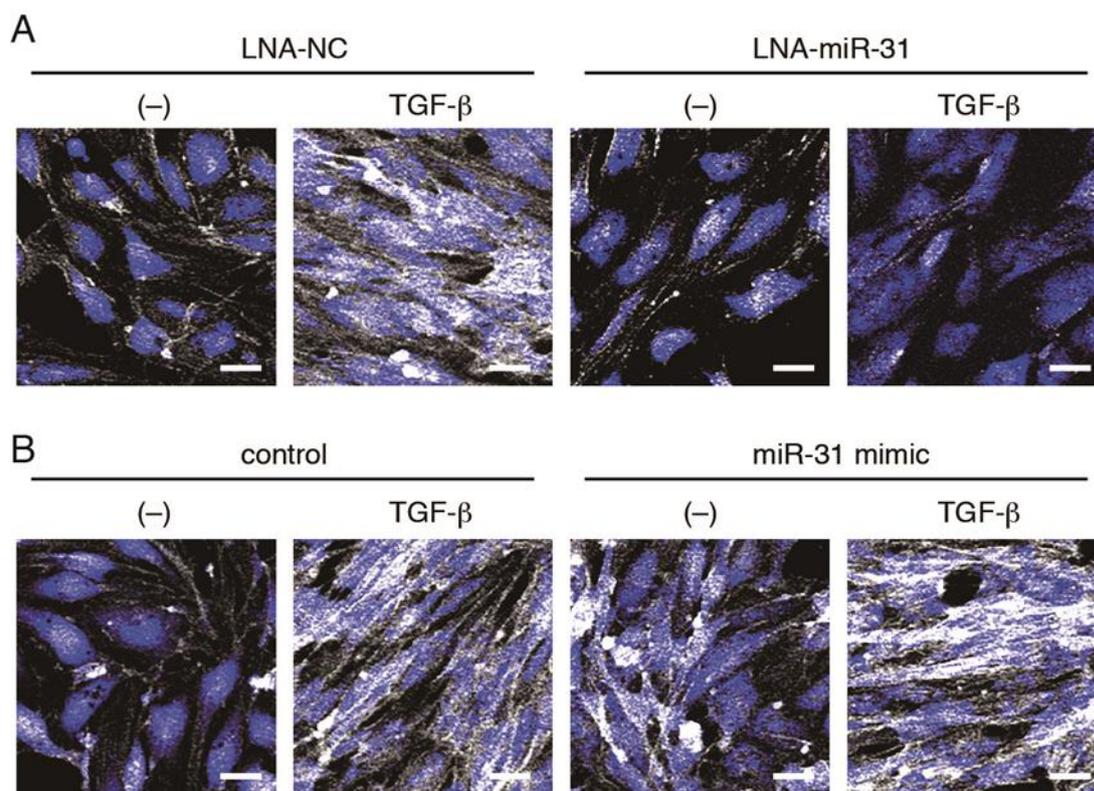


図 13. miR-31 が TGF-βによるアクチン再構築に与える影響

MS-1 細胞に miRNA 阻害剤 (LNA) (A) もしくは合成 miRNA 2 本鎖 (mimic) (B) をトランスフェクションし、TGF-β2 (1 ng/ml) 刺激 24 時間後に F アクチン (白) と核 (青) に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を実施した。スケールバーは 20 μm を示す。

8. miR-31 の標的遺伝子について

一般的に哺乳類の miRNA は全般的に標的遺伝子の mRNA を減少させることでタンパク質としての出力を減らすと考えられている (61)。本研究では、miR-31 の標的遺伝子を網羅的に同定し TGF- β が誘導する EndMT における miR-31 の役割を検討するために、LNA-miR-31 と TGF- β で処理した MS-1 細胞を用いて RNA シーケンシング解析を行った。解析結果から、miRNA 標的遺伝子予測アルゴリズムである TargetScan (74) で予測される miR-31 の標的候補遺伝子群は、LNA-miR-31 により miR-31 の活性を抑制することで、全体的に有意に発現が上昇しており (図 14A)、MS-1 の内在性の miR-31 の活性の強さ (図 8E) から、定常状態において MS-1 細胞では miR-31 が積極的に標的遺伝子を抑制していることが示唆された。DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (75,76) を用いた遺伝子オントロジー (Gene Ontology, GO) 解析では、LNA-miR-31 によって発現が上昇する miR-31 の標的遺伝子に、小胞、細胞運動、ヌクレオチド結合、GTPase 調節因子活性や細胞骨格に関連する遺伝子が多く含まれていることが判明した (図 14B)。興味深いことに miR-31 の標的遺伝子はアクチン細胞骨格シグナル (図 14C)、パキシリンシグナルやインテグリンシグナルなど細胞骨格関連のシグナル経路に関与していることが見出された。

続いて、miR-31 と MRTF-A およびアクチン再構築を関連づける因子を探索す

る上で、LNA-miR-31 によって発現が上昇する miR-31 の標的候補遺伝子にグアニンヌクレオチド交換因子である VAV3 (vav guanine nucleotide exchange factor 3) が含まれていることに着目した。グアニンヌクレオチド交換因子とは細胞内シグナル伝達に関与する G タンパクに作用し、GDP と GTP との交換を促進するタンパクを指す (77,78)。VAV3 は Rac1 に対するグアニンヌクレオチド交換因子として知られており、VAV3 の欠如は Rac1 の活性低下と RhoA の活性上昇を引き起こし線維芽細胞においてストレスファイバーの形成を促進する (79,80)。VAV3 の 3'UTR 内には、図 15A に示すように miR-31 標的遺伝子配列が含まれる。さらに VAV3 の mRNA の発現が LNA-miR-31 によって上昇し、TGF- β によって低下することを見出した (図 15B)。TGF- β 依存的な VAV3 の低下に対する LNA-miR-31 の効果は限定的であったことから、miR-31 は TGF- β 依存的な VAV3 の低下に関与しているというよりは、定常レベルでの VAV3 の発現量を調節していると考えられた。また VAV3 と miR-31 の推定結合箇所に図 15A のように変異を導入したルシフェラーゼレポータープラスミドを作成し、これらを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより miR-31 が VAV3 の 3'UTR 内にある miR-31 のターゲット部位を標的とすることを見出した (図 15C)。これらの結果から VAV3 が miR-31 の新たな標的遺伝子として同定された。

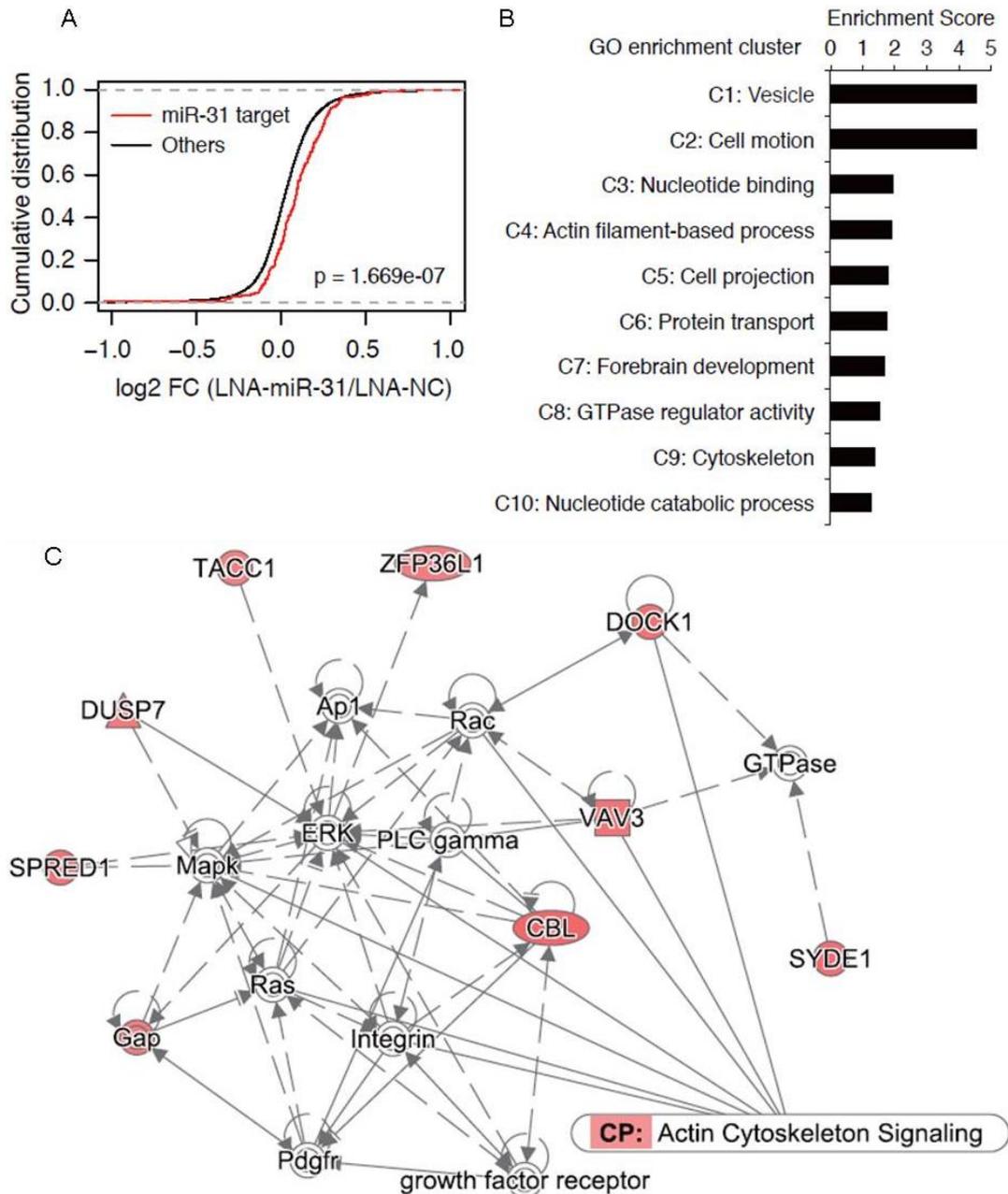


図 14. miR-31 の標的遺伝子についての検討

(A) LNA-miR-31 導入後の、Target Scan における miR-31 の標的候補遺伝子 (赤線) とそれ以外の遺伝子 (黒線) の遺伝子発現変化 (Log2 fold change (FC)) の分布図。MS-1 細胞に miRNA 阻害剤 (LNA) をトランスフェクションして検討した。P 値は、Kolmogorov-Smirnov test により算出した。

(B) LNA-miR-31 のトランスフェクションによって発現上昇した miR-31 標的候補遺伝子群の遺伝子オントロジー解析結果。

(C) ネットワーク解析で明らかになった、miR-31 の標的遺伝子とアクチン細胞骨格制御に関連する遺伝子群の関係。LNA-miR-31 によってその発現が上昇する、miR-31 の標的遺伝子を赤で表示する。

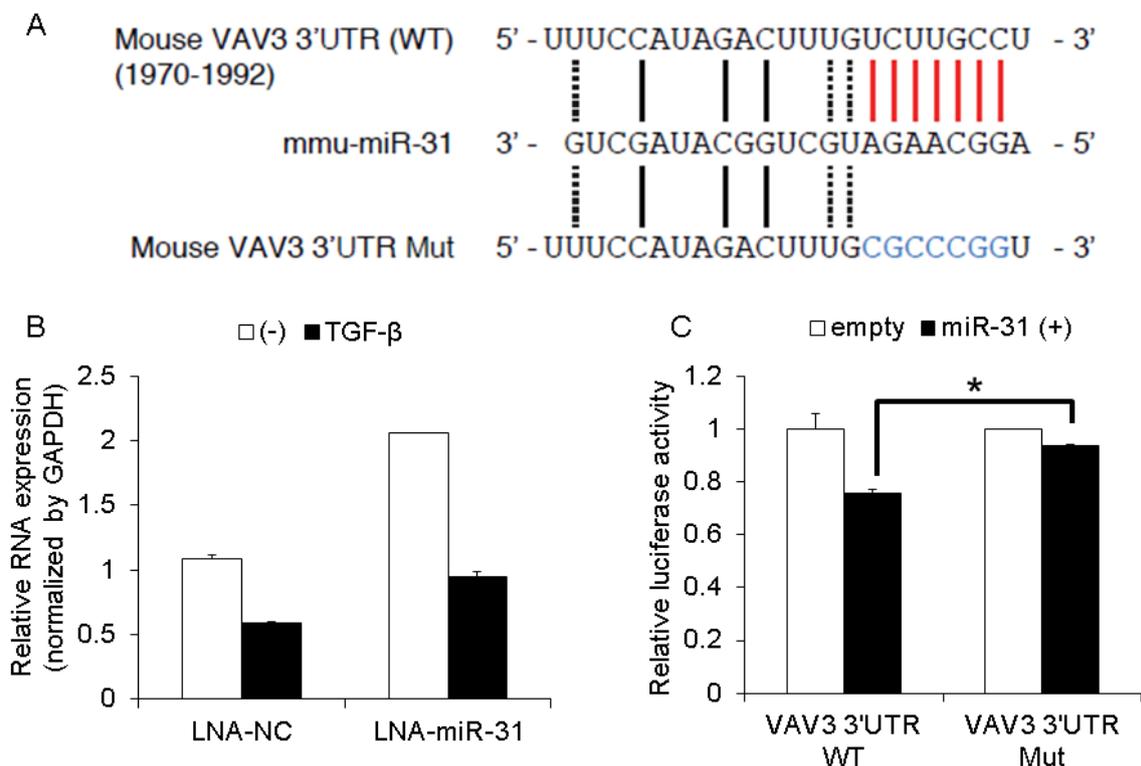


図 15. miR-31 の標的としての VAV3 の同定

(A) マウス VAV3 3'UTR 内の miR-31 の予測結合配列。

(B) TGF-β および LNA-miR-31 の VAV3 の発現に与える影響の検討。MS-1 細胞に miRNA 阻害剤 (LNA) をトランスフェクション (50 nM) し、TGF-β (1 ng/ml) 刺激 48 時間後に RNA を回収し qRT-PCR を実施した。

(C) HEK293T 細胞に、野生型 (WT) VAV3 の 3'UTR をルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR に挿入したルシフェラーゼレポーターベクターもしくは VAV3 3'UTR の miR-31 予測結合配列に (A) のように変異を導入したルシフェラーゼレポーターベクター (Mut) と empty ベクターもしくは pri-miR-31 発現ベクターをトランスフェクションし、48 時間後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。エラーバーは標準偏差を示す。* p < 0.05。

9. VAV3 の EndMT に対する影響

VAV3 のアクチン再構築と RhoA 活性に対する影響の報告に合致するように (80)、VAV3 の過剰発現は MRTF-A の α -SMA プロモーターに対する活性を抑制し (図 16A)、siRNA を用いて VAV3 を抑制すると TGF- β による α -SMA の発現誘導が促進され miR-31 の活性を増強したときのような表現型となった (図 16B)。これらのことから miR-31 は VAV3 の抑制を介してアクチン再構築、MRTF-A の活性化、EndMT を促進することが示唆された。既報では miR-31 が RhoA を抑制することが報告されていたが (81,82)、MS-1 細胞においてはむしろ miR-31 は RhoA を活性化することが示唆された。

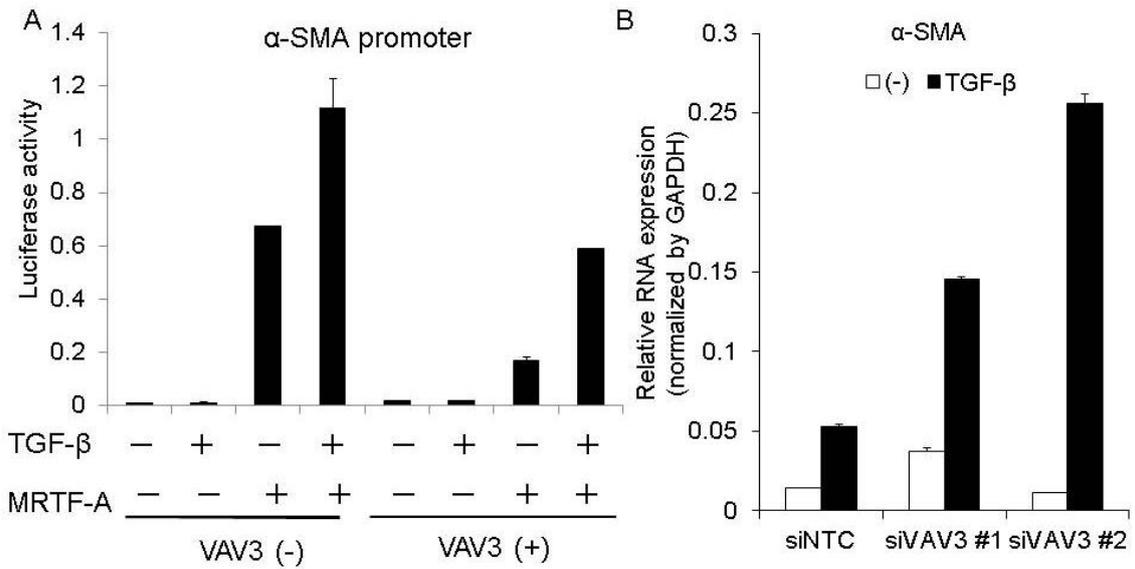


図 16. VAV3 の TGF-β による EndMT に与える影響

(A) VAV3 の過剰発現が TGF-β による MRTF-A の活性上昇に及ぼす影響。MS-1 細胞に α-SMA レポーター発現プラスミド、MRTF-A 発現プラスミド、VAV3 発現プラスミドをトランスフェクションし、TGF-β (1 ng/ml) 刺激 48 時間後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。(B) VAV3 のノックダウンが TGF-β による α-SMA の発現上昇に与える影響。MS-1 細胞を撒き、VAV3 に対する siRNA (siVAV3) をトランスフェクションし (20 nM)、TGF-β (1 ng/ml) 刺激 72 時間後に RNA を回収し、qRT-PCR を実施した。エラーバーは標準偏差を示す。NTC: negative control。

10. miR-31 は EndMT ならびに EndMT 関連分泌現象 (EndMT-associated secretory phenotype: EndMT-SP) を制御する

RNA シーケンシングの結果から TGF- β によって発現が上昇する遺伝子として 486 遺伝子 (Fold change > 2)、低下する遺伝子として 644 遺伝子が見出された (Fold change < 0.6) (図 17A)。cDNA マイクロアレイの結果と同様に、RNA シーケンシングの結果においても LNA-miR-31 によって TGF- β による Acta2 (α -SMA) の発現誘導が顕著に減弱し、Serpine1 (PAI-1)、Smad7、Fn1 (Fibronectin1)、Skil (SnoN)や Arhgef5、血管内皮マーカーである Kdr (VEGFR2)や CD34 も含む他の標的遺伝子に対する影響は限定的であることが観察された (図 17B)。一方で、興味深いことに、TGF- β は CCL17 (chemokine (C-C motif) ligand 17)、CX3CL1 (Fractalkine)、CXCL16 (chemokine (C-X-C motif) ligand 16)、CXCL5、IL-6 (interleukin-6) や Angptl2 (angiopoietin-like 2) など免疫反応や炎症に関与する多くのサイトカインやケモカインを誘導し、miR-31 の抑制は α -SMA の発現抑制とともにそれらの誘導も抑制することが明らかになった (図 17B)。DAVID を用いた遺伝子オントロジーの解析結果、すでに知られている TGF- β の多様な機能と合致するように、細胞外基質の産生、脈管形成、増殖調節、細胞接着、心臓機能などの様々な生物学的機能に関連した多くの遺伝子群を TGF- β は誘導することが明らかになった。その一方で TGF- β によって発現が上昇し miR-31 によって

抑制される遺伝子群として最も関連高く挙げられたものは免疫反応、炎症、ケモカイン、ケモタキシスに関係する遺伝子群であった (図 17C)。Ingenuity pathway analysis (IPA) ソフトウェアを用いたパスウェイ解析でも、miR-31 は TGF- β による CCL17、CX3CL1、CXCL16、CXCL5、IL-6 や Angptl2 など免疫反応や炎症に関与する多くのサイトカインやケモカインの誘導に重要であることが示唆された (図 18)。TGF- β が EndMT の誘導に沿ってこのように様々なサイトカインやケモカインの産生を誘導することは知られておらず、TGF- β の新たな生理的作用であることが考えられた。

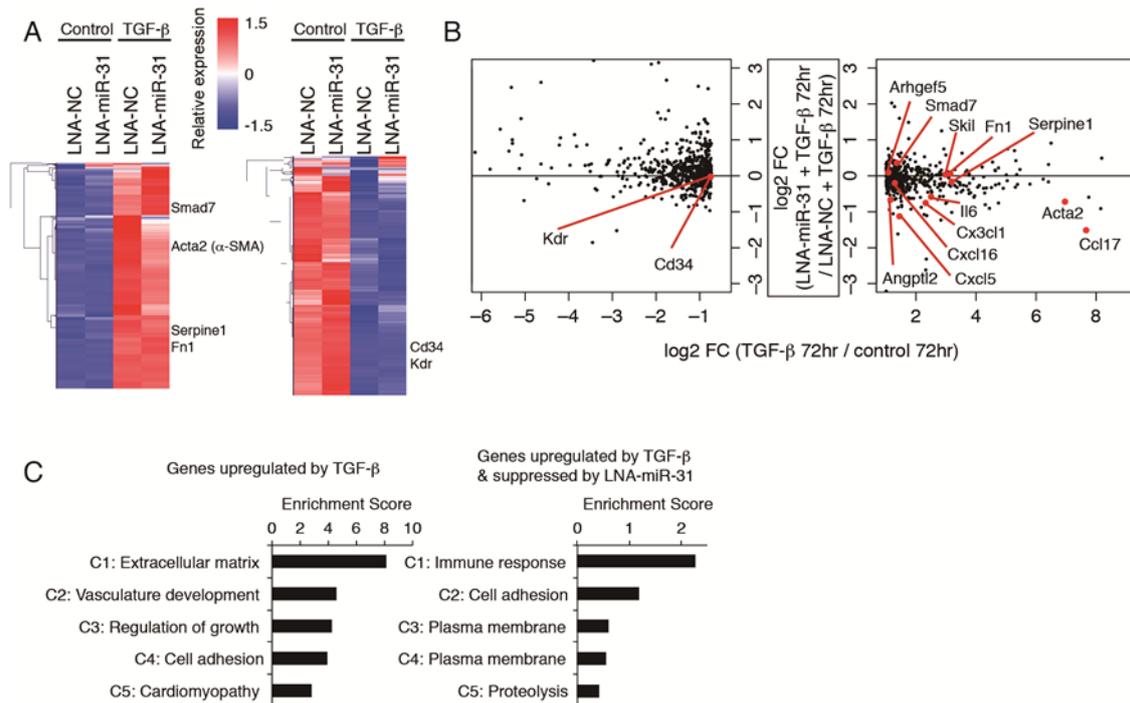


図 17. RNA シーケンシングによる miR-31 抑制が EndMT に与える影響の検討
 (A) TGF-βによって発現変化する遺伝子の同定 (左：上昇する遺伝子、486 遺伝子(Fold change > 2)、右：低下する遺伝子、644 遺伝子 (Fold change < 0.6))。
 (B) miR-31 阻害剤が、MS-1 細胞における TGF-βによるトランスクリプトーム変化に与える影響。
 (C) TGF-βによって発現上昇する遺伝子 (Fold change > 2、左) と、かつ LNA-miR-31 によって発現低下する遺伝子 (Fold change < 0.7、右) についての遺伝子オントロジー解析結果。

Inflammatory response genes upregulated by TGF- β
 Green: Downregulation by LNA-miR-31
 Red: Upregulation by LNA-miR-31

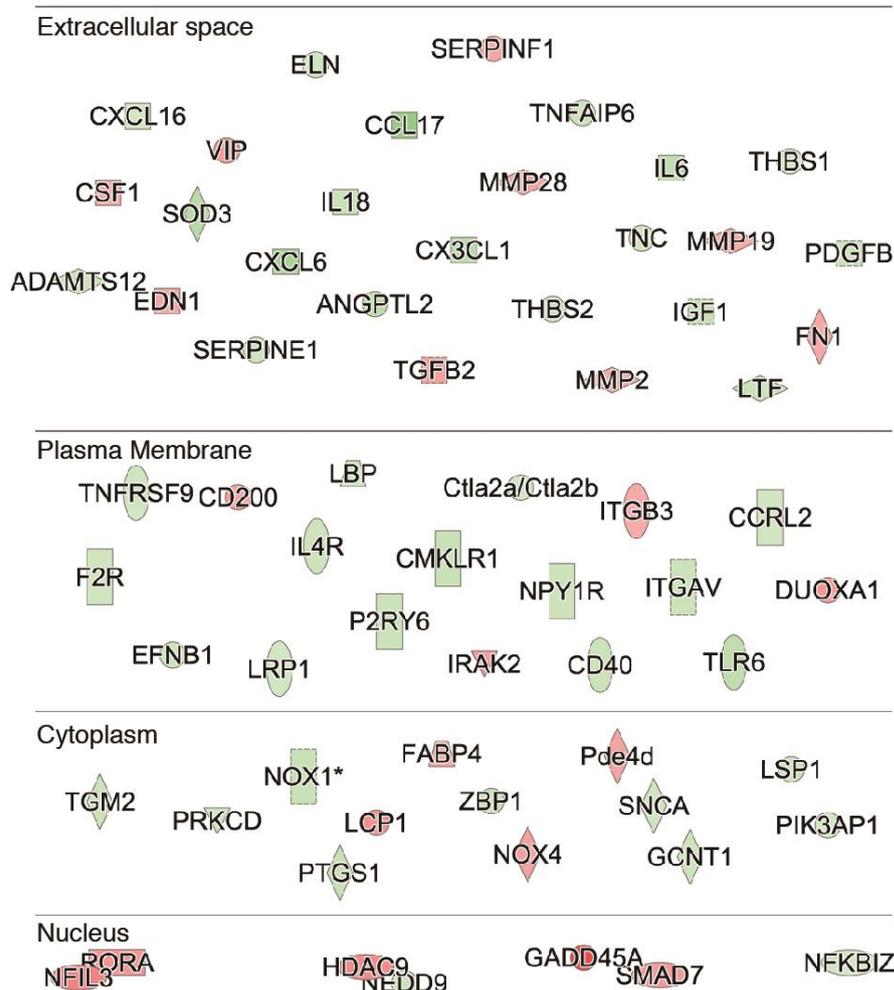


図 18. miR-31 と EndMT-SP の制御について

EndMT-SP における炎症性メディエーター。図中には、TGF- β によって発現誘導される免疫応答関連遺伝子を示す。緑は、その遺伝子の発現誘導が LNA-miR-31 によって抑制され、赤は、その遺伝子の発現誘導が LNA-miR-31 によって促進されることを示す。TGF- β によって発現誘導される炎症性メディエーターは LNA-miR-31 によって全般的に抑制される傾向を示すことが観察される。

11. miR-31 は NF- κ B 経路を調節する

続いて、miR-31 がどのような細胞内経路を制御することで TGF- β による EndMT を制御しているかを探索した。TGF- β はその下流を仲介する代表的な転写因子群 Smad2、Smad3、Smad4 に加えて多くの転写因子の活性を変化させるが、miR-31 が TGF- β による様々な転写因子の活性変化を修飾する可能性を考慮した。TGF- β と miR-31 によって制御される遺伝子群がどの転写因子の制御を受けているかを明らかにすることを目的として、IPA ソフトウェアを用いて、TGF- β 刺激と miR-31 の抑制に伴う多様な転写因子の活性の変化を予測した (図 19A)。この方法では、TGF- β 刺激による Smad の活性上昇が確かに予測され、miR-31 の抑制による Smad の活性低下は見出されなかった。一方、NF- κ B やヘッジホッグシグナルのメディエーターである Gli1 が TGF- β によって活性化され、さらにはこの活性化が miR-31 の抑制によって抑制されることが推測された。また MYC、ATF4 や STAT4 は TGF- β によって活性が抑制され、これらの効果は miR-31 の活性低下によって減弱することが予測された。これらの結果に合致するように、TGF- β は TAK1 (TGF- β activated kinase 1) の活性化を通して NF- κ B を活性化すること、また、TGF- β が MYC の発現を抑制することが報告されている (83,84)。IPA を用いた転写調節ネットワークの解析では NF- κ B は CCL17、CX3CL1、IL-6 の制御と関連しており、Gli1 は IL-6 と RhoB の制御と関連していることが示唆された

(図 19B)。またこの解析結果から MYC、ATF4、STAT4 は TGF- β の下流のいくつかの遺伝子と関連があることがわかった (図 20A)。これらの結果と呼応するように、miR-31 は NF- κ B 経路の負の調節因子である Stk40 (serine/threonine-protein kinase 40) と E2F2 を抑制することにより NF- κ B と MYC の活性をそれぞれ上昇させることがこれまでに報告されている (85,86)。また、以前にヒトケラチノサイトで TGF- β が RhoB を誘導することが報告されているが (87)、miR-31 を抑制すると、Gli1 の活性と関係していることが予測された TGF- β による RhoB の発現誘導が減弱することも認められた (図 20B)。これらの結果を統合して考えると、miR-31 は α -SMA の発現だけでなく NF- κ B 経路の活性を調節することでいくつかの炎症性メディエーターの発現誘導にも関与していることが示唆された。

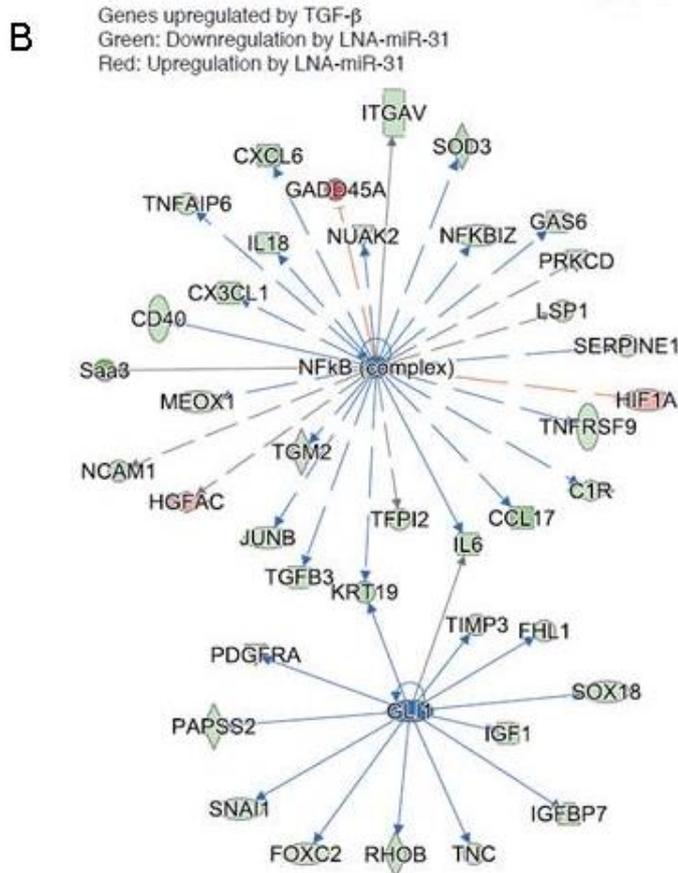
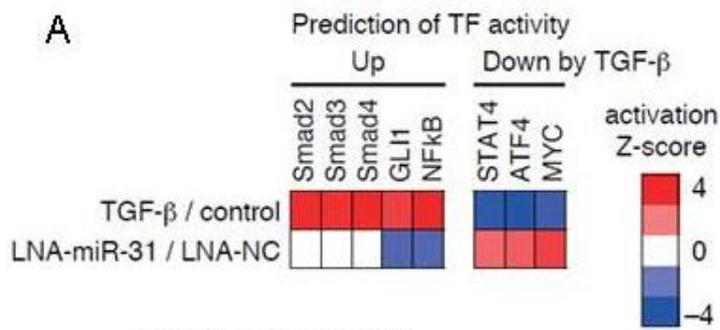


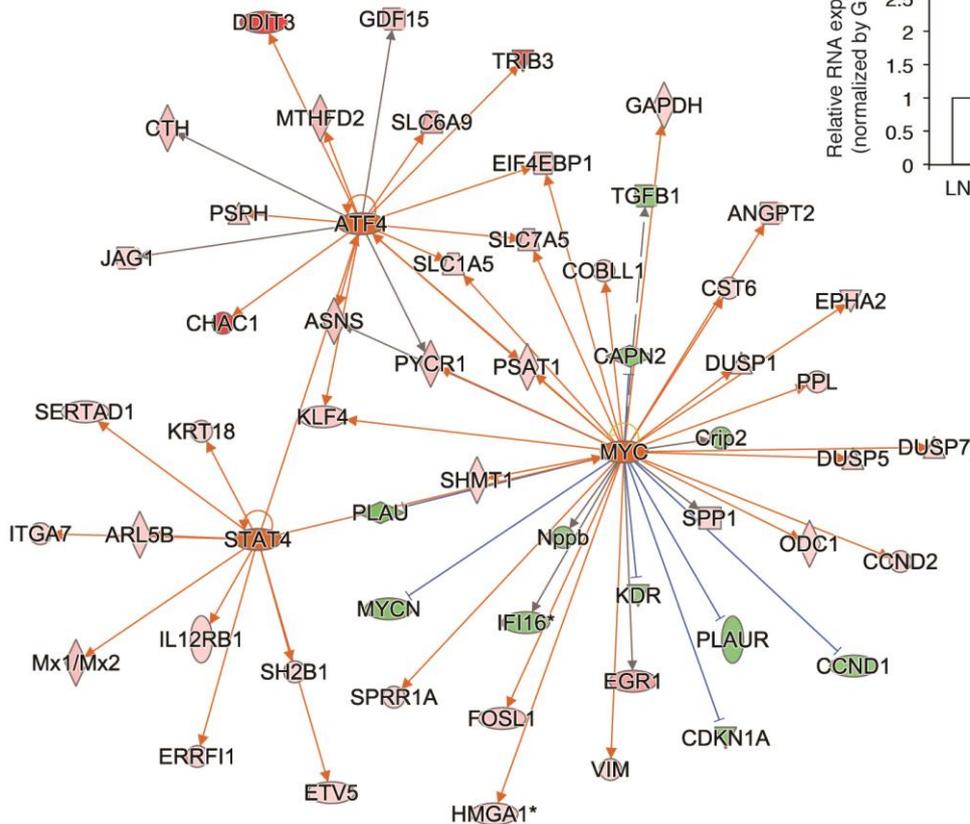
図 19. miR-31 による NF-κB と Gli1 による転写調節ネットワークの制御

(A) 転写因子の活性変化を予測するために、TGF-βによって発現上昇・低下する遺伝子に対する各転写因子の標的遺伝子の enrichment を IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 解析によって評価した。同様の解析を LNA-miR-31 と LNA-NC 間での遺伝子発現変化についても行った。

(B) NF-κB と Gli1 が制御する転写ネットワーク。これらの因子はいずれも TGF-βによって活性化され、LNA-miR-31 によって抑制されると考えられる。図中の NF-κB と Gli1 の標的遺伝子はいずれも TGF-βによってその発現が上昇する。緑は、その遺伝子の発現誘導が LNA-miR-31 によって抑制され、赤は、その遺伝子の発現誘導が LNA-miR-31 によって促進されることを示す。

A

Genes downregulated by TGF- β
 Green: Downregulation by LNA-miR-31
 Red: Upregulation by LNA-miR-31



B

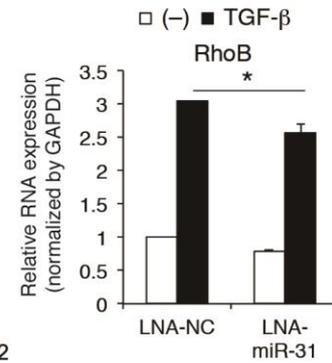


図 20. miR-31 による ATF4、STAT4、MYC による転写調節ネットワークの制御
 (A) ATF4、STAT4、MYC が制御する転写ネットワーク。これらの因子はいずれも TGF- β によってその活性が低下し、LNA-miR-31 によってその活性低下が減弱すると考えられる。図中の ATF4、STAT4、MYC の標的遺伝子はいずれも TGF- β によってその発現が低下する。緑は、その遺伝子の発現低下が LNA-miR-31 によって促進され、赤は、その遺伝子の発現低下が LNA-miR-31 によって減弱することを示す。

(B) TGF- β および LNA-miR-31 の RhoB の発現に与える影響の検討。MS-1 細胞に miRNA 阻害剤 (LNA) をトランスフェクション (50 nM) し、TGF- β (1 ng/ml) 刺激 48 時間後に RNA を回収し qRT-PCR を実施した。エラーバーは標準偏差を示す。* $p < 0.05$ 。

12. miR-31 制御ネットワークに対する TGF- β の影響 : Stk40 の同定

これまでの解析で TGF- β による miR-31 の活性の促進が予測され、実際に、EndMT において miR-31 が重要であることも見出された。その一方で miR-31 は MS-1 細胞の未刺激の状態ですべて非常に高い活性があり、MS-1 細胞において TGF- β 刺激による miR-31 の発現上昇は見られなかった。しかし、一方で、大変興味深いことに NF- κ B シグナルを負に調節する Stk40 の発現を TGF- β が miR-31 依存的に抑制することが見出された (図 21A)。Stk40 は、その機能についての詳細な検討がなされていないが、既報で NF- κ B シグナルを抑制することが報告されている (88)。これまでに、乾癬の臨床検体などを用いた解析において、miR-31 による Stk40 の抑制がケラチノサイトにおける炎症性サイトカインやケモカインの発現誘導に重要であることが報告されている (85)。これらの結果から、miR-31 は VAV3 のような miR-31 標的遺伝子の定常状態の発現レベルを変化させるだけでなく、Stk40 のような標的遺伝子の TGF- β に対する反応性も調節していることが示唆された (図 21A)。このことから EndMT における TGF- β と miR-31 の関係についていくつかの可能性が考えられた。TGF- β 刺激は miR-31 の機能活性を強めることが予測されたが、この現象の原因として、(1) TGF- β が miR-31 非依存的に miR-31 標的遺伝子群の転写を全般的に抑制することにより miR-31 標的 mRNA 量を減少させる、もしくは、(2) miR-31 の発現を変えることなく miR-31

の活性を変化させることで miR-31 標的遺伝子の発現抑制を誘導する、という 2 つの可能性が挙げられる。RNA シーケンシングの結果でも、GFA (GSEA-FAME analysis) の結果と一致して TGF- β が miR-31 の標的遺伝子を全般的に抑制する傾向がみられた (図 21B)。miR-31 の抑制は miR-31 標的遺伝子の発現に対する TGF- β の抑制効率を大きくは変化させなかったため TGF- β は miR-31 と独立して多くの miR-31 の標的遺伝子を抑制することが示唆された (図 21C)。miR-31 の標的遺伝子の抑制効率も総じて TGF- β による影響を受けないことがわかった (図 21D)。これらのことから、TGF- β 刺激は見かけ上 miR-31 の機能活性を強めるが、その原因として、前者の仮説、すなわち miR-31 の標的遺伝子の協調的な転写抑制が主たる要因であることが示唆された。しかし、にもかかわらず、図 21C、D の両者において、依然、TGF- β による Stk40 の抑制は miR-31 依存的であり、標的としての抑制効率が TGF- β によって促進されることを見出された。そこで、miR-31 の発現は変化しないにも関わらず、TGF- β によって miR-31 による抑制効率の上昇がみられた例外的な標的遺伝子 Stk40 についてさらに解析を進めた。

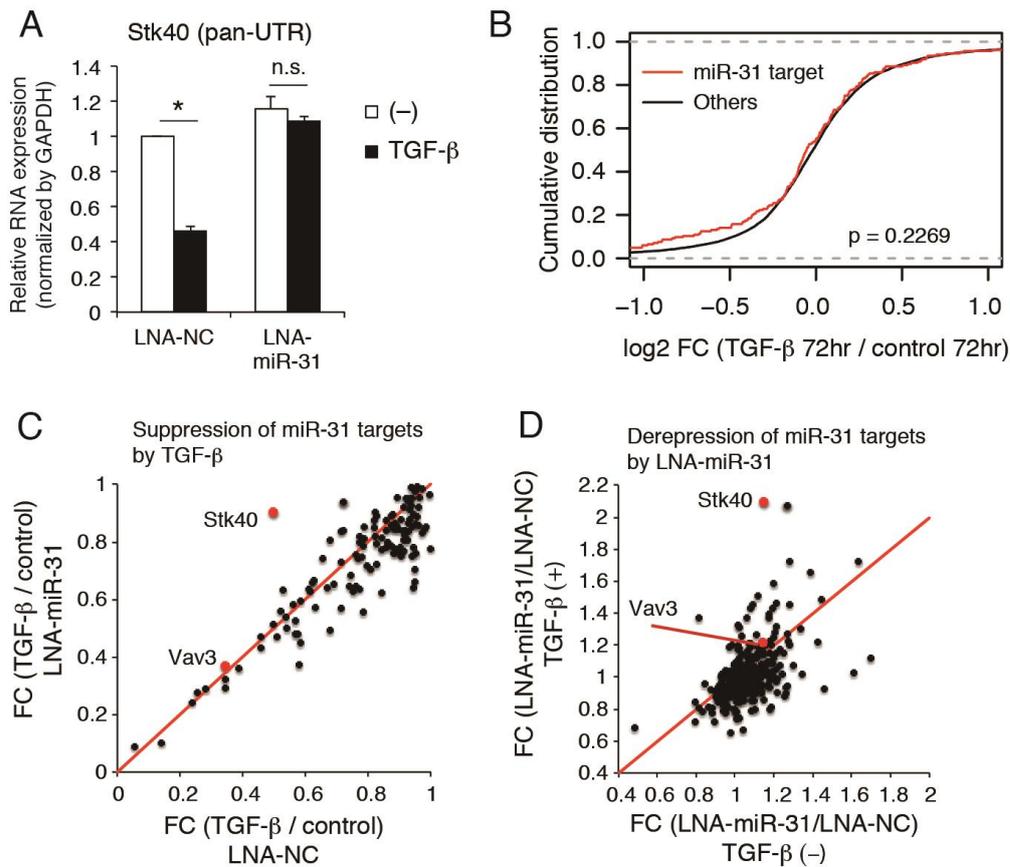


図 21. Stk40 は TGF- β 依存的に miR-31 の抑制を受ける

(A) LNA-miR-31 による Stk40 の発現変化。MS-1 細胞に miRNA 阻害剤 (LNA) をトランスフェクションし (50 nM)、TGF- β (1 ng/ml) 刺激 72 時間後に RNA を回収し qRT-PCR を実施した。エラーバーは標準偏差を示す。* $p < 0.05$ 、n.s.: not significant。

(B) TGF- β 刺激による miR-31 の標的候補遺伝子 (赤線) とそれ以外の遺伝子 (黒線) の遺伝子発現変化 (Log2 fold change (FC)) の分布図。P 値は、Kolmogorov-Smirnov test により算出した。有意な変化ではないが、TGF- β 刺激により miR-31 の標的候補遺伝子の発現が全般的に低下する傾向がみられる。

(C) LNA-miR-31 の有無のもとでの、TGF- β による miR-31 の標的遺伝子の抑制効率の比較。

(D) TGF- β の有無のもとでの、LNA-miR-31 による miR-31 の標的遺伝子の抑制解除効率の比較。

13. miR-31 制御ネットワークに対する TGF- β の影響：代替ポリアデニル化

RNA シーケンシングの結果をさらに解析し、TGF- β 刺激によって Stk40 の 3'UTR の長さが短縮することが示唆された (図 22A)。多くの遺伝子は、遺伝子内に複数のポリアデニル化シグナル (polyadenylation signal: PAS) 配列、ポリアデニル化部位を有しており、3'末端が異なる複数の mRNA アイソフォームを産生しうる。ポリアデニル化部位の選択の変化は代替ポリアデニル化 (alternative polyadenylation: APA) と呼ばれ、ポリアデニル化部位の選択は、細胞の増殖状況、細胞外からの刺激などによって影響される (89)。代替ポリアデニル化は mRNA の 3'UTR の長さを変更するため、3'UTR に含まれる miRNA 標的部位の構成も変更される。

Stk40 の 3'UTR の末端の変化を詳細に解析するため、続いて、3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により、Stk40 の 3'UTR アイソフォームの末端配列を同定した (図 22B)。これらの短い 3'UTR のアイソフォームの 5'側近傍に AAGAAA という非標準的ではあるが PAS 配列が認められたため、Stk40 の 3'UTR の短縮は TGF- β による代替ポリアデニル化の誘導によるものであることが推察された。

さらに Stk40 の全長の 3'UTR の末端部分には約 70 塩基の A が豊富な配列 (内部ポリ A 配列、internal Poly(A) sequence: IPAS) が存在することを見出した。す

なわち、TGF- β は Stk40 の 3'UTR の短縮を誘導し、内部ポリ A 配列を持たない短い RNA アイソフォームを生じさせるということになる。qRT-PCR でも TGF- β によって、Stk40 の 3'UTR が長いアイソフォームが減少することを確認した (図 22C)。

代替ポリアデニル化によって 3'UTR の長さが短くなった場合に、短縮した 3'UTR に含まれていた miRNA 標的配列が 3'UTR から含まれなくなることにより、対応する miRNA による標的効率が低下することが報告されている (89,90)。Stk40 の場合、長短のアイソフォームにおいて、含まれる miR-31 の標的配列の数は変わらないことから (図 22A)、TGF- β 刺激によって Stk40 に対する miR-31 の抑制効率が促進されるメカニズムとして、別の機序が関与している可能性が考えられた。

TGF- β によって誘導される Stk40 3'UTR の短縮と、これに伴う内部ポリ A 配列の除外が、miR-31 の標的としての効率に影響を与える可能性を詳細に検討するために、図 23A に示すような様々な Stk40 3'UTR レポーターベクターを作成し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを実施した (図 23B)。結果として、miR-31 による抑制効果は短い 3'UTR のアイソフォームで促進され、全長の 3'UTR から内部ポリ A 配列を除いたアイソフォームでもその抑制効果が強まることが見出された (図 23B)。この結果から、代替ポリアデニル化が miRNA の標的配列の構

成を変えることで miRNA による標的効率を修飾するだけでなく、内部ポリ A 配列の有無を調節することで miRNA による標的効率を修飾するという新しいメカニズムが示唆された。一方で、TGF- β 刺激による Stk40 のスプライシングアイソフォームには変化がないようであった。

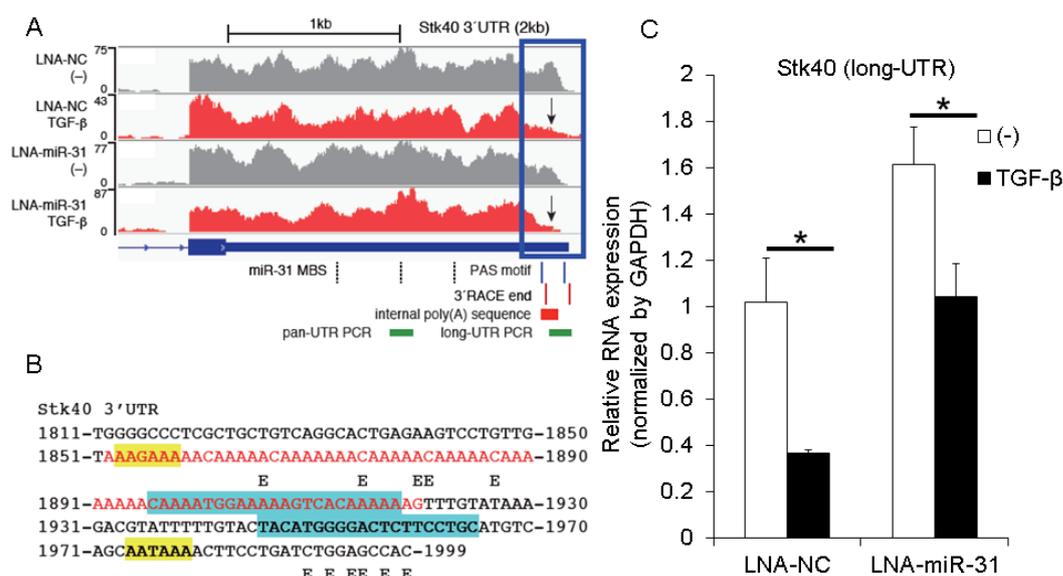


図 22. TGF- β による Stk40 3'UTR の代替ポリアデニル化

(A) RNA シーケンシングによる Stk40 3'UTR のプロファイリング。miR-31 binding site (MBS)、polyadenylation signal (PAS) motif、3'-RACE end、internal poly(A) sequence、PCR 増幅箇所を図中に示す。

(B) Stk40 3'UTR と 3'-RACE の結果。Internal poly(A) sequence (赤)、PAS motif (黄)、long-UTR PCR プライマー (青) を図中に示す。E は 3'-RACE によって同定した mRNA の末端を示す。

(C) Stk40 の長いアイソフォームの発現への TGF- β の影響。MS-1 細胞に miRNA 阻害剤 (LNA) をトランスフェクションし (50 nM)、TGF- β (1 ng/ml) 刺激 72 時間後に RNA を回収し qRT-PCR を実施した。エラーバーは標準偏差を示す。* $p < 0.05$ 。

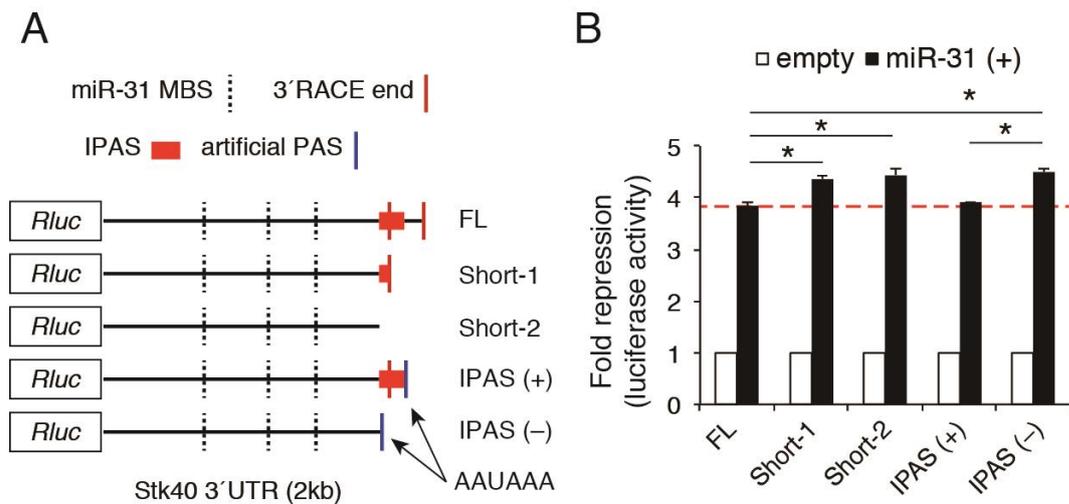


図 23. Stk40 3'UTR 短縮と内部ポリ A 配列の除去による miR-31 の Stk40 抑制効果の亢進

(A) 使用したレポーターベクターの構造。IPAS (internal poly(A) sequence)の除去の影響をみるベクターについては、代表的な PAS motif (AATAAA) を 3'UTR 末端に挿入した。FL は Full length を指す。

(B) HEK293T 細胞に (A) のように設計したレポータープラスミドと empty ベクターもしくは pri-miR-31 発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。エラーバーは標準偏差を示す。

* $p < 0.05$ 。

14. TNF- α は TGF- β による EndMT と EndMT-SP を促進する

最後に TGF- β と他のシグナル経路のクロストークについて検討した。上皮細胞において miR-31 が TNF- α によって誘導されるという報告があるため (91)、EndMT における TNF- α の役割について焦点をあてた。まず MS-1 細胞において miR-31 が TNF- α によって発現が上昇することを見出した (図 24)。

さらに、TNF- α は、CCL17、CX3CL1、CXCL16、IL-6、Angptl2、CXCL5 などのケモカインやサイトカインの TGF- β による発現上昇を促進した (図 25A)。また、LNA-miR-31 によって、TGF- β と TNF- α による α -SMA の相乗的な発現誘導が全般的に抑制された。そして、miR-31 の抑制によって、TGF- β による CCL17、CX3CL1、CXCL16 などいくつかのケモカインの発現誘導に対する TNF- α の付随的な促進効果が抑制されることも見出した (図 25B)。これらの結果から、TNF- α は miR-31 の誘導を介して、TGF- β によって誘導される EndMT や EndMT-SP を促進することが示唆された。

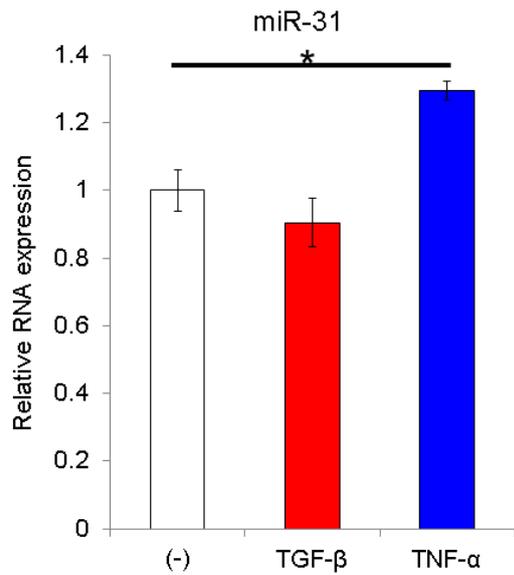


図 24. MS-1 細胞において TNF- α は miR-31 の発現を上昇させる

MS-1 細胞を TGF- β (1 ng/ml) もしくは TNF- α (100 ng/ml) で刺激し、48 時間後に RNA を回収し qRT-PCR を実施した。エラーバーは標準偏差を示す。* $p < 0.05$ 。

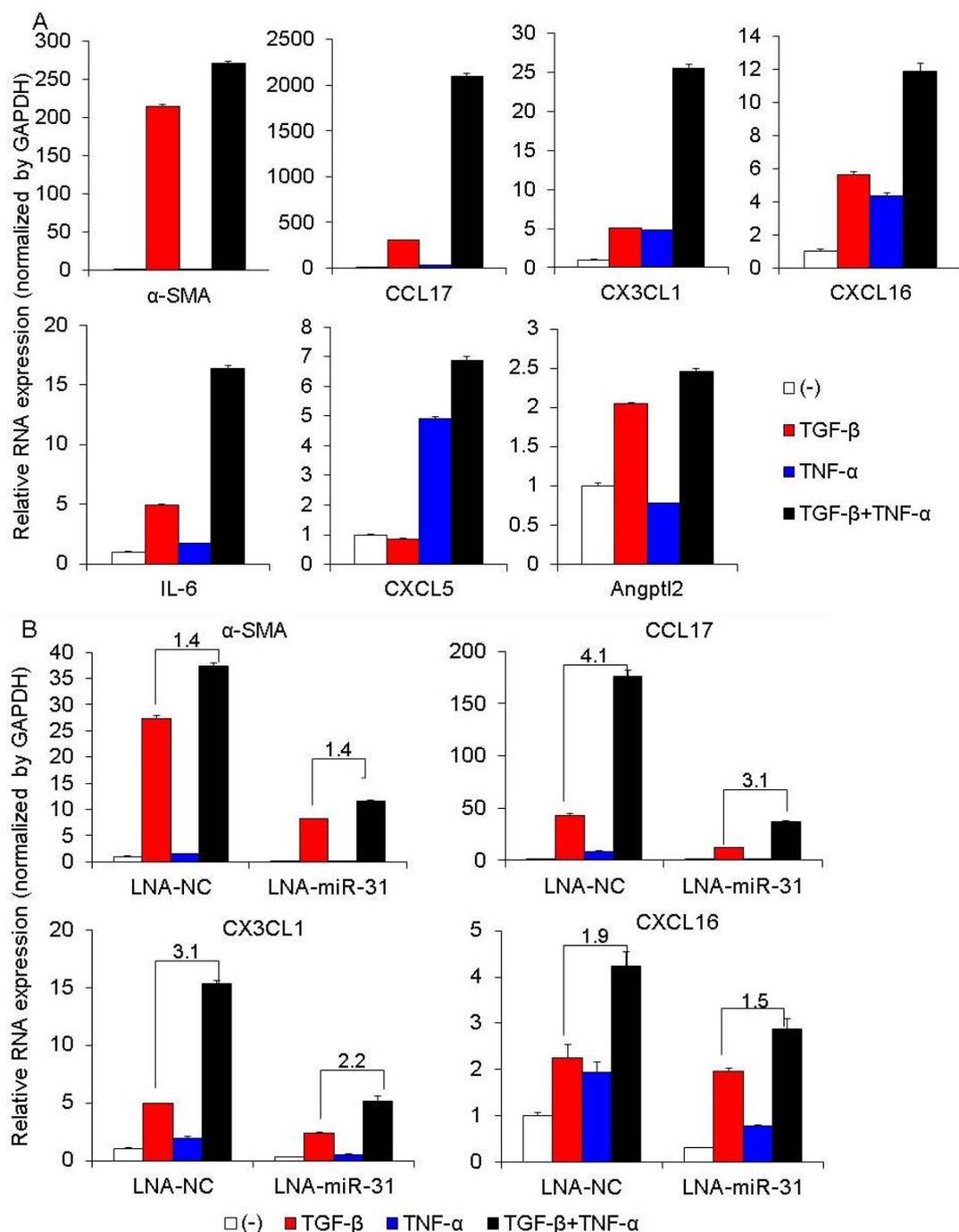


図 25. LNA-miR-31 は TNF-α による EndMT、EndMT-SP の促進を抑制する

(A) TGF-β が誘導する EndMT、EndMT-SP への TNF-α の影響。MS-1 細胞を TGF-β2 (1 ng/ml)、TNF-α (100 ng/ml) で刺激し、72 時間後に RNA を回収し qRT-PCR を実施した。

(B) TGF-β と TNF-α による EndMT、EndMT-SP の協調的促進に対する miR-31 抑制の影響。MS-1 細胞に miRNA 阻害剤 (LNA) をトランスフェクションし (50 nM)、TGF-β2 (1 ng/ml)、TNF-α (100 ng/ml) で刺激し、72 時間後に RNA を回収し qRT-PCR を実施した。エラーバーは標準偏差を示す。

第三章 考察

miR-31 の内皮細胞における役割について

本研究では、miR-31 が TGF- β によって誘導される EndMT の新たな調節因子であることを見出した (図 26)。miR-31 は腫瘍組織において様々な発現変化を示し、腫瘍進展において多様な働きをすることが報告されている (81)。血管生物学においては、miR-31 が血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、血管平滑筋細胞を制御することがいくつか文献的に報告されている。Pedrioli らは血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞において miRNA の発現解析を行い、miR-31 が血管内皮細胞で特徴的に発現する miRNA であり、リンパ管内皮細胞分化の主な調節因子である PROX1 を標的としてリンパ管内皮細胞特異的な転写産物を転写後レベルで制御することを示している (92)。また miR-31 は血管平滑筋細胞でも豊富であり、血管平滑筋細胞の成長を促進し、その形態を調節するとも言われている (93)。これらのことから、miR-31 は血管内皮細胞や血管平滑筋細胞にとって非常に重要であることが伺えるが、本研究によって EndMT の内在性の促進因子という miR-31 の新しい機能が新たに見出された。以上をまとめると、miR-31 は血管生物学において 2 つの重要な機能があるといえる。1 つ目は血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の内因性機能の調節であり、2 つ目は外因性刺激 (TGF- β など) に対す

る内皮細胞の反応性を調節し、EndMTの誘導を可能にすることである。

TGF- β によってEndMTと並行して誘導されるEndMT-SP

RNAシーケンシングの結果から、TGF- β によって誘導されるEndMTに関連した新しい特徴的な表現型として、EndMT-SPを見出した。本研究で見出されたEndMT-SPは、内皮細胞がEndMTを起こすと同時にCCL17、IL-6など免疫反応や炎症に関与する多くのサイトカインやケモカインが発現するようになるという現象である。さらに、本研究では、MS-1細胞で見られたCCL17、CX3CL1、CXCL16、CXCL5、IL-6、Angptl2の産生増加といった分泌亢進現象は内在性のmiR-31に依存していることも明らかになった。そして、このような現象がTGF- β およびmiR-31によるNF- κ B経路の活性化の調節によるものであろうことも本研究結果から示唆された。Xuらは、乾癬におけるケラチノサイトではmiR-31の発現が上昇しており、miR-31がNF- κ Bシグナルの負の調節因子であるStk40の抑制を介して炎症性サイトカインやケモカインの発現を増加させていることも報告している(85)。本研究の結果は、TGF- β におけるEndMTの際にmiR-31は間葉系マーカーの発現誘導を調節するだけでなく、EndMT-SPという分泌表現型の獲得も制御していることを示唆している。

EndMT-SP と疾患への関与

EndMT-SP は EndMT と TGF- β に関連した多様な病態の根底にあるかもしれない。TGF- β によって最も発現が上昇した CCL17 は動脈硬化の病態に関連していることが報告されている上に (94)、がん微小環境において制御性 T 細胞に対して歩化性因子として作用する (95)。さらに CXCL5、CX3CL1、IL-6、Angptl2 は局所における慢性炎症やがんの進展に関与していることが報告されている (96-98)。最近、miR-31 がケラチノサイトの過剰増殖を促進し、また末梢組織 (胸腺外) で産生される制御性 T 細胞の産生を抑制すること、miR-31 を欠損させると動物モデルにおいて乾癬や実験的自己免疫性脳炎の重症度が下がることが報告されている (99,100)。これらの報告と本研究結果を総合して考慮すると、miR-31 は組織の炎症の重要なメディエーターであることが考えられる。さらなる研究によって EndMT-SP の *in vivo* での病理学的重要性、および EndMT-SP における miR-31 の重要性が明らかになるものと考えられる。治療への応用の可能性としては、miR-31 の活性を低下させることで EndMT や EndMT-SP が調節出来るかもしれない。

miR-31 による RhoA-MRTF-A シグナルの制御

本研究では、miR-31 が TGF- β による RhoA-MRTF-A シグナルの活性化を促進

することを明らかにした。miR-31 はがん細胞や破骨細胞を含む他の細胞種では RhoA を抑制すると報告されているが (81,82)、本実験結果からはむしろ RhoA の正の制御因子であることが示唆された。このメカニズムを解明するために RNA シークエンスを行い、VAV3 を miR-31 の標的として同定した。以上から少なくとも MS-1 細胞では miR-31 は VAV3 を標的として TGF- β による RhoA シグナルの活性化を促進すると考えられた。さらに miR-31 の標的遺伝子が VAV3 以外にも細胞骨格関連シグナルに関係する遺伝子の多岐に及んでいることから、miR-31 はより複雑な機構を介して細胞骨格関連のシグナルを制御するのかもしれない。

TGF- β による代替ポリアダニル化と miR-31 の標的抑制効果の増強

ケラチノサイトなどでは TGF- β が miR-31 の発現を上昇させるとの報告があるが (85)、MS-1 細胞においては TGF- β による miR-31 の発現上昇は見られなかった。その一方で当初の解析では MS-1 細胞では miR-31 の活性上昇が推察されており、その後の解析においても、EndMT における miR-31 の重要性が見出された。本研究結果からは、TGF- β は協調的に多くの miR-31 の標的遺伝子の発現を低下させるとともに、代替ポリアダニル化によって Stk40 に対する miR-31 の抑制効率を増強し、miR-31 の活性をあたかも強めているようにみせることが示唆され

た。miRNA の標的遺伝子に関しては細胞の種類や細胞のおかれた環境によってほとんど影響されないということが示唆されているが (90)、一方で最近の報告では、miRNA の標的遺伝子の種類は状況によって大きく異なりうることも報告されている (101)。こうした細胞のおかれた状況による違いは、例えば細胞の状況によって別々に観察される 3'UTR のアイソフォームが miRNA の認識配列を含むかそうでないかという観点から、部分的に説明が可能である (90)。本研究では、TGF- β 依存的な代替ポリアデニル化による miR-31 の Stk40 抑制効率の亢進が観察され、このような細胞のおかれた文脈依存的な miRNA の標的志向性の変化を支持する結果であった。一方で、Stk40 の長短のアイソフォームは同じ数の miR-31 の認識配列を含んでいた。miRNA の標的配列の 3'UTR 内における相対的な位置によって、miRNA の認識配列としての効率が変わり、例えば、より 3'末端に近い標的配列ほど効率よく miRNA によって抑制されるということはよく知られている (74)。これを本研究の結果にあてはめると、miR-31 の認識配列と 3'UTR の末端部位が近いほど認識配列としての効率が増強し得るということになる。一方で、本研究では、文脈依存的な miRNA の標的志向性の変化のメカニズムとして、内部ポリ A 配列が Stk40 の 3'UTR の標的部位としての効率を調節していることを見出した。内部ポリ A 配列は mRNA の約 10% でみられるが (102)、その機能は解析されておらず、本研究結果は RNA 分子において内部ポリ

A 配列が機能的な役割を果たしているということを最初に示したものである。

分子的な機序としては、RISC は mRNA の末端にあるポリ A 配列とポリ A 結合タンパクの相互作用を調節することで mRNA の安定性を調節することが知られているが (103)、内部ポリ A 配列が、こういった RISC のポリ A 結合タンパクとポリ A 配列の相互作用に影響し、miRNA を介した mRNA の脱アデニル化と不安定化を修飾することが考えられた。これらの結果から、本研究によって文脈依存的な miRNA の標的志向性の変化について新たな分子メカニズムが示唆された。さらに、既報における一連の研究結果から、miRNA を介した遺伝子制御について上記以外の複雑な調節機構も示唆されている (104)。Competing endogenous RNA (ceRNA, 競合内在性 RNA) という概念は、細胞内の内在性の miRNA の標的遺伝子プールの変動が、miRNA を介した遺伝子制御を逆に調節するというものである (104)。本研究では、TGF- β による miR-31 の標的遺伝子群の広範な抑制が認められており、ceRNA コンセプトに類似した調節機構を介して、この現象が TGF- β 存在下で miR-31 が Stk40 をより強く抑制することに寄与している可能性もある。UV クロスリンクを用いた免疫沈降などを応用した miRNA と標的遺伝子の相互作用の網羅的な解析によって、TGF- β によって誘導される EndMT のより詳細なメカニズムの解明が期待される。従来報告では、多くの研究が、様々な生物学的状況・実験条件において発現変化が誘導される

miRNA のトランスクリプトームの変動への寄与に焦点をおいてきたが、本研究の結果は恒常的に活性な miRNA がトランスクリプトーム変動において予期せぬ重要な機能を持っている可能性を示唆している。

多様な EndMT 機構と今後の治療標的としての展望

近年、内皮細胞の EndMT 誘導性は、従来考えられていた EndMT の過程よりも極めて多彩で複雑な機構であることがわかってきている (105)。TGF- β による EndMT においても、他のシグナル経路が EndMT の程度を調節していることが考えられる。このような調節因子として、IL-1 β などは TGF- β によって誘導された EndMT を促進することが報告されている (106)。逆に FGF-2 などは TGF- β によって誘導された EndMT を抑制することが知られている (105)。miR-31 は TGF- β 、TNF- α や BMP-2 などいくつかの細胞外刺激によって調節されるため (85,91)、miR-31 は EndMT の程度を調節する上で、様々な細胞外刺激が収束する分子ハブとして機能し得るのかもしれない。実際に MS-1 細胞において TNF- α が miR-31 の発現を上昇させ、EndMT と EndMT-SP を促進することを見出した。前述したような TGF- β と他のサイトカイン間の EndMT 誘導における協調的なあるいは拮抗的な相互作用は miR-31 に対するそれぞれのシグナルの作用から説明出来るのかもしれない。

総括すると、本研究では MS-1 細胞において miR-31 を EndMT に対する正の調節因子として同定した。さらに miR-31 は MRTF-A と NF- κ B の制御因子を調節し、間葉系マーカーと EndMT-SP の誘導に必要であることを示した(図 26)。

miRNA は発現が誘導される場合のみでなく、恒常的に発現している場合でも標的 mRNA の 3'UTR の長さおよび構造が変化することによって、その標的指向性を変化させ、EndMT 過程に重要な役割を果たすことが明らかとなった。今回の結果から EndMT の生理的および病的プロセスへの理解がより深まり、EndMT を制御する治療法につながることを期待される。

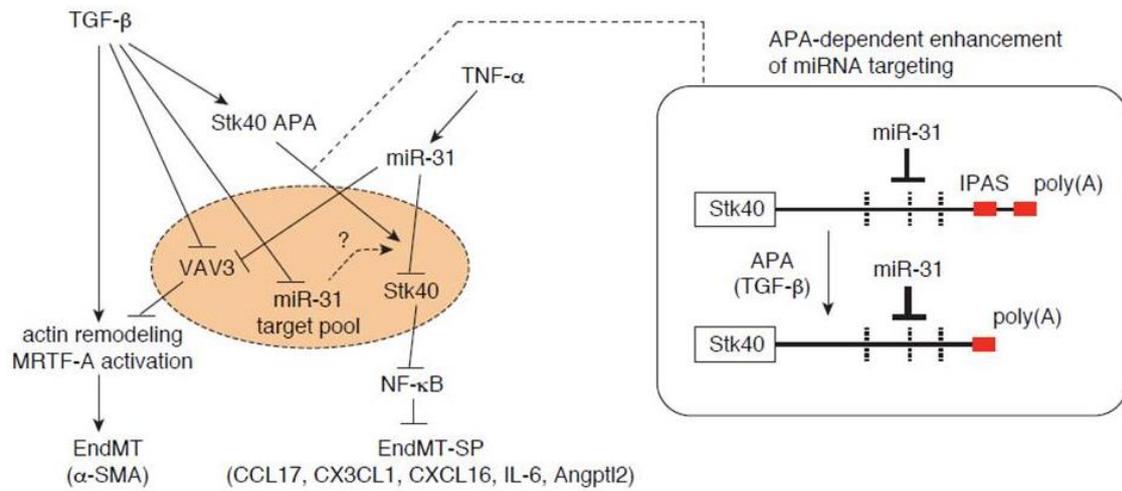


図 26. TGF-βが誘導する EndMT、EndMT-SP における miR-31 の役割

本研究で明らかになった EndMT のメカニズム概略図。恒常的に発現している miR-31 は TGF-β による EndMT と EndMT-SP の誘導に必要である。miR-31 はそれぞれ MRTF-A と炎症反応を負に調節する VAV3 と Stk40 を標的として制御する (左図)。miR-31 は TGF-β によって発現自体は変わらないが、TGF-β 依存的に Stk40 を制御する。具体的には TGF-β による代替ポリアデニル化によって内部ポリ A 配列が除かれ Stk40 3'UTR が短くなることで、miR-31 がより効率的に Stk40 を標的として抑制出来るようになる (右図)。

第四章 材料と方法

1. 細胞培養

全ての細胞株は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

MS-1 血管内皮細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より購入し、10% fetal bovine serum (FBS)、50 U/ml penicillin (Thermo Fisher Scientific)、50 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific) を含む、Minimum Essential Medium-Alpha (MEM- α) medium (Thermo Fisher Scientific) により培養した。

HEK293T 細胞は ATCC より購入し、10% FBS、50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycin を含む、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) により培養した。

HEK293FT 細胞は ATCC より購入し、10% FBS、50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycin、1 mM sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific)、0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acid (Thermo Fisher Scientific) を含む DMEM により培養した。

2. 増殖因子

TGF- β 2 と TNF- α は R&D System 社より購入し、前者は 0.1% Bovine Serum

Albumin を含む 4 mM HCl で 1 ng/ μ l となるよう溶解し 1 ng/ml の濃度、後者は PBS で 10 ng/ml となるよう溶解し、100 ng/ml の濃度で実験に使用した。

3. cDNA マイクロアレイ解析

バイオマトリックス研究所(株)に委託して行った。TGF- β 2 (1 ng/ml) 有無でそれぞれ 24、72 時間培養した MS-1 細胞より RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を回収した。cDNA を合成した後に断片化ならびに GeneChip WT Terminal Labelling Kit (Affymetrix) によるビオチン標識を実施した。さらに GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affimetric) 上で、16 時間断片化・ラベル化した cDNA のハイブリダイゼーションを行い、洗浄・染色後にスキャナーで蛍光を読み取った。データ解析については、Affymetrix GeneChip Command Console Software および Affymetrix Expression Console (Affymetrix) により数値化、RMA (Robust Multichip Array) 法によって標準化した。GSEA-FAME analysis (GFA) は既報と同様の手法で行った (64,67)。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) は、GSEA ソフトウェア (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>) を用いて実施した (65)。miRNA 標的遺伝子セットを用いて GSEA を実施し、TGF- β によって上昇または低下する遺伝子セットそれぞれについて各標的遺伝子セットから lead edge genes を抽出してひとまとめにし、TGF- β によって上昇または低下する

miRNA 標的遺伝子グループとした。この遺伝子グループについて、Ulitsky らの報告に沿って Functional Assignment of miRNAs via Enrichment (FAME) を実施した (66)。

4. プラスミド

(1) TuD RNA は miRNA の各配列を元に作成した (表 1) (69)。エントリーベクター(pENTR-H1) を介して Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて CSII-RfA-EG (RIKEN の三好洋美博士より供与頂いた) に移して作成した。

(2) Pri-miRNA 発現ベクターは以前の報告を元に作成した (107-109)。

(3) miRNA レポーターベクターは psiCHECK2 dual luciferase reporter vector (Promega) のルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR に miRNA の相補配列または標的遺伝子の 3'UTR を挿入して作成した。

(4) MRTF-A と VAV3 の発現ベクターについては MS-1 細胞の cDNA より (表 2) のプライマーを用いてクローニングし、pcDNA3 発現ベクターに組み込んだ。

表 1. 本研究で使用した TuD RNA の配列

Gene	TuD RNA insert (The underlined nucleotides indicate BamHI and XbaI sites)
TuD-NC	Forward:5' - <u>gatcc</u> GACGGCGCTAGGATCATCAACAAGCCACAACGAATCTCTAT ATCATCAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACAAGCCACAACGAAT CTCTATATCATCAAGATGATCCTAGCGCCGTCTTTTTT <u>t</u> -3' Reverse:5'- <u>ctaga</u> AAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGATGATATAG AGATTTCGTTGTGGCTTGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTTGATGA TATAGAGATTTCGTTGTGGCTTGTTGATGATCCTAGCGCCGTC <u>g</u> -3'
TuD-miR-31	Forward:5' - <u>gatcc</u> GACGGCGCTAGGATCATCAACCAGCTATGCCAGtctgCATCTT GCCTCAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACCAGCTATGCCAGtctgC ATCTTGCCTCAAGATGATCCTAGCGCCGTCTTTTTT <u>t</u> -3' Reverse:5'- <u>ctaga</u> AAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGAGGCAAGA TGacgaCTGGCATAGCTGGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTTGAGG CAAGATGacgaCTGGCATAGCTGGTTGATGATCCTAGCGCCGTC <u>g</u> -3'
TuD-miR-128	Forward:5' - <u>gatcc</u> GACGGCGCTAGGATCATCAACAAAGAGACCGGacagTTCAGTGTGAC AAGTATTCTGGTCACAGAATACAACAAAGAGACCGGacagTTCAGTGTGAC AAGATGATCCTAGCGCCGTCTTTTTT <u>t</u> -3' Reverse:5'- <u>ctaga</u> AAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGTACAGTGAActgt CCGGTCTCTTTGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTTGTACAGTGAActgtCC GGTCTCTTTGTTGATGATCCTAGCGCCGTC <u>g</u> -3'
TuD-miR-300	Forward:5' - <u>gatcc</u> GACGGCGCTAGGATCATCAACGAAGAGAGCTTGccaaCCCTTGCATA CAAGTATTCTGGTCACAGAATACAACGAAGAGAGCTTGccaaCCCTTGCATA CAAGATGATCCTAGCGCCGTCTTTTTT <u>t</u> -3' Reverse:5'- <u>ctaga</u> AAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTTGTATGCAAGGGttgg CAAGCTCTCTTCGTTGTATTCTGTGACCAGAATACTTGTATGCAAGGGttggC AAGCTCTCTTCGTTGATGATCCTAGCGCCGTC <u>g</u> -3'

表 2. 本研究におけるベクターの作成などに使用したプライマー配列

Vectors	Primer sequence
miR-31 sensor	(Sensor-oligo-forward: XhoI-SacI-(miRNA-complementary sequence)-NotI) forward 5'- TCGAGagtagagetctagtCAGCTATGCCAGCATCTTGCCTgc -3' reverse 5'- ggccgcAGGCAAGATGCTGGCATAGCTGactagagcttactC -3'
MRTF-A	forward 5'- <u>cggaattc</u> GGGCCGCCTTTGAAAAGCCCCG -3' reverse 5'- <u>gctctaga</u> CTACAAGCAGIGAATCCCAGT -3' (The underlined nucleotides indicate EcoRI and XhaI sites)
VAV3	forward 5'- <u>cggaattc</u> ATGGAGCCGTGGAAGCAGTG -3' reverse 5'- <u>gctctaga</u> TTATTCATCTTCTTCCACATATGTGG -3' (The underlined nucleotides indicate EcoRI and XhaI sites)
VAV3 3'UTR reporter	forward 5'- <u>ccgctcgag</u> AGTCCTATCCAGTGTTGACC -3' reverse 5'- ataagaat <u>gcgccgc</u> GTAGTAACTATTTT -3' (The underlined nucleotides indicate XhoI and NotI sites)
RACE	GSP-F 5'- CTGTAGGGGTGGGGACCTTCCTACC -3' NGSP-F 5'- CTCCGGAGGCCTACCTCCTGTGTACCC -3'
Stk40 3'UTR reporter	forward 5'- <u>ccgctcgag</u> AGTCCTATCCAGTGTTGACC -3' (FL) reverse 5'- ataagaat <u>gcgccgc</u> GTAGTAACTATTTT -3' (The underlined nucleotides indicate XhoI and NotI sites) (shortA) reverse 5'- ataagaat <u>gcgccgc</u> GTAGTAACTATTTT -3' (shortB1) reverse 5'- ataagaat <u>gcgccgc</u> GTAGTAACTATTTT -3' (shortB2) reverse 5'- ataagaat <u>gcgccgc</u> GTAGTAACTATTTT -3' (IPAS (-)) reverse 5'- ataagaat <u>gcgccgc</u> GTAGTAACTATTTT -3' (IPAS (+)) reverse 5'- ataagaat <u>gcgccgc</u> GTAGTAACTATTTT -3'
pri-miR-31	forward 5'- <u>cgggatcc</u> TACTTCGGAACACCTTGTC -3' reverse 5'- <u>ccgctcgag</u> AAGAGTTCTCCACTGATGCC -3' (The underlined nucleotides indicate BamHI and XhoI sites)

5. レンチウイルス感染

(1) ウイルス液の調製

作成した発現ベクター、パッケージングベクター (pCAG-HIVgp、pCMV-VSV-G-RSV-Rev) を Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて HEK293FT 細胞にトランスフェクションした。24 時間後培地を交換し、その 48 時間後に培養上清を回収した。

(2) ウイルス感染

MS-1 細胞 (5.0×10⁴ 個/well、6 well plate) を、MEM- α 500 μ l と回収した培養上清 500 μ l を混合した培地下で培養し、24 時間後に培地を交換した。48 時間 MEM- α のみで培養しさらに同様の方法で培養上清を用いて MS-1 細胞にレンチウイルスを感染させた。24 時間後に培地を交換し培養後、以降の実験に使用した。

6. miRNA 阻害剤、合成 miRNA 2 本鎖、および siRNA

LNA miRNA inhibitor (miRCURY LNA microRNA Power Inhibitor, Negative Control B および miR-31) は EXIQON、合成 miRNA 2 本鎖 (miScript miRNA Mimic) は QIAGEN から購入した。VAV3 に対する siRNA は (表 3) の配列のものを Thermo Fisher Scientific (Invitrogen) から購入した。Negative control siRNA も

Thermo Fisher Scientific (Invitrogen) から購入した。これらのオリゴヌクレオチド (20 または 50 nM) を Lipofectamine RNAiMAX、Lipofectamine2000 (Thermo Fisher Scientific)、ScreenFectA (Wako) を用いてトランスフェクションして実験に使用した。

表 3. siRNA の配列

遺伝子	siRNA 配列
VAV3#1	5'- CGGAAGATCTTCAACTGCAAATATT -3'
VAV3#2	5'- GCAAAGGAGTGCAGTTGGAATGTAA -3'

7. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

MS-1 もしくは HEK293T 細胞を 24 well plate に播種し、レポーターとオリゴヌクレオチドを Lipofectamine2000 もしくは ScreenFectA (Wako) を用いてトランスフェクションした。TGF- β 刺激を伴うものについてはトランスフェクションの 3 時間後に刺激を行った。 α -SMA レポーターアッセイに対しては pTK-RL を補正として同時にトランスフェクションした。トランスフェクションもしくは TGF- β 刺激から 48 時間後に細胞を回収し、Dual luciferase assay system (Promega) によりウミシイタケおよびホタルのルシフェラーゼ活性を測定し、両者の比をルシフェラーゼ活性として使用した。ルシフェラーゼ活性は、Mithras LB 940 (BERTHOLD) または MicroLumat Plus LB96V (BERTHOLD) を用いて検出した。

α -SMA レポーターについては、ホタルルシフェラーゼの活性値をウミシイタケルシフェラーゼの活性値で補正した。miRNA センサーおよび 3'UTR レポーターについては、ウミシイタケルシフェラーゼの活性値をホタルルシフェラーゼの活性値で補正した。

8. 蛍光免疫染色 (Phalloidin/Actin 染色)

8 well の Lab-Tek II Chamber Slide (LAB-TEK) に MS-1 細胞を 2.0×10^3 個/well で播種し、16 時間後に TGF- β 1 ng/ml 刺激し、その 24 時間後に 4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) により室温で 5 分間固定し、さらに 0.2% Triton-X を用いて室温で 5 分間膜透過処理した。Blocking One (nacalai tesque) を用いて 100 倍に希釈した Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Sigma-Aldrich、カタログ番号 P1951) を室温で 1 時間反応させ、TO-PRO®-3 (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 T3605) にて室温で 5 分間核染色を行った。各試薬間の洗浄は PBS を用いた。核染色後、Fluorescent Mounting Medium (Dako)、NEO micro cover glass (MATSUNAMI) を用いて封入した。観察は共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 META (Carl Zeiss)、40 倍対物レンズ (plan neofluar 40 \times /1.3) を用いて行った。

9. RNA の抽出と定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

トランスフェクションの実験では、MS-1 細胞の播種と同時に、オリゴヌクレオチドを Lipofectamine RNAiMAX を用いてトランスフェクションし、トランスフェクションした 16 時間後に TGF- β 刺激を行った。mRNA の検出には miRNeasy Mini Kit もしくは RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、Oligo dT primer を用いて PrimeScript® II first-strand synthesis system (Thermo Fisher Scientific) または SuperScript III First-Strand Synthesis System により、cDNA を合成した。RT-PCR は (表 4) に示すプライマーと FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche) を用いて Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System により施行した。miRNA の検出については、miScript II RT Kit による逆転写反応を実施し、miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) および Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System を用いて RT-PCR を施行した (107-109)。

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) または U6 snRNA をそれぞれ mRNA、miRNA の内在性コントロールとし、標準化した。サンプル数を 2 または 3 として各実験で RT-PCR を行った。

表 4. 定量的 RT-PCR に用いたプライマー配列

Gene	F/R	Primer sequence
GAPDH	forward	TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT
	reverse	TGCCGTTGAATTTGCCGT

α -SMA	forward	AGCGTGAGATTGTCCGTGACAT
	reverse	GCGTTCGTTTCCAATGGTGA
SM22 α	forward	GTGTGGCTGAAGAATGGTGTGA
	reverse	GCCACCTGTTCCATCTGCTTAA
Smad7	forward	TGTTGCTGTGAATCTTACGGGAAG
	reverse	TGCACGGTGAAACCCGTCCAT
Fibronectin1	forward	AACATGGCTTTAGGCGGACAA
	reverse	ACCGATTTGGACCTCCTCATC
PAI-1	forward	CCACAAAGGTCTCATGGACCAT
	reverse	TGAAAGTGTTGTGCCCTCCAC
VEGFR2	forward	GATGCAGGAAACTACACGGTCA
	reverse	TCCATAGGCGAGATCAAGGCT
CD34	forward	CCAAACAGAAACCCGTGGAGA
	reverse	GTAATGGCTGTTGGCTTCCAC
VAV3	forward	TGACAGCATCACTTGGGAAA
	reverse	GGAGAGCTTCCAGACAGGTG
Stk40 (pan-UTR)	forward	TAGGCCTTGGAGGGAAATCT
	reverse	CTTTGCTTGGTTTTGGGTGT
Stk40 (long-UTR)	forward	CAAAATGGAAAAAGTCACAAAAA
	reverse	GCAGGAAGAGTCCCCATGTA
RhoB	forward	TTCTAAAGAGCCAGGCCTCA
	reverse	GCAACAGTAGTGGCTTGCTG
CCL17	forward	AGTGGAGTGTTCCAGGGATG
	reverse	CTGGTCACAGGCCGTTTTAT
CX3CL1	forward	GGAAAGAAACGTGGTCCAGA
	reverse	GCCCTCAGAATCACAGGGTA
CXCL16	forward	GGGAAGAGTTTTACACCA
	reverse	GGTTGGGTGTGCTCTTTGTT
IL-6	forward	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA
	reverse	TCCACGATTTCCCAGAGAAC
Angptl2	forward	ATGACCTACTGGTGGCTTGG
	reverse	TGGGGCACAATGAAAGTGTA
CXCL5	forward	GAAAGCTAAGCGGAATGCAC
	reverse	GGGACAATGGTTTTCCCTTTT

10. RNA シーケンシング解析

MS-1 を播種すると同時に LNA miRNA inhibitor をトランスフェクションし、TGF- β 2 を 1 ng/ml で刺激した後に 72 時間してサンプルを回収した。Ribo-Zero Magnetic Kit (epicenter) を用いてリボソーマル RNA を除去したトータル RNA から、NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolab) 、KAPA HiFi DNA polymerase (NIPPON GENETICS) を用いてライブラリーを作成し、Illumina HiSeq2000 を用いて解析を実施した。Paired-end-reads は TopHat program (Version2.0.9.) (110) および UCSC mm9 GTF file を用いて mm9 assembly にマップした。FPKM のデータは Cufflinks (Version2.1.0.) (111) を用いて作成し、FPKM > 1 でフィルターをかけた後に解析を行った。遺伝子オンロジー解析は Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>) を用いて実施し、DAVID の機能関連付け分類によって類似した関連カテゴリーの抽出を行った (75,76)。ネットワーク解析、転写因子活性予測解析については、Fold change データについて、QIAGEN の Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN, www.qiagen.com/ingenuity) を用いて実施した。

11. 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法

3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法は、SMARTer RACE cDNA

Amplification Kit (TakaraBio) を用いて実施した。表 2 に示すプライマーを用いて増幅した PCR 産物を TOPO TA cloning kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて TOPO TA ベクターにクローニングした。クローニング後、ベクターに挿入されたシーケンスを検証し、cDNA の 3' 端の配列を決定した。

12. 統計処理

qRT-PCR およびルシフェラーゼレポーターアッセイについて、統計的な有意差は Student's t test により計算し、 $P < 0.05$ を有意とみなした。RNA シーケンシングの解析において、miRNA 標的遺伝子の発現変動については、Kolmogorov-Smirnov test を実施した。

第五章 引用文献

1. Barrero, M. J., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J. C. (2010) Epigenetic mechanisms that regulate cell identity. *Cell Stem Cell* **7**, 565-570
2. Ribeiro, A. O., Schoof, C. R., Izzotti, A., Pereira, L. V., and Vasques, L. R. (2014) MicroRNAs: modulators of cell identity, and their applications in tissue engineering. *MicroRNA* **3**, 45-53
3. Magistri, M., Faghihi, M. A., St Laurent, G., 3rd, and Wahlestedt, C. (2012) Regulation of chromatin structure by long noncoding RNAs: focus on natural antisense transcripts. *Trends Genet* **28**, 389-396
4. Jangi, M. and Sharp, P. A. (2014) Building robust transcriptomes with master splicing factors. *Cell* **159**, 487-498
5. Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233
6. Siomi, H. and Siomi, M. C. (2010) Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell* **38**, 323-332
7. Suzuki, H. I. and Miyazono, K. (2010) Dynamics of microRNA biogenesis: crosstalk between p53 network and microRNA processing pathway. *J Mol Med (Berl)* **88**, 1085-1094
8. Suzuki, H. I. and Miyazono, K. (2011) Emerging complexity of microRNA generation cascades. *J Biochem* **149**, 15-25
9. Ha, M. and Kim, V. N. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 509-524
10. Wienholds, E. and Plasterk, R. H. (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* **579**, 5911-5922

11. Cordes, K. R., Sheehy, N. T., White, M. P., Berry, E. C., Morton, S. U., Muth, A. N., Lee, T. H., Miano, J. M., Ivey, K. N., and Srivastava, D. (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* **460**, 705-710
12. Thiery, J. P. and Sleeman, J. P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 131-142
13. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-890
14. Ye, X. and Weinberg, R. A. (2015) Epithelial-mesenchymal plasticity: A central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol* **25**, 675-686
15. Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R. F., Vahdat, L. T., Altorki, N. K., Mittal, V., and Gao, D. (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* **527**, 472-476
16. Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C. C., LeBleu, V. S., and Kalluri, R. (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* **527**, 525-530
17. Gonzalez, D. M. and Medici D. (2014) Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* **7**, re8
18. Moustakas, A. and Heldin, C. H. (2009) The regulation of TGF β signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714
19. Derynck, R. and Zhang, Y. E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* **425**, 577-584
20. Miyazono, K., Kamiya, Y., and Morikawa, M. (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* **147**, 35-51

21. Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003) Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* **116**, 1959-1967
22. Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2**, 76-83
23. Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**, 84-89
24. Shirakihara, T., Saitoh, M., and Miyazono, K. (2007) Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by δ EF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF- β . *Mol Biol Cell* **18**, 3533-3544
25. Bindels, S., Mestdagt, M., Vandewalle, C., Jacobs, N., Volders, L., Noel, A., van Roy, F., Berx, G., Foidart, J. M., and Gilles, C. (2006) Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* **25**, 4975-4985
26. Pipes, G. C., Creemers, E. E., and Olson, E. N. (2006) The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev* **20**, 1545-1556
27. Du, K. L., Chen, M., Li, J., Lepore, J. J., Mericko, P., and Parmacek, M. S. (2004) Megakaryoblastic leukemia factor-1 transduces cytoskeletal signals and induces smooth muscle cell differentiation from undifferentiated embryonic stem cells. *J Biol Chem* **279**, 17578-17586
28. Nicoloso, M. S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G. A. (2009) MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* **9**, 293-302
29. Gregory, P. A., Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M. A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G. J. (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1

and SIP1. *Nat Cell Biol* **10**, 593-601

30. Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J. J., Coppola, D., Dalton, W. S., and Cheng, J. Q. (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor β /Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* **28**, 6773-6784
31. Wang, B., Li, W., Liu, H., Yang, L., Liao, Q., Cui, S., Wang, H., and Zhao, L. (2014) miR-29b suppresses tumor growth and metastasis in colorectal cancer via downregulating Tiam1 expression and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *Cell Death Dis* **5**, e1335
32. Gustafsson, E., Brakebusch, C., Hietanen, K., and Fassler, R. (2001) Tie-1-directed expression of Cre recombinase in endothelial cells of embryoid bodies and transgenic mice. *J Cell Sci* **114**, 671-676
33. Armstrong, E. J. and Bischoff, J. (2004) Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res* **95**, 459-470
34. Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L. H., and Moore, M. W. (1997) ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Development* **124**, 4999-5011
35. Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A., Jr., Kubalak, S., Klewer, S. E., and McDonald, J. A. (2000) Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* **106**, 349-360
36. Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M., and Mekada, E. (2003) Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3221-3226
37. Jackson, L. F., Qiu, T. H., Sunnarborg, S. W., Chang, A., Zhang, C., Patterson, C.,

- and Lee, D. C. (2003) Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J* **22**, 2704-2716
38. Cooley, B. C., Nevado, J., Mellad, J., Yang, D., St Hilaire, C., Negro, A., Fang, F., Chen, G., San, H., Walts, A. D., Schwartzbeck, R. L., Taylor, B., Lanzer, J. D., Wragg, A., Elagha, A., Beltran, L. E., Berry, C., Feil, R., Virmani, R., Ladich, E., Kovacic, J. C., and Boehm, M. (2014) TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci Transl Med* **6**, 227ra234
 39. Hashimoto, N., Phan, S. H., Imaizumi, K., Matsuo, M., Nakashima, H., Kawabe, T., Shimokata, K., and Hasegawa, Y. (2010) Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **43**, 161-172
 40. Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W. T., Roberts, A. B., Neilson, E. G., Sayegh, M. H., Izumo, S., and Kalluri, R. (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* **13**, 952-961
 41. LeBleu, V. S., Taduri, G., O'Connell, J., Teng, Y., Cooke, V. G., Woda, C., Sugimoto, H., and Kalluri, R. (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* **19**, 1047-1053
 42. Maddaluno, L., Rudini, N., Cuttano, R., Bravi, L., Giampietro, C., Corada, M., Ferrarini, L., Orsenigo, F., Papa, E., Boulday, G., Tournier-Lasserre, E., Chapon, F., Richichi, C., Retta, S. F., Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (2013) EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature* **498**, 492-496
 43. Medici, D., Shore E. M., Lounev V. Y., Kaplan F. S., Kalluri R., and Olsen B. R. (2010) Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cell. *Nat Med* **16**, 1400-1406
 44. Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007) Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for

carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* **67**, 10123-10128

45. Potenta, S., Zeisberg, E., and Kalluri, R. (2008) The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* **99**, 1375-1379
46. Krenning, G., Moonen, J. R., van Luyn, M. J., and Harmsen, M. C. (2008) Vascular smooth muscle cells for use in vascular tissue engineering obtained by endothelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EnMT) on collagen matrices. *Biomaterials* **29**, 3703-3711
47. Medici, D., Potenta, S., and Kalluri, R. (2011) Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J* **437**, 515-520
48. Arciniegas, E., Sutton, A. B., Allen, T. D., and Schor, A. M. (1992) Transforming growth factor β 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* **103** (Pt 2), 521-529
49. Deissler, H., Deissler, H., Lang, G. K., and Lang, G. E. (2006) TGF β induces transdifferentiation of iBREC to α SMA-expressing cells. *Int J Mol Med* **18**, 577-582
50. Paranya, G., Vineberg, S., Dvorin, E., Kaushal, S., Roth, S. J., Rabkin, E., Schoen, F. J., and Bischoff, J. (2001) Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor- β -mediated and non-transforming growth factor- β -mediated transdifferentiation in vitro. *Am J Pathol* **159**, 1335-1343
51. van Meeteren, L. A. and ten Dijke P. (2012) Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β . *Cell Tissue Res* **347**, 177-186
52. Mihira, H., Suzuki, H. I., Akatsu, Y., Yoshimatsu, Y., Igarashi, T., Miyazono, K., and Watabe, T. (2012) TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *J Biochem* **151**, 145-156

53. Lagendijk, A. K., Goumans, M. J., Burkhard, S. B., and Bakkers, J. (2011) MicroRNA-23 restricts cardiac valve formation by inhibiting Has2 and extracellular hyaluronic acid production. *Circ Res* **109**, 649-657
54. Ghosh, A. K., Nagpal, V., Covington, J. W., Michaels, M. A., and Vaughan, D. E. (2012) Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): differential expression of microRNAs during EndMT. *Cell Signal* **24**, 1031-1036
55. Kumarswamy, R., Volkmann, I., Jazbutyte, V., Dangwal, S., Park, D. H., and Thum, T. (2012) Transforming growth factor- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 361-369
56. Zhu, K., Pan, Q., Jia, L. Q., Dai, Z., Ke, A. W., Zeng, H. Y., Tang, Z. Y., Fan, J., and Zhou, J. (2014) MiR-302c inhibits tumor growth of hepatocellular carcinoma by suppressing the endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells. *Sci Rep* **4**, 5524
57. Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L., and Doetschman, T. (1997) TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* **124**, 2659-2670
58. Bartram, U., Molin, D. G., Wisse, L. J., Mohamad, A., Sanford, L. P., Doetschman, T., Speer, C. P., Poelmann, R. E., and Gittenberger-de Groot, A. C. (2001) Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF- β 2-knockout mice. *Circulation* **103**, 2745-2752
59. Azhar, M., Brown, K., Gard, C., Chen, H., Rajan, S., Elliott, D. A., Stevens, M. V., Camenisch, T. D., Conway, S. J., and Doetschman, T. (2011) Transforming growth factor β 2 is required for valve remodeling during heart development. *Dev Dyn* **240**, 2127-2141
60. Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., and Johnson, J. M. (2005) Microarray analysis shows

that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769-773

61. Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., and Bartel, D. P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835-840
62. Cheng, C., and Li, L. M. (2008) Inferring microRNA activities by combining gene expression with microRNA target prediction. *PLoS One* **3**, e1989
63. Gennarino, V. A., D'Angelo, G., Dharmalingam, G., Fernandez, S., Russolillo, G., Sanges, R., Mutarelli, M., Belcastro, V., Ballabio, A., Verde, P., Sardiello, M., and Banfi, S. (2012) Identification of microRNA-regulated gene networks by expression analysis of target genes. *Genome Res* **22**, 1163-1172
64. Suzuki, H. I., Mihira, H., Watabe, T., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2013) Widespread inference of weighted microRNA-mediated gene regulation in cancer transcriptome analysis. *Nucleic Acids Res* **41**, e62
65. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550
66. Ulitsky, I., Laurent, L. C., and Shamir, R. (2010) Towards computational prediction of microRNA function and activity. *Nucleic Acids Res* **38**, e160
67. Suzuki, H. I., Matsuyama, H., Noguchi, M., Yao, T., Komatsu, N., Mano, H., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2013) Computational dissection of distinct microRNA activity signatures associated with peripheral T cell lymphoma subtypes. *Leukemia* **27**, 2107-2111
68. Haraguchi, T., Ozaki, Y., and Iba, H. (2009) Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **37**, e43

69. Matsuyama, H., Suzuki, H. I., Nishimori, H., Noguchi, M., Yao, T., Komatsu, N., Mano, H., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2011) miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **118**, 6881-6892
70. Kardassis, D., Murphy, C., Fotsis, T., Moustakas, A., and Stournaras, C. (2009) Control of transforming growth factor β signal transduction by small GTPases. *FEBS J* **276**, 2947-2965
71. Kim, J. S., Kim, J. G., Moon, M. Y., Jeon, C. Y., Won, H. Y., Kim, H. J., Jeon, Y. J., Seo, J. Y., Kim, J. I., Kim, J., Lee, J. Y., Kim, P. H., and Park, J. B. (2006) Transforming growth factor- β 1 regulates macrophage migration via RhoA. *Blood* **108**, 1821-1829
72. Papadimitriou, E., Kardassis, D., Moustakas, A., and Stournaras, C. (2011) TGF β -induced early activation of the small GTPase RhoA is Smad2/3-independent and involves Src and the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell Physiol Biochem* **28**, 229-238
73. Morita, T., Mayanagi, T., and Sobue, K. (2007) Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol* **179**, 1027-1042
74. Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., and Bartel, D. P. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**, 91-105
75. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**, 1-13
76. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44-57
77. Moustakas, A. and Heldin, C. H. (2008) Dynamic control of TGF- β signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett* **582**, 2051-2065

78. Schmidt, A., and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-1609
79. Bustelo, X. R. (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **20**, 1461-1477
80. Carvajal-Gonzalez, J. M., Mulero-Navarro, S., Roman, A. C., Sauzeau, V., Merino, J. M., Bustelo, X. R., and Fernandez-Salguero, P. M. (2009) The dioxin receptor regulates the constitutive expression of the vav3 proto-oncogene and modulates cell shape and adhesion. *Mol Biol Cell* **20**, 1715-1727
81. Laurila, E. M. and Kallioniemi, A. (2013) The diverse role of miR-31 in regulating cancer associated phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer* **52**, 1103-1113
82. Mizoguchi, F., Murakami, Y., Saito, T., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. (2013) miR-31 controls osteoclast formation and bone resorption by targeting RhoA. *Arthritis Res Ther* **15**, R102
83. Gingery, A., Bradley, E. W., Pederson, L., Ruan, M., Horwood, N. J., and Oursler, M. J. (2008) TGF- β coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NF κ B and SMAD pathways to promote osteoclast survival. *Exp Cell Res* **314**, 2725-2738
84. Yagi, K., Furuhashi, M., Aoki, H., Goto, D., Kuwano, H., Sugamura, K., Miyazono, K., and Kato, M. (2002) c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *J Biol Chem* **277**, 854-861
85. Xu, N., Meisgen, F., Butler, L. M., Han, G., Wang, X. J., Soderberg-Naucleer, C., Stahle, M., Pivarcsi, A., and Sonkoly, E. (2013) MicroRNA-31 is overexpressed in psoriasis and modulates inflammatory cytokine and chemokine production in keratinocytes via targeting serine/threonine kinase 40. *J Immunol* **190**, 678-688
86. Li, T., Luo, W., Liu, K., Lv, X., and Xi, T. (2015) miR-31 promotes proliferation of colon cancer cells by targeting E2F2. *Biotechnol Lett* **37**, 523-532
87. Vasilaki, E., Papadimitriou, E., Tajadura, V., Ridley, A. J., Stournaras, C., and Kardassis, D. (2010) Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene

by TGF β -induced signaling pathways. *FASEB J* **24**, 891-905

88. Huang, J., Teng, L., Liu, T., Li, L., Chen, D., Li, F., Xu, L. G., Zhai, Z., and Shu, H. B. (2003) Identification of a novel serine/threonine kinase that inhibits TNF-induced NF- κ B activation and p53-induced transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 774-778
89. Elkon, R., Ugalde, A. P., and Agami, R. (2013) Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* **14**, 496-506
90. Nam, J. W., Rissland, O. S., Koppstein, D., Abreu-Goodger, C., Jan, C. H., Agarwal, V., Yildirim, M. A., Rodriguez, A., and Bartel, D. P. (2014) Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. *Mol Cell* **53**, 1031-1043
91. Suarez, Y., Wang, C., Manes, T. D., and Pober, J. S. (2010) Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J Immunol* **184**, 21-25
92. Pedrioli, D. M., Karpanen, T., Dabouras, V., Jurisic, G., van de Hoek, G., Shin, J. W., Marino, D., Kalin, R. E., Leidel, S., Cinelli, P., Schulte-Merker, S., Brandli, A. W., and Detmar, M. (2010) miR-31 functions as a negative regulator of lymphatic vascular lineage-specific differentiation in vitro and vascular development in vivo. *Mol Cell Biol* **30**, 3620-3634
93. Wang, J., Yan, C. H., Li, Y., Xu, K., Tian, X. X., Peng, C. F., Tao, J., Sun, M. Y., and Han, Y. L. (2013) MicroRNA-31 controls phenotypic modulation of human vascular smooth muscle cells by regulating its target gene cellular repressor of E1A-stimulated genes. *Exp Cell Res* **319**, 1165-1175
94. Weber, C., Meiler, S., Doring, Y., Koch, M., Drechsler, M., Megens, R. T., Rowinska, Z., Bidzhekov, K., Fecher, C., Ribechini, E., van Zandvoort, M. A., Binder, C. J., Jelinek, I., Hristov, M., Boon, L., Jung, S., Korn, T., Lutz, M. B., Forster, I., Zenke, M., Hieronymus, T., Junt, T., and Zernecke, A. (2011) CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice. *J Clin Invest* **121**, 2898-2910

95. Mishalian, I., Bayuh, R., Eruslanov, E., Michaeli, J., Levy, L., Zolotarov, L., Singhal, S., Albelda, S. M., Granot, Z., and Fridlender, Z. G. (2014) Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17--a new mechanism of impaired antitumor immunity. *Int J Cancer* **135**, 1178-1186
96. Borsig, L., Wolf, M. J., Roblek, M., Lorentzen, A., and Heikenwalder, M. (2014) Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory. *Oncogene* **33**, 3217-3224
97. Kadomatsu, T., Endo, M., Miyata, K., and Oike, Y. (2014) Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. *Trends Endocrinol Metab* **25**, 245-254
98. Xu, X., Huang, P., Yang, B., Wang, X., and Xia, J. (2014) Roles of CXCL5 on migration and invasion of liver cancer cells. *J Transl Med* **12**, 193
99. Yan, S., Xu, Z., Lou, F., Zhang, L., Ke, F., Bai, J., Liu, Z., Liu, J., Wang, H., Zhu, H., Sun, Y., Cai, W., Gao, Y., Su, B., Li, Q., Yang, X., Yu, J., Lai, Y., Yu, X. Z., Zheng, Y., Shen, N., Chin, Y. E., and Wang, H. (2015) NF- κ B-induced microRNA-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis. *Nat Commun* **6**, 7652
100. Zhang, L., Ke, F., Liu, Z., Bai, J., Liu, J., Yan, S., Xu, Z., Lou, F., Wang, H., Zhu, H., Sun, Y., Cai, W., Gao, Y., Li, Q., Yu, X. Z., Qian, Y., Hua, Z., Deng, J., Li, Q. J., and Wang, H. (2015) MicroRNA-31 negatively regulates peripherally derived regulatory T-cell generation by repressing retinoic acid-inducible protein 3. *Nat Commun* **6**, 7639
101. Erhard, F., Haas, J., Lieber, D., Malterer, G., Jaskiewicz, L., Zavolan, M., Dolken, L., and Zimmer, R. (2014) Widespread context dependency of microRNA-mediated regulation. *Genome Res* **24**, 906-919
102. Nam, D. K., Lee, S., Zhou, G., Cao, X., Wang, C., Clark, T., Chen, J., Rowley, J. D., and Wang, S. M. (2002) Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6152-6156

103. Wilczynska, A. and Bushell, M. (2015) The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ* **22**, 22-33
104. Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., and Pandolfi, P. P. (2011) A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* **146**, 353-358
105. Xiao, L., Kim, D. J., Davis, C. L., McCann, J. V., Dunleavey, J. M., Vanderlinden, A. K., Xu, N., Pattenden, S. G., Frye, S. V., Xu, X., Onaitis, M., Monaghan-Benson, E., Burridge, K., and Dudley, A. C. (2015) Tumor endothelial cells with distinct patterns of TGF β -driven endothelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* **75**, 1244-1254
106. Maleszewska, M., Moonen, J. R., Huijkman, N., van de Sluis, B., Krenning, G., and Harmsen, M. C. (2013) IL-1 β and TGF β 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF κ B-dependent manner. *Immunobiology* **218**, 443-454
107. Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009) Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* **460**, 529-533
108. Suzuki, H. I., Arase, M., Matsuyama, H., Choi, Y. L., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2011) MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. *Mol Cell* **44**, 424-436
109. Suzuki, H. I., Katsura, A., Yasuda, T., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2015) Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 512-521
110. Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S. L. (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105-1111
111. Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L., and Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* **7**, 562-578

謝辞

分子病理学教室での研究を御了承して頂き、終始温かい御支援を下された東京大学大学院医学系研究科外科学専攻麻酔学講座の山田芳嗣教授に心から感謝の意を表します。

本研究を施行するにあたり、多大な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻分子病理学講座の宮園浩平教授に厚く御礼申し上げます。TGF- β ミーティング (スウェーデン) や生化学会など大変多くの場で研究発表の機会を下さり、日本を越えて世界の研究者と交流することができたのは、私の人生にとって貴重な経験となり、財産となりました。また本研究の遂行にあたり、細やかな実験指導および実験方針に対する的確なご助言を賜りました鈴木洋特任助教に心より御礼申し上げます。研究の考え方、立案・実験方法、多くのご助言ご指導を頂いた事はもちろん、発想の斬新さや研究本来の楽しさを教えて頂きました。日々の研究生活において多くのご支援を戴き、有意義なものにしてくださった分子病理学の皆様にも心より感謝いたします。