

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 桂 彰宏

TGF- β (transforming growth factor- β) は心臓の発生や臓器線維症などの病態で重要な役割を担う内皮間葉移行 (endothelial-to-mesenchymal transition: EndMT) において中心的な機能をもつ。本研究では microRNA-31 (miR-31) は TGF- β によって誘導される EndMT を正に調節することを報告する。

EndMT では、血管内皮細胞はお互いの細胞間接着を消失し細胞骨格の形態変化をおこし運動性が亢進する。EndMT における TGF- β シグナルの役割を調べるために、マウスの脾臓由来血管内皮細胞である MS-1 細胞と TGF- β 2 を用いた。TGF- β は構造が類似した TGF- β 1、 β 2、 β 3 の 3 種類のアイソフォームからなるが、EndMT が寄与する胎生期の心内膜床形成において TGF- β 2 の関与が報告されており、*in vitro* での EndMT 研究でも主に TGF- β 2 が用いられていることから本研究でも TGF- β 2 を使用した。

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への影響を検討するため TGF- β 刺激の有無でマイクロアレイを行った。解析結果から TGF- β 刺激後 72 時間では Mkl1 (MRTF-A)、Arhgef5 や Arhgef18 など EndMT の誘導に関与している遺伝子の発現が誘導され、引き続きように Acta2 (α -SMA) や Tagln (SM22 α) といった間葉系マーカーの発現を誘導した。さらに TGF- β は Kdr (VEGFR2)、CD34、Cdh5 (VE-cadherin) などの血管内皮マーカーを低下させた。

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する microRNA を探索するため、トランスクリプトーム解析を行った。TGF- β で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。

次に EndMT に関与する miRNA を同定するため miRNA Decoy RNA システムを用いて、EndMT で活性が強まると考えられた microRNA の機能を特異的に弱め、EndMT マーカーである α -SMA への影響を検討した。RT-PCR の結果から miR-31 の機能を弱めると MS-1 細胞で TGF- β により誘導される α -SMA の上昇が抑制された。しかし MS-1 細胞で TGF- β により miR-31 の発現を検討したところ、内在性の活性が高いためか TGF- β による miR-31 の発現は誘導されなかった。

miR-31 に対する阻害剤として Locked Nucleic Acid microRNA-31 inhibitor (LNA-miR-31) を用いた。LNA-miR-31 を用いて miR-31 の機能を抑制すると α -SMA や SM22 α といった間葉系マーカーの発現が著明に低下した。その一方で TGF- β によって誘導された Smad7 や Fibronectin などは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

と比較して弱かった。TGF- β によって抑制される VEGFR2 や CD34 などは LNA-miR-31 で変化しなかった。

今度は 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。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 の発現を促進した。また Smad7、Fibronectin 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。

これまでに TGF- β は RhoA や MRTF-A の活性を上昇させ、TGF- β による α -SMA の発現上昇を誘導することに必要であることを MS-1 細胞で示した。そこで 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。MRTF-A によって活性化される α -SMA プロモーターのレポーターアッセイを行ったところ、TGF- β は MRTF-A の α -SMA プロモーターに対する活性を促進したがその効果は miR-31 の活性を低下させることで抑制された。

さらに MS-1 細胞で miR-31 の活性を低下させると 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。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。これらの結果から miR-31 はアクチンの再構築と MRTF-A の活性化を介して間葉系マーカーを調節することが示唆された。

一般的に哺乳類の miRNA は優先的かつ全般的に標的遺伝子の mRNA を減少させてタンパク質としての出力を減らすと考えられている。miR-31 の標的遺伝子を同定するため LNA-miR-31 と TGF- β で処理した MS-1 細胞を用いた RNA シーケンシングを行った。ネットワーク結合解析から miR-31 の標的遺伝子はアクチン骨格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た。中でも miR-31 の標的として Rac1 に対するグアニンヌクレオチド交換因子である VAV3 に着目した。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。Target scan で VAV3 の 3'UTR と miR-31 の対応する箇所を推定し、通常の 3'UTR と変異を入れたレポータープラスミドを作成した。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 のターゲット部位に結合し標的遺伝子として妥当であった。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、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。

さらに RNA シーケンシングの結果から TGF- β は CCL17 (Chemokine (C-C motif) ligand 17)、CX3CL1 (Fractalkine)、CXCL16、CXCL5、IL-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 は α -SMA の発現抑制とともにそれらの誘導も抑制した。パスウェイ解析ソフトでも 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特異的に必要であることが示唆され、このような特徴的な分泌現象を EndMT-SP と名付けた。

その分子機序として NF κ B シグナルを負に調節する Stk40 の発現を TGF- β 依存的に miR-31 が抑制することを同定した。これまででは miR-31 による Stk40 の抑制がケラチノサイトで炎症性

サイトカインやケモカインの発現が重要であることが報告されている。miR-31 は VAV3 のように定常状態の発現レベルを変化させるだけでなく、Stk40 のように TGF- β による反応性も調節しているようであった。RNA シーケンシングをさらに解析し TGF- β 刺激によって Stk40 の 3'UTR の長さが明らかに短くなっていた。3'UTR 末端の cDNA を増幅し、3'UTR の短い Stk40 の末端配列を同定した。これら短い 3'UTR のアイソフォームは AAGAAA という非標準的なポリアデニル化シグナル配列を伴っており、Stk40 の 3'UTR が短くなることは TGF- β による代替ポリアデニル化であることが推察された。RT-PCR の結果からも TGF- β によって Stk40 の 3'UTR が長いアイソフォームが減少した。3'UTR が短くなると miR-31 の標的としての効率に変化するかをレポーターアッセイで検討した。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 から内部のポリ A サイトを除いたアイソフォームでもその抑制効果が強まった。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かった。

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、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確認した。

さらに 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 TNF- α が促進したが、LNA-miR-31 によって TGF- β と TNF- α の α -SMA に対する相乗的な発現上昇が全般的に抑制された。miR-31 の活性低下によって CCL17、CX3CL1、CXCL16 などケモカインに対する TNF- α による追加の発現上昇も抑制された。以上から miR-31 の誘導を介して TNF- α は 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。

以上をまとめると、miR-31 は EndMT を統合する中心的な分子拠点として多様な役割を果たすことを示した。従来は EndMT において発現が誘導される microRNA が注目されていた。本研究で用いた血管内皮細胞では TGF- β は miR-31 を誘導しなかったが、mRNA 側の構造を変化させることで恒常的に発現する microRNA に対する感受性に変化を及ぼし EndMT の表現型に大きく寄与することが明らかになった。