

本研究は心臓の発生、各臓器の線維化やがんの進展に重要であると考えられている内皮間葉移行における TGF- β シグナルと microRNA の役割を調べるために、マウスの臍臓由来血管内皮細胞である MS-1 細胞と TGF- β 2 を用いて解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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-31 を同定した。TGF- β による miR-31 の発現は誘導されないが、miR-31 の機能を弱めると EndMT の指標としての α SMA の発現が低下し、miR-31 の機能を強めると上昇することを示した。

2. 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とから 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を示した。

3. miR-31 の標的遺伝子として Rac1 に対するグアニンヌクレオチド交換因子である VAV3 であることを示した。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ることを示した。

4. さらに RNA シーケンシングから 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することを示した。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 と新たに定義した。

5. EndMT-SP 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。TGF- β 刺激での代替ポリアデニル化によって Stk40 の 3'UTR の長さが明らかに短くなることを見出した。3'UTR が短くなると miR-31 の標的としての効率が変化するかをレポーターアッセイで検討し、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ることを示した。

5. TGF- β と TNF- α のクロストークについて検討し、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 が促進することを示した。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 を促進することを示した。

以上、本論文は 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 の表現型に寄与することが明らかになり、EndMT のメカニズム解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。