

博士論文

miRNAによる線維芽細胞の活性化・線維化誘導遺伝子発現制御の解明

相馬 邦彦

miRNAによる線維芽細胞の活性化・線維化誘導遺伝子  
発現制御の解明

相馬 邦彦

## 目次

要旨 .....	4
略語一覽 .....	5
第一章 序文 .....	7
第二章 方法 .....	24
第三章 結果 .....	48
第四章 考察 .....	73
引用文献 .....	80
謝辞 .....	96

## 要旨

線維芽細胞は細胞外基質を産生し、肺線維症で大きな役割を果たしている。

miRNAは多くの遺伝子を制御し、多疾患に関与するが、肺線維症における肺線維芽細胞での役割は明らかでない。

本研究では、ブレオマイシンとシリカ誘導肺線維症マウスの肺線維芽細胞の中で変動したmiRNAを、網羅的解析により複数同定した。同定されたmiRNAを、線維芽細胞に過剰発現させ、*in vitro*と経気道的肺移植モデルで活性化を評価した。結果の一つとしてmiR-20aの発現量が増加しており、*in vitro*と経気道的移植モデルで、*Acta2*, *Colla2*の発現を抑制し、*TGF-βR2*をtargetとしていた。一方、他の活性化マーカーの*Spp1*や*Mmp3*は逆に増加していた。

以上から、miR-20aが線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を抑え、コラーゲンなどの細胞外器質の産生を低下させることが示唆された。

## 略語一覧

APC	Allophycocyanin
$\alpha$ -SMA	Alpha-smooth muscle actin( <i>Acta2</i> )
BLM	ブレオマイシン(bleomycin)
Col1	Type I collagen
Col-GFP	I型コラーゲンのGFPレポーターマウス
ECM	細胞外基質(extracellular matrix)
EMT	上皮間葉転移(epithelial-mesenchymal transition)
GFP	Green fluorescent protein
hluc+	ホタルルシフェラーゼ(firefly luciferase)
hRluc	ウミシイタケルシフェラーゼ(renilla luciferase)
IPF	特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis)
IT- transfer	経気道的投与による移植(intratracheal transfer)
KO	クサビラオレンジ(kusabira orange)
mRNA	メッセンジャーRNA (messenger RNA)
MFI	Mean fluorescence intensity
miRNA	マイクロRNA(micro RNA, miR)
MMP	マトリックスメタロプロテイナーゼ(matrix metalloproteinase)

PCR	ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction)
PDGF	血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor)
PE	Phycoerythrin
SAGE	Serial analysis of gene expression
SiO <sub>2</sub>	シリカ、二酸化ケイ素(silicon dioxide)
siRNA	低分子干渉RNA(short-interfering RNA)
shRNA	短ヘアピンRNA(short-hairpin RNA)
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta

# 第一章 序文

## 肺線維症の社会的背景と治療

IPF(idiopathic pulmonary fibrosis: 特発性肺線維症)は、特発性間質性肺炎の典型的なタイプで、特発性間質性肺炎の50%から60%を占める。IPFは慢性的に病態が進行する、不可逆性の疾患である[1-4]。IPFの平均診断年齢は66歳で、55歳から75歳の間の患者が多い。IPFの予後は不良であり、診断後の平均生存期間は2.5~3.5年である。罹患率は年々増加しており、全世界において、10万人あたり4.6~16.3人であり、有病率は10万人あたり13~20人程度である。1.5~1.7倍程度男性の方が女性よりも発症しやすい。危険因子としては、喫煙や、金属・木材の粉塵の曝露などが知られている[2]。

IPFの原因について、遺伝的伝達が0.5~3.7%程度存在していると言われていたが、最も発現に影響を与える常染色体優性遺伝は継承されるたびに浸透度が低下していくことを考慮すると、家族性の症例は見逃されやすいと考えられるため、実際はもっと高いのではないかと考えられている[2]。

一例として、細気管支の上皮細胞に発現するムチンの一種であるMUC5B遺伝子上流のプロモーター領域の稀な対立遺伝子(rs35705950)の発現が、特発性肺線維症の患者の38%、家族性の肺線維症の患者の34%にみられ、control群の9%と

比較して有意に高いことが報告されている[5]。しかしながら、IPFの根本的な発症要因については未だ不明であり、その原因の究明が望まれている。

IPFを含む肺線維症の治療法として、薬剤治療・肺移植・幹細胞治療などが報告・研究されている。

薬剤治療としては、N-アセチルシステインをステロイドやアザチオプリンと併用する方法やピルフェニドンやニンテダニブを使用する方法がある。N-アセチルシステインは、ステロイドやアザチオプリンと併用し12ヶ月間後に、IPF患者の努力性肺活量や一酸化炭素肺拡散能力の低下を抑えたが[6]、生存率には影響を与えず、大きな臨床的効果を認めてはいない[2]。また、N-アセチルシステイン単独では治療効果を認めない一方、併用療法によって死亡率や入院加療になるリスクが増加したという報告もある[7]。ピルフェニドンは、肺活量の低下を抑え、52週間にわたって無増悪生存期間を増加させ[8]、現在保険適応薬となっているが、大きな治療効果は期待できず、根本的な治療には至っていない。

また、ニンテダニブは vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)、 fibroblast growth factor receptor (FGFR)、 platelet-derived growth factor receptor(PDGFR)を阻害するチロシンキナーゼ阻害薬であり、日本では2015年7月に保険適応された。投与により努力性肺活量の低下を抑制するが、死亡率の改善は認めなかったと報告されている[9]。



肺移植は、進行性のIPF患者の生存率を高める唯一の治療と考えられており、5年生存率は44%程度である[10]。しかし、拒絶反応や易感染性などの重大な副作用が見られる。

幹細胞治療は、組織の修復過程の異常を修正することを目的としている。ブレオマイシン誘導モデルマウスに間葉系幹細胞を移植すると、移植した細胞からⅡ型肺胞上皮細胞が形成され、肺のコラーゲン沈着が減少することが報告されている[11]。ブレオマイシン誘導モデルマウスにProminin-1/CD133陽性の上皮系幹細胞を移植すると、その細胞からⅡ型肺胞上皮細胞が形成されるとともに、炎症細胞の増加を抑え、コラーゲンなどの線維化関連遺伝子の発現が減少することも報告されている[12]。その他にも、ES細胞をⅡ型肺胞上皮細胞に分化させ、ブレオマイシン誘導急性肺障害モデルに移植する系においては、傷害肺内におけるⅠ型肺胞上皮細胞の形成に分化する細胞もみられ、体重減少や血中酸素飽和度の低下を抑え、生存率の改善が認められることが報告されている[13]。しかし、これらはすべてマウスモデルにおける報告であり、薬物治療や肺移植と異なり臨床応用には至っていない。

以上から、現時点ではIPFの根本的な治療法はなく、新たな治療法の開発が求められている状況だと言える。

## 肺線維症の病因・病態

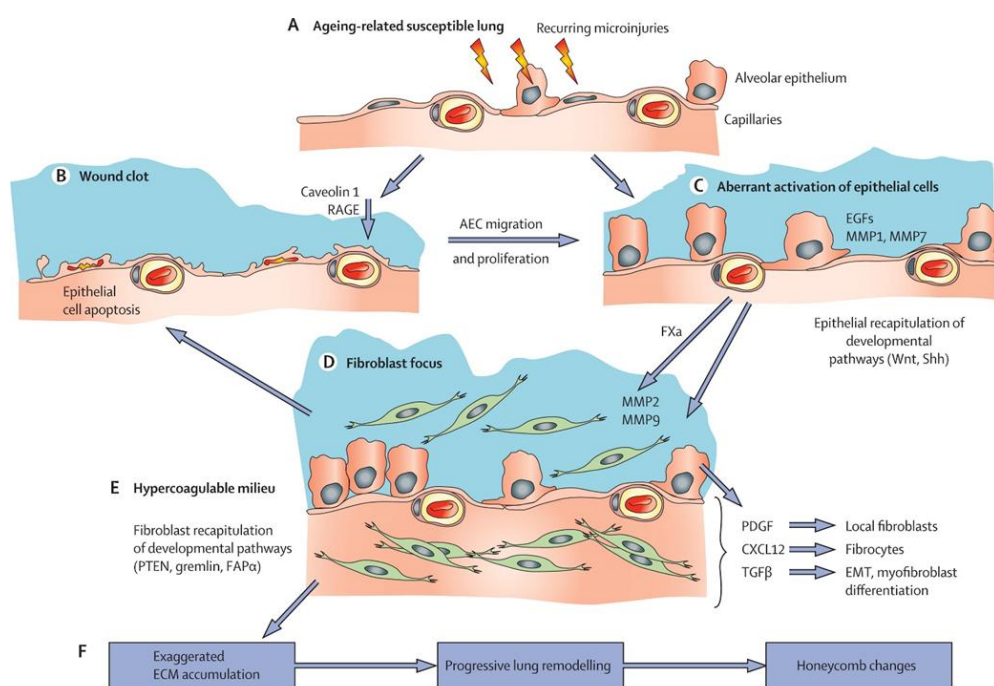
IPFの病因は解明されてはいないが、線維化は、組織リモデリングや修復過程の異常であることから、反復的な肺の傷害などに際して活性化した線維芽細胞がコラーゲンを代表とするextracellular matrix (ECM)を大量に産生し、これが肺に過剰に蓄積した結果だと考えられている[2,3,18]。

具体的には、加齢に伴って刺激に反応しやすくなった肺胞上皮細胞に、喫煙やウイルスや誤嚥などによる小さな傷害が反復的に起こることによって、肺胞上皮がアポトーシスを起こす[14,15]。それによって血管透過性の亢進が起こり、wound clot (血餅)が生じる。wound clotは、暫定的なマトリックスと考えられており、フィブロネクチンやフィブリンで形成され、凝固系が亢進した結果生じる。また、反復的な刺激は肺胞上皮細胞のアポトーシスだけでなく、上皮の過形成を誘導することもあり、過形成した組織の上皮細胞は異常に活性化している。wound clotや活性化した肺胞上皮細胞から、サイトカインなどが放出され、線維芽細胞が活性化される[14,15]。

線維芽細胞はTGF- $\beta$ などのサイトカイン、PDGF(platelet-derived growth factor: 血小板由来増殖因子)などの成長因子や、メカニカルストレスなどによって活性化され、 *$\alpha$ -smooth muscle actin(Acta2)*を発現する筋線維芽細胞に分化する。筋線維芽細胞は、コラーゲンなどの様々なECMを産生する。一方、線維芽細胞が産

生するMMP2(matrix metalloproteinase 2)やMMP7などのマトリックスメタロプロ  
 テイナーゼは基底膜を破壊し、さらにアンギオテンシノーゲンやH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>なども産  
 生し、それらが肺胞上皮のアポトーシスを誘導する。以上のように、筋線維芽  
 細胞は線維化に伴う肺の構造破壊に中心的な役割を果たす[16,17,19-21]。

よって、肺線維芽細胞の活性化を抑えることが、肺の線維化の抑制の有効な1  
 つのアプローチであると考えられている。



King TE Jr, Pardo A, Selman M: Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 378:1949-1961;2011より引用

図1 肺線維症の病因・病態

反復的な肺の傷害によって生じたwound clotや活性化した肺胞上皮細胞からサイトカインなどが放出され、線維芽細胞が活性化される

## 筋線維芽細胞の起源

肺線維症の病態解明において、筋線維芽細胞のメカニズムを明らかにすることが重要と考えられるが、その起源およびその寄与の程度については諸説あり、定常状態から肺に存在する肺常在線維芽細胞、骨髄から産生された血液中を循環しているfibrocyte(線維細胞)、epithelial-mesenchymal transition(EMT)を通した肺胞上皮細胞、あるいは周皮細胞(pericyte)ではないかと考えられている[22]。

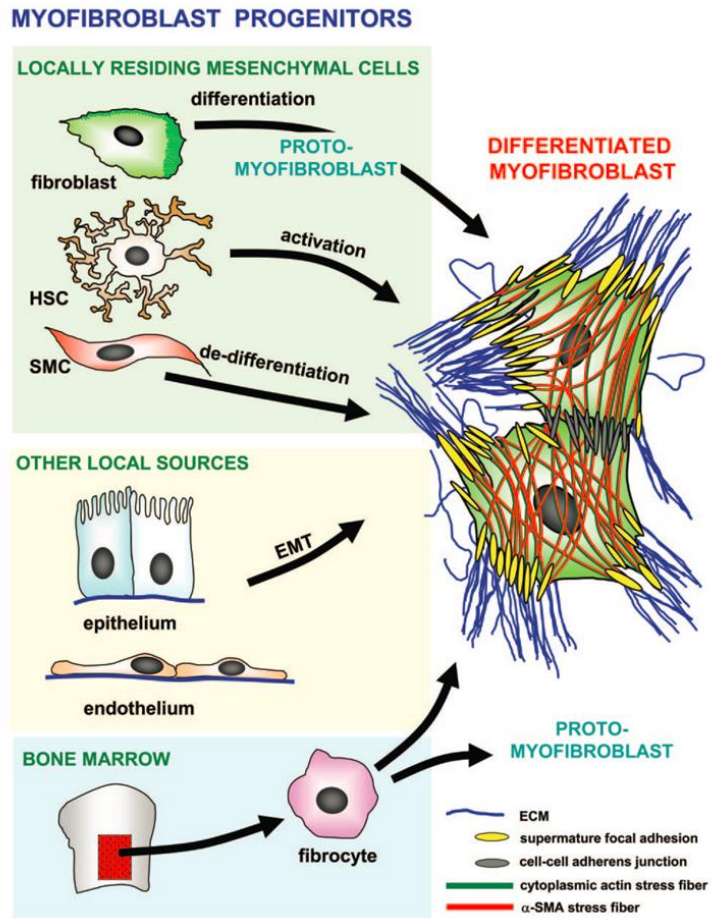
しかし、GFP トランスジェニックマウスの骨髄を野生型のC57BL/6に移植してキメラマウスを作成し、ブレオマイシンを投与すると、肺組織でGFP陽性でI型コラーゲンを発現する細胞は多く検出されたが*Acta2*を発現しておらず、*in vitro*においてもTGF- $\beta$ 1によって筋線維芽細胞へ分化されなかった[23]。また*Acta2*プロモーターでGFPが発現するマウスの骨髄を野生型マウスに移植しても、そのキメラマウスではGFP陽性細胞が検出される臓器は骨髄などに限られていた[24]。筋線維芽細胞がfibrocyteに由来する可能性は低いと考えられている。

肺胞上皮細胞のEMTに関しては、IPF患者の肺胞上皮細胞で上皮系マーカーのTTF-1やpro-SP-Bと、間葉系マーカーである*Acta2*の両方を発現していたという報告がある[25]。また、ラットの初代培養肺胞上皮細胞やcell lineのRLE-6TN細胞をTGF- $\beta$ 1で刺激することにより、線維芽細胞様の形態を呈するようになり、また*Acta2*などの間葉系マーカーの発現が増加、TTF-1などの上皮系マーカーが減少

することが報告されている[25]。しかし、II型肺胞上皮細胞のマーカである *Sftpc* と細気管支上皮細胞のマーカである *Scgb1a1* 発現細胞が、ブレオマイシンモデルにおいて、間質に移動しないこと、 $\alpha$ -SMAやS100a4等の活性化線維芽細胞マーカを発現しないことなどから、筋線維芽細胞の起源であることを否定する報告もある[26]。よって、肺胞上皮細胞が筋線維芽細胞の起源であることは議論の余地のあるところであり、さらなる研究が必要である。

*Foxd1* を発現する胚期の前駆細胞が肺の *pericyte* を形成し、肺線維症モデルにおいて、*Foxd1* を発現する *pericyte* が増殖し、線維芽細胞巢での *Acta2* や *Colla1* の発現を活性化させると報告されている[27]。しかし、NG2(neural/glial antigen 2)を発現する *pericyte* が、肺線維症モデルにおいて筋線維芽細胞の主要な起源ではないことが報告されている[28]。よって、*pericyte* が筋線維芽細胞の起源であることも、議論の余地のあるところである。

肺線維症において筋線維芽細胞の多くが内在する線維芽細胞由来と考えられている[22]。ブレオマイシン誘導肺線維症モデルに、肺線維症モデルではない同種のマウスから採取した肺線維芽細胞を経気道的投与すると、線維芽細胞巢が形成されたことから、筋線維芽細胞の起源は内在する線維芽細胞ではないかといった考え方もされている[29]。



Hinz B, et al: The myofibroblast: one function, multiple origins. Am J Pathol, 170:1807-1816;2007より引用

図2 筋線維芽細胞の起源

内在する線維芽細胞、fibrocyte、上皮細胞などが筋線維芽細胞の起源の候補として考えられている。

## miRNAの生合成と制御機能

miRNAは20~25ntまでのタンパク質へ翻訳されずに機能するRNA(non-coding RNA)の1種であり、相補的な配列を持つmRNAの3' 非翻訳領域(3'UTR)に結合することで、標的遺伝子の発現を抑制する機能を有し、様々な生物学的過程に関わっている[30,31]。

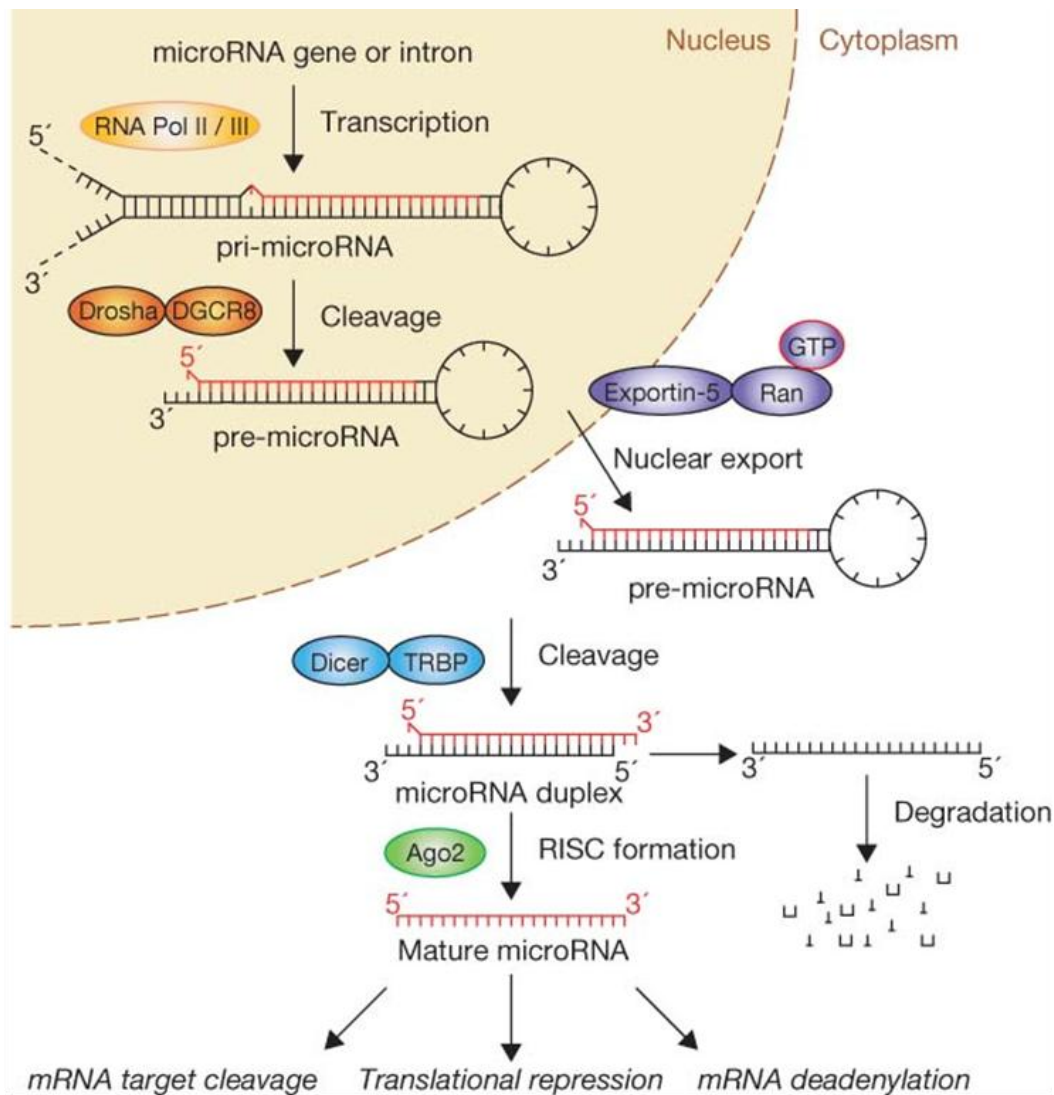
miRNAの生合成は、核内で開始される。RNAポリメラーゼIIによって転写され、pri-miRNAと呼ばれるヘアピンループ型の構造のRNA鎖を形成する。RNaseIII エンドヌクレアーゼであるDroshaと呼ばれる酵素によってpri-miRNAが切断され、約70 base pair(bp)のステムループ構造をもつpre-miRNAが作られる。

pre-miRNA は、細胞質に放出された後、Dicerと呼ばれる酵素によりスプライシングされ、20から25塩基長の2本鎖miRNAとなる。2本鎖miRNAはArgonauteを含むRISC(RNA誘導サイレンシング複合体)に認識され取込まれる。2本鎖miRNAはRISC中で解かれ、2つの1本鎖miRNA(mature miRNA)となる。RISCの一部としてmature miRNAは、target(標的)となるmRNAに結合することで、翻訳を抑制したり、あるいは脱アデニル化によりmRNAの分解を促進したりすることによりタンパク質発現を抑制する(図3)[32,33]。

ヒトの3'UTRには45000以上のmiRNAのtarget siteがあり、miRNAはヒトのタンパク質に翻訳される遺伝子の60%以上を標的としている[33]。

このように、miRNAは遺伝子発現制御に広範に関与し、生体調節に大きく関わっているという点で、生命現象において重要な分子群の一つであると言える。





Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S: Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*,11:228-234;2009.より引用

図3 miRNAの生合成と制御機能

核内で産生されたprecursor miRNAが細胞質に放出され、Dicerのスプライシングによって、2本鎖miRNAとなる。2本鎖miRNAはRISC中で解かれ、mature-miRNAとなる。mature miRNAは、targetとなるmRNAに結合することで、翻訳を抑制し、また脱アデニル化により分解を促進することによりタンパク質発現を抑制する。

## miRNAと疾患の関連

miRNAはがん、心血管疾患、神経変性疾患、炎症性疾患などの発症と進行に関わっていると考えられている[34-43]。

がんに関しては、miRNAはがん細胞の機能を調節すると考えられており、miRNAの発現パターンが、がんの種類、予後、治療への反応などに影響していると考えられている。また、血中を循環しているmiRNAをバイオマーカーへ応用する研究もされている[34]。Let-7 miRNAは、がんの抑制因子として知られており、すべてのがんにおいてその発現量が減少している[35]。肺がんでは、Let-7 miRNAはがん遺伝子である*RAS*をtargetとすることで、がんの抑制作用を示すと考えられており[36]、Let-7の発現量が減少していることと、生存期間の短縮が相関することが知られている[37]。その他にも、miR-21やmiR-29など、様々なmiRNAでがんと関連が示されている[38,39]。

心血管疾患との関連では、miR-590 とmiR-199aが新生児のマウスとラットの心筋細胞において発現が増加し、*ex vivo*にて成人の心筋細胞のcell cycleを活性化し、新生児と成人の心筋細胞の増殖を促進させたという報告がなされている。また、心筋梗塞後のマウスモデルの心筋細胞の再生を促し、心臓の機能を回復させたとも報告されている[40]。

神経変性疾患との関連では、miR-124aは脊椎動物の中樞神経で最も多く発現

しており、*Lhx2* (*LIM Homeobox 2*)をtargetとしてその発現を抑制することで、網膜や、海馬ニューロンの軸索の適切な発達を促していることが報告されている[41]。

炎症性疾患との関連では、関節リウマチや変形性関節症の血漿中で、miR-132の発現量が多く、滑液中では関節リウマチの方が変形性関節症よりも多く発現している。血漿中でのmiR-132の発現量は疾患の活動性と相関することが報告されている[42]。

### miRNAと肺線維症の関連

miRNAと肺線維症モデルの関連、またmiRNAとIPFの関連についてはいくつかの論文で報告されている。

miR-21はSmad7をtargetとすることが知られており、マウス肺線維症モデルならびにIPFのII型肺胞上皮細胞において発現が増加する。また、TGF- $\beta$ 1によって肺胞上皮細胞のEMTを誘導した場合においてもmiR-21の発現が増加する。*In vitro*において、マウスから単離した肺胞上皮細胞のmiR-21を抑制すると、TGF- $\beta$ 誘導性の*Acta2*や*vimentin*などの間葉系マーカーの発現量が低下することが報告されている[43]。

miR-29はTGF- $\beta$ 誘導性肺線維症モデルで発現量が減少することが知られてい

る。miR-29の発現は*Smad3*によって抑制され、*Smad3*のノックアウトマウスのブレオマイシンモデルではコラーゲンやフィブロネクチンの増加を抑制し、同時にmiR-29の発現量の減少が抑えられた。また、マウスモデルにおいて、遺伝子改変されたトランスポゾン(Sleeping Beauty)を静脈内投与してmiR-29を遺伝子導入すると、肺のコラーゲン沈着などが抑えられたと報告されている[44]。

miR-145は、TGF- $\beta$ で活性化された肺線維芽細胞や、IPFの肺組織で発現量が増加する。miR-145は*ACTA2*の抑制因子である*KLF4*をtargetとし、*in vitro*でcell lineヒト肺線維芽細胞(MRC-5)に過剰発現させた場合*ACTA2*の発現量が増加し、発現抑制した場合*ACTA2*の発現量が減少する。また、miR-145のノックアウトマウスのブレオマイシンモデルにおいても肺のコラーゲン量や*Acta2*の発現量が減少したと報告されている[45]。

miR-17-92の発現量がIPFの肺組織において減少していることも報告されている。miR-17-92クラスターをIPF患者由来の肺線維芽細胞に遺伝子導入すると、アクチンファイバーの形成が抑えられ、コラーゲン、*VEGF*、*CTGF* の発現量が減少した。IPFの肺組織においてmiR-17-92のプロモーター領域のメチル化が亢進しており、miR-17-92のtargetと予測されるメチル基転移酵素である

*DNMT1*(DNA-methyltransferase 1)の発現量が増加していた。メチル基転移酵素の阻害剤である5'-aza-2'-デオキシシチジンをIPFの肺線維芽細胞に*in vitro*で作用さ

せると、miR-17-92の発現量が増加し、*VEGF*、*CTGF* の発現量も増加した。以上からmiR-17-92が線維症においてネガティブフィードバックとなっていることが示唆された。また、ブレオマイシンモデルの肺組織でもmiR-17-92の発現量が減少しており、マウスに5'-aza-2'-デオキシシチジンを投与すると、miR-17-92の発現量が増加し、*VEGF*、*CTGF* の発現量も増加した[46]。

Let-7dは、IPFの肺組織において発現量が減少しており、多種の上皮細胞(A549 cells, RLE-6TN cells, Normal human bronchial epithelial cells)においてTGF- $\beta$ がlet-7dの発現量を減少させ、let-7dのプロモーター領域とSMAD3が結合することがクロマチン免疫沈降によって確認された。上皮細胞株のlet-7dを抑制したところ、targetと予測される*HMG A2*と、間葉系マーカーの*N-cadherin-2*、*vimentin*、*ACTA2*の発現量が増加した。また、マウスにlet-7dインヒビター(antagomir)を経気道的投与してlet-7dを発現抑制すると肺胞間隙が厚くなり、*SFTPC*(pulmonary-associated surfactant protein C)を発現する肺胞上皮細胞におけるコラーゲン、*ACTA2*、*vimentin*の発現量が増加した[47]。

また、ラットのブレオマイシンモデルの肺組織で、miRNAのマイクロアレイ解析とプロテオーム解析を行い、IPA Ingenuity Pathway Analysis による統合解析を行った報告がある。ブレオマイシンモデルの早期の段階で変動したmiRNAから活性化される遺伝子を予測すると、それらの遺伝子は、肺組織の細胞の増殖

能、移動能、浸潤能、細胞死への抵抗性に関わっていることがわかった [51]。

以上のように、肺線維症とmiRNAの関連については、様々な報告がされている[43-51]。

しかしながら、これらの報告の多くのサンプルは、肺組織由来であり、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、肺泡マクロファージなど様々な細胞を含んでいるので、線維芽細胞特異的な解析が難しい。また、マウスモデルは、概ねブレオマイシン誘導モデルが使用されており、肺線維症モデルにおいて変動するmiRNAは多数なため、モデル非依存的に線維化に関わっているmiRNAを同定するのが困難である。

よって、私はブレオマイシンとシリカ誘導モデルの2つのモデルを使用し、両者において発現が増加または減少したmiRNAをリストアップした。また、肺線維芽細胞において線維化の進行とともに発現変動するmiRNAを調べるため、*Colla2*-GFPマウスを使用してGFP陽性の線維芽細胞をフローサイトメトリーにより純的に分取して、それらの遺伝子発現解析やmiRNA発現解析を行った。

## 目的

肺線維症モデルマウスの肺線維芽細胞において、発現が増加または減少する miRNA を調べる。また、それらの miRNA が肺線維芽細胞の活性化に与える影響を明らかにする。

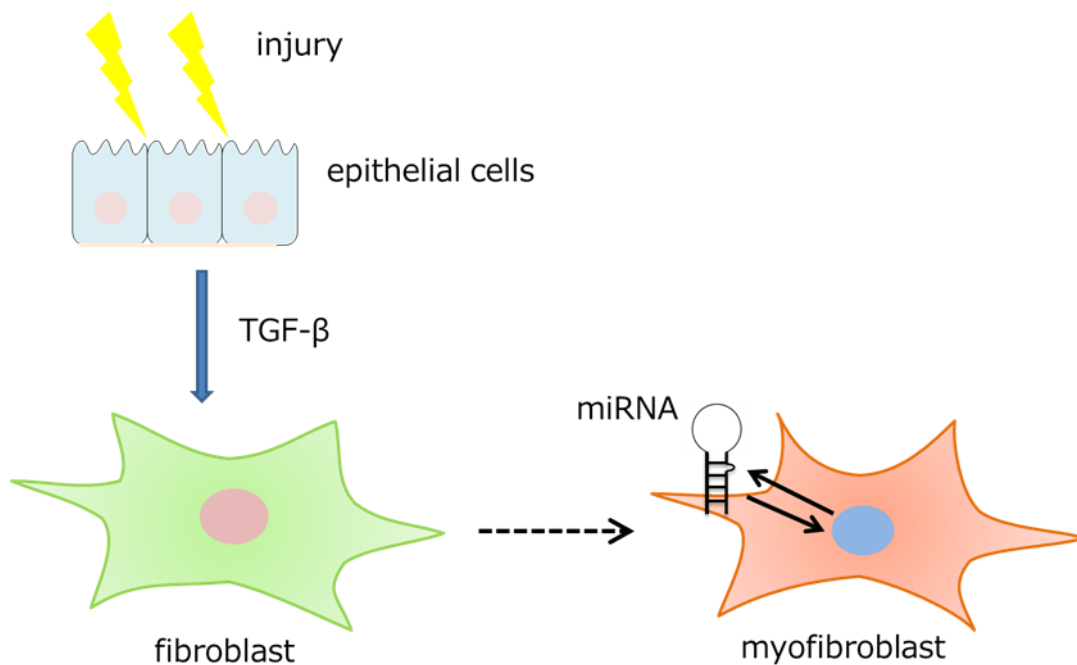


図4 実験の目的

線維芽細胞の活性化に影響を与える miRNA を調べ、その機能を明らかにする。

## 第二章 方法

### マウス

Collagen I( $\alpha$ 2)-green fluorescent protein (GFP)レポーターマウス(*Colla2*-GFPマウス； C57BL/6由来 10世代以上戻し交配)の詳細については参考文献の通りである[52]。東海大学の稲垣豊先生から譲り受けた。

野生型マウスとして、C57BL/6マウスは日本SLC(Hamamatsu, Japan)または日本クレア(Tokyo, Japan)から購入した。

$\alpha$ -smooth muscle actin-Kusabira Orange *Colla2*-GFPマウス(*Acta2*-KO *Colla2*-GFPマウス)は、*Acta2*-KOマウスと*Colla2*-GFPマウスを交配して作成した。*Acta2*-KOマウスはenhancer- $\Delta$ hLNGFR -CreER-polyA-*Acta2* promoter-loxP-stop-loxP-KOを遺伝子導入されたマウスと、ROSA26-CAG promoter-CreERを遺伝子導入されたマウスを交配し、germ lineにてstop配列を除去することにより、enhancer- $\Delta$ hLNGFR -CreER-polyA-*Acta2* promoter-KO遺伝子を有する系統を樹立することによって作成した。*Acta2* promoter-loxP-stop-loxP-KO はY染色体上に存在しており、KOの発現、及びその強度が*Acta2*遺伝子の発現強度と相関することは確認できたが、CD271の発現は確認できなかった。

実験には6~12週齢のマウスを使用し、当教室のSPF (specific pathogen-free



facilities)で飼育した。すべての動物実験は、東京大学医学系研究科・医学部動物実験委員会の承認「炎症・免疫疾患における免疫担当細胞・組織細胞の動態制御(承認番号：医-P12-35P2A)」のもと、法令および東京大学動物実験実施マニュアルに従って実施した。

### 肺線維症モデルマウスの作成

ブレオマイシン誘導とシリカ誘導肺線維症モデルのプロトコールは参考文献の通りである[53,54]。

ブレオマイシン誘導モデルに関しては、マウスをイソフルランで麻酔した後、ブレオマイシン硫酸塩(Toronto Research Chemical, Toronto, Canada) を50  $\mu$ Lの生理食塩水に溶かして1.25 mg/kgにしたものを口腔咽頭に滴下し、誤嚥させることにより経気道的に投与した。

シリカ誘導モデルに関しては、シリカ粒子 (MIN-U-SIL5, US Silica, Frederick, MD, USA; mass-median-diameter (d50) Z 1.4  $\mu$ m) を50  $\mu$ Lの生理食塩水に溶かして400 mg/kgにしたものを口腔咽頭に滴下し、誤嚥させることにより経気道的に投与した。シリカ粒子はエンドトキシンの除去ならびに均一化を目的とした前処置を施した。すなわち、3% w/vのシリカ粒子を1.0 Mの塩酸の中で105°Cで1時間煮沸し、滅菌蒸留水で洗浄し、110°Cで一晩乾燥させた。重量を量り、200°Cで2時間乾熱滅菌し、生理食

塩水に懸濁した。懸濁液は、Bioruptor (Cosmo Bio USA Inc, Carlsbad, CA, USA)を用いて投与直前に30分間超音波で破砕した。

### 肺線維症モデルのmiRNome解析

Lineage (CD31, CD45, CD146, EpCAM-1, TER119) 陰性, GFP陽性の線維芽細胞を肺組織の細胞懸濁液からcell sortingによって単離した。Poly (A) RNAとsmall RNAは、mirVana miRNA isolation kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)を製品のプロトコール通り使用して抽出した。

Small RNAをmiRNome解析に使用した。small RNA のライブラリーは、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Life Technologies)を製品のプロトコール通りに使用して作成した。Ion PGM™ Sequencing 200 Kit (Life Technologies)、Ion 318 chipならびにIon PGM™ Systemを用いてサンプルの配列情報を取得した。CLC Genomics Workbench v.6.0.5(CLC bio, Aarhus, Denmark)により配列情報のトリミング (19-25 bp)を行った。miRBaseデータベースと配列情報の照合を行い、各miRNAの発現量を得た。総tag数が80000tagになるように標準化を行い、2回の実験の平均値を報告した。

## miRNAの候補の選択とtarget予測

ブレオマイシン誘導モデルとシリカ誘導モデルマウスからGFP陽性の肺線維芽細胞をsortingによって回収して、miRNome解析で線維芽細胞のmiRNAの発現量を調べた。シリカ誘導モデルとブレオマイシン誘導モデルで共通して増加・減少したmiRNAを線維化に関係のあるものと考えた。miRNAの targetとなる遺伝子をmicroT-CDS v5.0 (miTG score $\geq$ 0.9)

([http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index)),

miRDB(<http://mirdb.org/miRDB/>), miRanda

(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), Targetscan Mouse

7.1([http://www.targetscan.org/mmu\\_61/](http://www.targetscan.org/mmu_61/))を使用して予測した。

これら4つのオンラインソフトウェアの中で3つ以上のソフトウェアから予測された遺伝子を選び出した。予測された遺伝子の中から線維化に関連すると報告された遺伝子を探し出した。

## プラスミドの作成とmiRNA発現確認

レンチウイルスのベクターとレトロウイルスのベクターを作成した。プラスミド構造を示す(図5)。

レンチウイルスのプラスミドDNAはRIKEN (Japan)から購入したCS2EF-MCS

を使用した。マウスのゲノム DNAからPCRによって増幅したtotal400-500 bp程度で、中間に100 bp程度のmiRNA precursor を含む配列を、CS2EF-MCS のEcoR1とXba1の制限酵素で切断した部位に挿入した。クローニングにはIn-Fusion HD cloning kit (Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA)を使用した。レポーターとして細胞内領域欠損型ヒトCD271( $\Delta$ hLNGFR)を使用し、miRNA配列の下流のHpa1で切断した部位にIRES(internal ribosome entry site)- $\Delta$ hLNGFRを挿入した。miRNA precursorとIRES- $\Delta$ hLNGFR はEF1 $\alpha$ プロモーターによって発現されるようにした。

レトロウイルスのプラスミドベクター は、pMYs プラスミド(東京大学医科学研究所の北村俊雄博士より譲受)を使用した。まず、pMYsをBamH1とEcoR1の制限酵素で切断した部位にマーカーとして $\Delta$ hLNGFRを挿入した。次いでCMV プロモーターと、miRNA precursor を含む配列を、 $\Delta$ hLNGFRの下流に挿入した。 $\Delta$ hLNGFRはMMLVプロモーター (5'LTR) 、miRNA precursor はCMV プロモーターによって発現されるようにした。

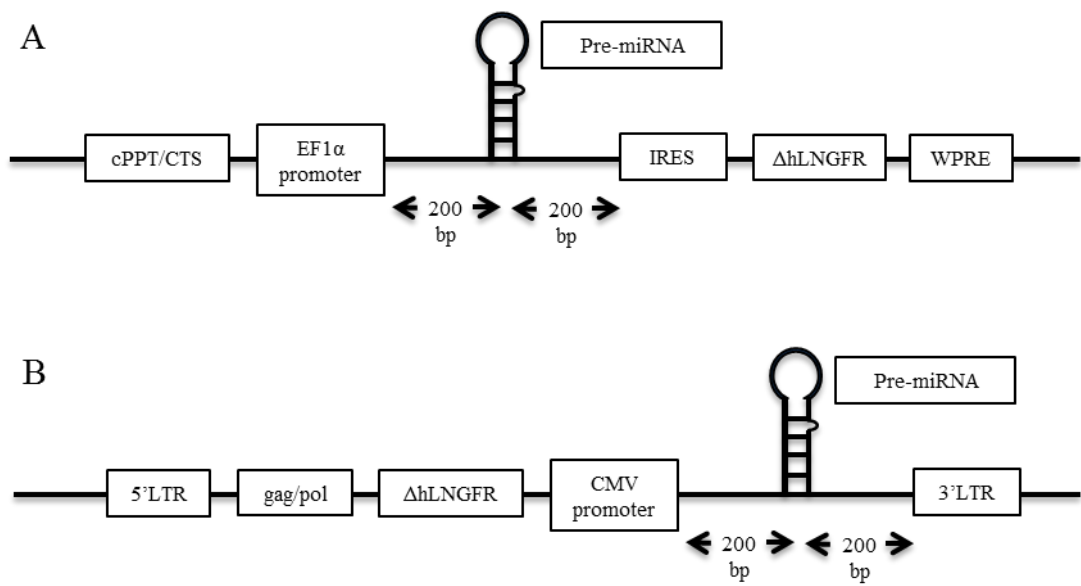


図5 ウイルスのベクタープラスミドの構造

(A, B) pMYs プラスミドのBamH1とEcoR1を切断した部位に $\Delta$ hLNGFRを挿入し、CMVプロモーターとmiRNA precursor を含む配列を、 $\Delta$ hLNGFRの下流に挿入した。(A) レンチウイルスのベクター (B) レトロウイルスのベクター

## miRNA発現ベクタープラスミドの動作確認

psiCHECK™-2 Vector (Promega, USA)を用いてsensorベクターを作成し、miRNAの発現を確認した。プラスミドの構造を(図8A)に示す。

センス鎖とアンチセンス鎖をアニーリングして2本鎖DNAを作成し、psiCHECK™-2をXhoIとNotIの制限酵素で切断した後に、Ligation high Ver.2(Toyobo, Osaka, Japan)を用いてそれらの2本鎖DNAを挿入した。センス鎖とアンチセンス鎖の配列を(図8B)に示す。miRNAベクターまたはemptyベクターと、sensorベクターをHEK293T細胞にLipofectamine LTX (Life Technologies)を用いて共トランスフェクションし24時間培養した。

Dual-Glo® Reporter Assay System (Promega)を製品のプロトコール通りに使用して、renillaルシフェラーゼとfireflyルシフェラーゼの比を測定した。

## 線維芽細胞の単離

肺線維芽細胞は*Colla2*-GFPマウスと*Acta2*-KO *Colla2*-GFPマウスから単離した。方法は参考文献の通りに[55]、マウスを解剖して、肺を取り出し、剃刀によって小さく刻み、酵素的に消化し、単細胞懸濁液を得た。

具体的には、RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) に10% fetal bovine serum と10 mmol/L HEPES (Nishirei Biosciences Inc, Tokyo, Japan)を加

えたものに、終濃度が0.2% collagenase (Wako, Osaka, Japan), 0.96 mg/mL Dispase II (Roche, Basel, Switzerland) と20 kU/mL DNase I (Sigma-Aldrich)になるよう、各酵素を添加し、細断した肺組織を37°Cで60分間インキュベートした。インキュベートの間、20分毎に18G, 21G, 200 uL tipを通し、アジテーションを行った。その後、Percoll (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)をDMEMで70%と20%に希釈し、それらを用いた比重遠心分離 (1000 g, 20分間)によって赤血球を除去した。

回収した細胞の懸濁液をbiotin anti-CD31抗体(clone 390;BD biosciences, San Jose, CA, USA), biotin anti-CD45抗体(clone 30-F11; BD biosciences), Allophycocyanin (APC) anti-CD146抗体(clone ME-9F1; Biolegend, San Diego, CA, USA), biotin anti-EpCAM(CD326)抗体(clone G8.8; Biolegend), biotin anti-Ter119抗体(clone Ter119; BD biosciences)で30分間染色後に、2次抗体としてAPC streptavidin conjugate (clone APC003; Biolegend)で30分間染色した。その後 Anti-APC マイクロビーズ(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)で30分間染色し、Lineage陰性(CD31<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup>, EpCAM<sup>-</sup>, Ter119<sup>-</sup>) の細胞を AutoMACS(Miltenyi Biotech)を使用してnegative selectionし、線維芽細胞の純度を高め、3日間以上培養して細胞を増殖した。使用した細胞はLineage陰性の線維芽細胞を95%以上含んでいた。

## ウイルスベクターの作成、遺伝子導入

レンチウイルス、レトロウイルスのベクターは順にHEK293T細胞、GP2-293T細胞へのトランスフェクションにより産生した。方法は参考文献通りである[56]。

レンチウイルスのベクターに関しては、まず $5 \times 10^6$ 個のHEK293T細胞を15 cm ディッシュに撒き、12時間培養した。次いで、HEK293T細胞に、リン酸カルシウム法によってpCMVdr8.2プラスミド21  $\mu\text{g}$ 、pMDGプラスミド21  $\mu\text{g}$ 、ベクタープラスミド42  $\mu\text{g}$ をトランスフェクションし、8~12時間後にメEDIUMを取り除き、新鮮な10%FBSを含んだDMEM溶液に交換した。トランスフェクションから48~72時間後にウイルス溶液を回収した。Amicon Ultra-15 (100 kD Millipore Corporation, Bedford, MA)を使用し、ウイルス溶液を濃縮した。遺伝子導入のために、48 ウェルプレートで培養した初代培養肺線維芽細胞に上記のウイルス溶液を適切な濃度の希釈したものを8時間感染させた。コントロールとしてemptyベクターを使用した。

レトロウイルスのベクターに関しては、まず $1.2 \times 10^7$ 個のGP2-293T細胞を15 cm ディッシュに撒き、12時間培養した。次いで、GP2-293T細胞にリン酸カルシウム法によってVSV-G プラスミド30  $\mu\text{g}$ 、ベクタープラスミド42  $\mu\text{g}$ をトランスフェクションし、12時間後に新鮮な10%FBSを含んだDMEM溶液に交換した。トランスフェクションから48~72時間後にウイルス溶液を回収した。ウイルス溶液を



0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターに通した後、Amicon Ultra-15 (50 kD)を使用して溶液を濃縮した。lentiX Concentrator (Clontech Laboratories Inc.) をプロトコール通りに使用して、ウイルスペレットを作成し、10%FBSを含んだDMEM溶液に懸濁した。遺伝子導入のために、48 ウェルプレートで培養した初代培養肺線維芽細胞に上記のウイルス溶液を適切な濃度の希釈したものを24時間感染させた。コントロールとしてemptyベクターを使用した。

1%FBSを含んだDMEMにメディウムを変更して12時間培養した。その後1%FBS+DMEMにTGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を含んだものと含んでいないものにメディウムを変更し、24時間後にディッシュに張り付いている遺伝子導入された線維芽細胞を0.05%Trypsin-EDTA (Life Technologies)で剥がし、細胞懸濁液を調整した。APC anti-CD271抗体(clone ME20.4; Biolegend)で30分間染色し、フローサイトメトリーで遺伝子導入効率を測定した。

これらの細胞のRNAを定量的リアルタイムPCR法に使用し、*Acta2*とmiR-20aの発現量を測定した。

### 定量的リアルタイムPCR法

遺伝子導入された肺線維芽細胞のtotal RNAはTRIzol<sup>®</sup> Reagent (Life

Technologies)を使用して抽出した。ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo) を製品のプロトコール通り使用してcDNAを作成した。ABI 7500 real-time PCR system (Life Technologies)を使用して、THUNDERBIRD<sup>®</sup> SYBR qPCR Mix (Toyobo)によって、リアルタイムPCRを行った。プライマーの配列を示した(表1)。

miRNAの定量に関しては、TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays (Life Technologies) を製品のプロトコール通りに使用してcDNAを作成した。THUNDERBIRD<sup>®</sup> Probe qPCR Mix (Toyobo)を使用して、ABI 7500 real-time PCR system (Life Technologies)によって、リアルタイムPCRを行った。

ハウスキーピング遺伝子を線維化関連遺伝子の測定の場合は*Rps3*とし、miRNAの測定の場合はmiR-23aとして、各遺伝子の相対発現量を算出した。

miRNome解析の中でmiR-23aのtag countが安定していたこと、またtag countが十分に高かったことから、miR-23aをハウスキーピング遺伝子とした。

表1 定量的リアルタイムPCRのプライマー配列

Primer	Forward (5'to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>Acta2</i>	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA
<i>Adam12</i>	CACACGGATCATTGTTACTACCA	ATTGGCTCTAAGCTGTACGTTTT
<i>Ccl2</i>	CATCCACGTGTTGGCTCA	GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT
<i>Colla1</i>	AGACATGTTTCAGCTTTGTGGAC	GCAGCTGACTTCAGGGATG
<i>Colla2</i>	GGTGAGCCTGGTCAAACGG	ACTGTGTCCTTTCACGCCTTT
<i>Ctgf</i>	CTGCAGACTGGAGAAGCAGA	GCTTGGCGATTTTAGGTGTC
<i>Dcn</i>	GAGGGAACCTCCACTTGGACA	TTGTTGTTGTGAAGGTAGACGAC
<i>Eln</i>	TTGCTGATCCTCTTGCTCAAC	GCCCCTGGATAATAGACTCCAC
<i>Itga5</i>	CTTCTCCGTGGAGTTTTACCG	GCTGTCAAATTGAATGGTGGTG
<i>Mmp3</i>	ACATGGAGACTTTGTCCCTTTTG	TTGGCTGAGTGGTAGAGTCCC
<i>Serpine1</i>	GGCACCTTTGAATACTCAGGA	TTTCCCAGAGACCAGAACCA
<i>Rps3</i>	CGGTGCAGATTTCCAAGAAG	GGACTTCAACTCCAGAGTAGCC
<i>Spp1</i>	GGAGGAAACCAGCCAAGG	TGCCAGAATCAGTCACTTTCAC

### ***α-SMA*と*Colla2-GFP*のMFIの測定**

*Colla2-GFP*マウス由来の初代培養肺線維芽細胞を前述のようにレトロウイルスによって遺伝子導入し、10%FBSを含んだDMEMで培養した。*Acta2*のmRNAの半減期は約18時間、*Acta2*のproteinの半減期は約59時間と推測されている[57]ので、4日間培養した。細胞をPhycoerythrin (PE) anti-CD271抗体 (Biolegend) で30分間染色後、4%PFAで30分間on iceにて固定後、BD Perm/Wash™ buffer (BD Biosciences)を用いて細胞膜の膜透過処理をon iceで30分間行った後、intracellular stainingを行った。製品のプロトコール通りに使用し、BD Perm/Wash™ buffer に溶解した。APC anti- $\alpha$ -smooth muscle actin抗体(clone 1A4; R&D Systems)で30分染色後、3回洗浄した。フローサイトメトリーでCD271陽性細胞の $\alpha$ -SMA抗体のMFIを測定した。

上記と同様の感染・培養を行った細胞をAPC-antiCD271抗体で30分間染色後、3回洗浄した。フローサイトメトリーでCD271陽性細胞のGFPのMean fluorescent intensity (MFI)を測定した。

抗体の蛍光色素の選択に関しては、蛍光補正(compensation)がMFIを測定したい蛍光チャンネルに影響を与えないようにした。

### ***Acta2-KO Colla2-GFP*線維芽細胞の観察とMFIの測定**

*Acta2-KO Colla2-GFP*マウスから単離した初代培養肺線維芽細胞(*Acta2-KO Colla2-GFP*肺線維芽細胞)は、前述通りにレトロウイルスに感染させて遺伝子導

入した。1%FBSを含んだDMEM溶液にメディウムを変更後12時間培養し、1%FBSを含んだDMEM溶液にTGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, R&D Systems) を混合したもの、または混合していないものにメディウムを変更し、36時間培養した。その後、PBSにメディウムを変更し、蛍光顕微鏡(BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan)で観察した。細胞を0.05%Trypsin-EDTAで剥がし、APC anti-CD271抗体で30分間染色し、フローサイトメトリーで解析した。

#### コラーゲングルアッセイ

1.5 mg/mlのコラーゲングル (RAT TAIL COLLAGEN, TYPE 1, BD Biosciences) をプロトコール通りに使用した。 *Colla2*-GFPマウス由来の初代培養肺線維芽細胞を24時間ウイルス溶液に感染させた後、 $3 \times 10^4$  個の細胞をコラーゲンに撒いた。メディウムは1%FBSを含んだDMEMにTGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, 24時間)を混合したものと混合していないものを使用し、48ウェルプレートで培養した。コラーゲンをウェルから切り離した後、ゲルの表面積を測定した。%gel contractionは、それぞれの時間のゲル表面積を、切り離した直後の表面積で割って計算した。 ImageJ version 1.47t (NIH, Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij>)を用いてコラーゲングル収縮を評価した。

## Target遺伝子の測定

*Colla2*-GFPマウス由来の初代培養肺線維芽細胞を前述のようにレトロウイルスによって遺伝子導入し、10%FBS+DMEMで培養した。*TGF-βR2*のmRNAの半減期は1~3時間(平均2時間)、タンパクの半減期は1~5時間(平均3時間)と推測されているので[58-61]、細胞を5時間培養した。細胞懸濁液をPE anti-CD271抗体とAPC anti-*TGF-βR2*抗体(R&D systems)で30分間染色後、3回洗浄した。フローサイトメトリーでCD271陽性細胞の*TGF-βR2*抗体のMFIを測定した。

## ルシフェラーゼアッセイによるtarget遺伝子の確認

*TGF-βR2*のsensorベクターとmutantベクターは、psiCHECK™-2 Vectorから作成した。XhoIとNotIの制限酵素で切断した後、Ligation high Ver.2を用いて2つのベクターの配列(図13C)を挿入した。2つのベクターのそれぞれと、miR-20aのベクターをHEK293T細胞にLipofectamine LTXを用いて共トランスフェクションし24時間培養した。

Dual-Glo® Reporter Assay Systemを製品のプロトコール通りに使用して、renillaルシフェラーゼとfireflyルシフェラーゼの比を測定した。

### **IT-transferモデル(経気道的投与による肺線維芽細胞の移植)**

肺線維芽細胞のIT-transfer(経気道的投与による移植)モデルは、参考文献の手法を用いた[29]。

要約すると、*Colla2*-GFPマウス由来の初代培養肺線維芽細胞を、前述の方法でレトロウイルスによって遺伝子導入し、3日間培養した。MACSを使用してCD271陽性細胞のpositive selectionを行ってから、さらに10日間培養し、細胞数を増加させた。遺伝子導入効率はすべてのサンプルで95%以上だった。ブレオマイシン(50 $\mu$ Lの生理食塩水に溶かして1.25 mg/kgにしたもの)を投与して7日目(day7)の B6Jマウスに、上記の細胞の懸濁液を経気道的投与した。5 $\times$ 10<sup>6</sup>個の細胞を50  $\mu$ LのPBSに溶解して、マウス1匹あたりに投与した。これらの細胞を10日目(day10)に全肺を酵素消化することにより回収した。

GFP陽性かつCD271陽性細胞(移植した細胞)をcell sortingによって直接Lysis buffer (1% LiDS, 100 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT)中に単離し、定量的リアルタイムPCR, トランスクリプトーム解析に使用した。

### **IT-transferモデルから回収した細胞の全mRNAの増幅**

IT-transferモデルから回収した細胞の全mRNAの増幅は、以下のように行った。Biotin-TEG-adaptor-dT25プライマー (Sigma-Aldrich) 0.5 pmolをDynabeads M-270

streptavidin (Life Technologies) 20  $\mu$ Lに結合させ、B&W-T buffer (5 mM Tris-HCl pH7.5, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.10% Tween-20)で2回、Lysis bufferで1回wash後、上述の細胞を溶解したLysis buffer中に加えた。30分間室温にて緩やかに攪拌し、細胞由来のmRNAをビーズ上にトラップした。Wash buffer A (0.1% LiDS, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM LiCl, 1 mM EDTA)で1回、Wash buffer B (10 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM LiCl, 1 mM EDTA)でビーズをwash後、10  $\mu$ LのRT mix 1 (1x SSIV buffer (Life Technologies), 2 mM dNTP, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.2 U/ $\mu$ L RNaseIn Plus (Promega)) に懸濁した。70°Cで90秒間加熱後、氷上にて急冷した。10  $\mu$ L のRT mix 2 (1x SSIV buffer, 10 mM DTT (Life Technologies), 10 U/ $\mu$ L Superscript IV (Life Technologies), 2 M betaine (Sigma-Aldrich))を加え、35°Cで5分間、50°Cで15分間反応させ、逆転写を行った。Lysis bufferで1回、B&W-T bufferで2回、10mM Tris-HCl pH8.0で1回wash後、20  $\mu$ LのRNase H mix (1x First-strand buffer (Life technologies), 5 mM DTT, 0.6 U/ $\mu$ L RNase H (Life technologies))を加え、37°Cで20分間反応させ、RNAを分解した。B&W-T bufferで2回、10mM Tris-HCl pH8.0で1回wash後、20  $\mu$ LのTdT mix (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CoCl<sub>2</sub> (Roche , Switzerland), 0.65 mM dATP (Life technologies), 15.2 U/ $\mu$ L TdT (Roche))を加え、37°Cで3分間 20秒間反応させ、cDNAの末端にpolyAを付加した。その後直ちに5  $\mu$ Lの0.5 M EDTAを加えて反応を停止させ、65°Cで10分間加熱し、TdT



酵素を不活化させた。B&W-T bufferで2回、10mM Tris-HCl pH8.0で1回wash後、2nd strand synthesis mix 20  $\mu$ L (1x KAPA Hifi ReadyMix (KAPA biosystems Boston, MA, USA), 0.4  $\mu$ M anchored tagging primer) を加え、95 $^{\circ}$ C 2分間, 98 $^{\circ}$ C 20秒間, 44 $^{\circ}$ C 2分間, 72 $^{\circ}$ C 7分間反応させ、第2鎖を合成した。B&W-T bufferで2回、10mM Tris-HCl pH8.0で1回wash後、1st WTA mix 25  $\mu$ L (1x KAPA Hifi ReadyMix, 0.4  $\mu$ M anchored tagging primer, 0.4  $\mu$ M 3'WTA primer) を加え95 $^{\circ}$ C 3分間, [98 $^{\circ}$ C 20秒間, 44 $^{\circ}$ C 2分間, 72 $^{\circ}$ C 7分間] x7 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5分間の条件でPCRを行った。上清を回収し、反応液量に対し0.6の割合にて、AmPure XP beadsを用いて2回精製した。23  $\mu$ LのdH<sub>2</sub>OにてDNAを溶出し、2nd WTA mix 27  $\mu$ L (1x KAPA Hifi ReadyMix, 0.614  $\mu$ M 5'WTA primer, 0.614  $\mu$ M Biotin-TEG-3'WTA primer) を加え95 $^{\circ}$ C 3分間, [98 $^{\circ}$ C 20秒間, 44 $^{\circ}$ C 2分間, 72 $^{\circ}$ C 7分間] x 9 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5分間の条件でPCRを行った。PCR反応液を反応液量に対し0.6の割合にて、AmPure XP beadsを用いて1回精製し、25 $\mu$ LのTris-HCl pH8.0に溶出した。増幅されたDNAの量をNanodrop 1000 (Thermo Scientific , Wilmington, DE, USA)にて定量し、またDNAのサイズ分布をアガロース電気泳動にて確認し、1 kbp-2 kbpにピークを持つ、500 bp以上の範囲のスミアバンドとなることを確認した。

## IT-transferモデルから回収した細胞の増幅mRNA libraryを用いたSAGE library の作成

定量した増幅mRNA libraryを100 ng用いて SAGE libraryを以下のように作成した。増幅mRNA library100 ngを50  $\mu$ LにdH<sub>2</sub>Oでメスアップし、50  $\mu$ LのNla III digestion mix (0.4 U/ $\mu$ L NlaIII (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), 2x Cutsmart buffer (New England Biolabs))を加え、37°C, 2時間切断した。50  $\mu$ Lの Dynabeads M-280 streptavidin (Life Technologies) をB&W-T bufferで1回wash後、50  $\mu$ Lの2x B&W-T buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.20% Tween-20)に再懸濁し、上記のNlaIII反応物中に加えた。30分間室温にて緩やかに攪拌し、DNAの3'末端をbeads上にトラップした。B&W-T bufferで3回、10mM Tris-HCl pH8.0で1回wash後、14  $\mu$ Lの10mM Tris-HCl pH8.0に再懸濁した。1  $\mu$ LのCS1-EcoP15I-NlaIII adapter (10  $\mu$ M)を加えピペティングにて攪拌後、15  $\mu$ LのDNA ligation kit <Mighty Mix> (Takara)を加え、16°Cにて30分間反応させ、アダプターをNlaIII切断部位にライゲーションした。B&W-T bufferで3回、500  $\mu$ LのB&W-T buffer に再懸濁し、1.5 mlのスクリーキャップチューブ (ザルスタット) に移した。10mM Tris-HCl pH8.0で1回、1x NEBuffer 3.1 (New England Biolabs) でwash後、EcoP15I digestion mix (1x NEBuffer 3.1, 1 mM ATP, 0.2 U/ $\mu$ L EcoP15I (New England Biolabs))を加え、37°Cにて16時間緩やかに攪拌しながら切断した。

上清を回収し、Nucleospin Gel&PCR clean-up kit (Takara)にて精製し、12.5  $\mu\text{L}$ の  $\text{dH}_2\text{O}$ にて2回溶出した。溶出液に対し、NEBNext Ultra II End Repair/dA-tailing moduleを用い、プロトコール通りに末端修復及びpolyA付加を行った。引き続き、NEBNext Ultra II ligation Module (New England Biolabs)および1.25  $\mu\text{L}$ の CS2-adapter(1.5  $\mu\text{M}$ )を用い、プロトコール通りにライゲーション反応を行った。反応産物をQiagenmin Elute Column (Qiagen , Hilden, Germany)にて精製し、13  $\mu\text{L}$ の  $\text{dH}_2\text{O}$ にて溶出した。溶出液10.75  $\mu\text{L}$ を用い、Barcoding mix 14.25  $\mu\text{L}$  (1x KAPA Hifi ReadyMix, 0.614  $\mu\text{M}$  IonA-BC(N)-CS1- primer, 0.614  $\mu\text{M}$  Ion-trP1-CS2 primer) を加え、98 $^{\circ}\text{C}$  45秒間, [98 $^{\circ}\text{C}$  15秒間, 65 $^{\circ}\text{C}$  30秒間, 72 $^{\circ}\text{C}$  90秒間] x9 cycle, 72 $^{\circ}\text{C}$  1分間の条件でPCRを行った。各サンプルにつき、異なるDNAバーコードを有するプライマーを用い、サンプルを区別出来るようにした。PCR反応液を反応液量に対し0.8の割合にて、AmPure XP beadsを用いて250 bp以上の反応産物を除去した後、さらに0.8の割合のAmPure XP beadsを加え、PCR産物を精製し、SAGE libraryを得た。libraryのサイズ分布をAgilent Bioanalyzer High Sensitivity Kitを用いてシングルピークであること確認し、ライブラリーのモル数をKAPA library Quantification Kit for Ion Torrent (KAPA biosystems)を用いて絶対定量した。

## **IT-transferモデルから回収した細胞の増幅mRNA libraryを用いたSAGE library のIon Protonによるシーケンシング**

8個のSAGE library (miR-20a過剰発現群=4, コントロール群=4)を、各ライブラリーのモル濃度が等しくなる様に混合し、25  $\mu$ L / 75 pmolの量をIon PI Hi-Q Chef Kit (Life Technologies)およびIon Chef system (Life Technologies)にプロトコール通りにロードした。ライブラリーが充填されたIon PI Chip Kit v3 (Life technologies)を回収後、Ion Proton system (Life Technologies)を用いてシーケンシングを行った。シーケンシングの設定はflow numberを200に設定した以外はデフォルト設定を用いた。得られたリードをDNAバーコードに基づき分類し、各サンプル由来のリードを得た。

## **IT-transferモデルから回収した細胞のSAGE libraryシーケンスデータの前処理**

得られたシーケンスデータは、Trimomatic-v0.36[62]およびPRINSEQ-0.20.4[63]を用いてアダプター配列除去、50 bpまでのトリム、3'末端からの低クオリティリード(Q20以下)の除去を行った。

フィルタリング後のリードを、Bowtie2-2.2.5[64]を用いてマウスのRefseq RNA配列 (mm10)に対してマッピングした。マッピングの結果、最初の4塩基がNlaIIサイト(CATG)でないものを除去後、各遺伝子に対してヒットしたリードの数を

カウントした。同じ遺伝子名を持つものを足し合わせ、各サンプルのトランスクリプトームを得た。得られたトランスクリプトームを、総タグ数が100万タグになる様に各遺伝子のタグ数を線形に補正後、サンプル間正規化をR-3.1.1 (<https://cran.r-project.org/>)およびTCCパッケージ[65]を用いて行った。得られた正規化済みデータにつき、発現量を $\log_2(X+1)$ に変換後、t-SNE法を用いてサンプル間クラスタリングを行った。その結果外れ値を示したサンプル(miR-20a過剰発現群=1, コントロール群=1)を除去した。

#### **IT-transferモデルから回収した、miR-20a過剰発現細胞およびコントロール細胞間での発現変動遺伝子の同定**

正規化済みSAGEデータを用い、外れ値を除去したサンプル(miR-20a過剰発現群=3, コントロール群=3)につき、R-3.1.1およびEdgeRパッケージ[66]中のglmLRT関数を用いたlikelihood ratio testおよびBenjamini-Hochbergの多重検定補正に基づき2群間比較を行い、異なる群間にて発現変動している遺伝子を検出した。統計的に有意( $p < 0.05$ )に発現が変動しており、かつ最低発現量が30以上、群間の平均発現量が1.5倍以上異なる遺伝子を、最終的に群間にて発現が異なる遺伝子として同定した。

表2 全mRNA増幅およびSAGE library作成に用いたプライマー配列

Primer	5' to 3'
Biotin-TEG-adapter-dT25	Biotin-TEG-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
anchored tagging primer	GCGGCTGAAGACGGCCTATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTVN
5'WTA primer	GCGGCTGAAGACGGCCTATGT
3'WTA primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Biotin-TEG-3'WTA primer	BioTEG-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
CS1-EcoP15I-NlaIII-F注1)	ACACTGACGACATGGTTCTACAGCAGCATG
CS1-EcoP15I-NlaIII-R注2)	Phos/CTGCTGTAGAACCATGTCGTCAGTGT/(C6)NH2
CS2-F (注2)	Phos/AGACCAAGTCTCTGCTACCGTA/(C6)NH2
CS2-R (注2)	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT*T (* : ホスホロチオエート結合)
trP1_CS2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTACGGTAGCAGAG ACTTGGTCT
IonA_BC1_CS1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGT GCGTACACTGACGACATGGTTCTACA
IonA_BC1_CS2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCAGAC ACGACACTGACGACATGGTTCTACA
IonA_BC1_CS3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTGTCT CTAACACTGACGACATGGTTCTACA
IonA_BC1_CS4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTCGCGT GTCACACTGACGACATGGTTCTACA
IonA_BC1_CS5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCTAT GCGACACTGACGACATGGTTCTACA
IonA_BC1_CS6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGATACG TCTACACTGACGACATGGTTCTACA
IonA_BC1_CS7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCATAGTA GTGACACTGACGACATGGTTCTACA
IonA_BC1_CS8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATACGAC GTAACACTGACGACATGGTTCTACA

(注1) (注2) , F と R の組み合わせでdouble strand化

## 統計

データは平均値±標準誤差で示した。統計手法はunpaired Student's t-tests (two-tailed) およびlikelihood ratio testによって比較し、P値が0.05以下のものを有意差ありと判定した。解析にはPrism software version 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)を使用した。 \*  $p < 0.05$  , \*\*  $p < 0.01$  , \*\*\*  $p < 0.001$  と示した。

## 第三章 結果

私は、まずブレオマイシンおよびシリカで誘導する肺線維症モデルを作成し、正常および線維化誘導後7、14、28日目の肺線維芽細胞におけるmiRNome解析を行い、線維症をもたらす線維芽細胞の活性化に関連する可能性のあるmiRNAを探索した。

### 線維芽細胞のmiRNome解析

両モデルから抽出した肺線維芽細胞のmiRNome解析の結果を(図6)に示した。両モデルのday7の発現量が、未処置群と比較して10倍以上に増加していたmiRNAは21個あった。また、両者のモデルのday7の発現量が未処置群と比較して半分以下となっていたmiRNAは8個であった。その中からday7~28にわたって比較的到高発現していたmiR-20a, 101b, 106b, 146b, 378c, 378d, 3473b と、day7~28にわたって低発現していたmiR-125a, 192, 328, 421, 676, 1843bのfold-changeとtag countを示した(図6A, B)。

また、リアルタイムPCRによって測定したmiR-20aの発現量の結果を(図6C, D)に示した。ブレオマイシンおよびシリカいずれのモデルにおいても、正常肺と比較し4-8倍程度の上昇を認めた。



## A

fold-change against UT

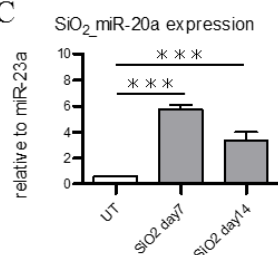
	miR name	SiO <sub>2</sub> day7	day14	day28	BLM day7	day14	day28
UT<SiO <sub>2</sub>	miR-20a	93.5	41.5	26.8	86.7	6.3	3.3
UT<BLM	miR-101b	33	46	34	32	13	12
	miR-106b	146	71	54	78	21	12
	miR-146b	44.2	36.7	29.3	57.7	25.2	12.1
	miR-378c	136	148	110	66	83	42
	miR-378d	31	44	30	13	23	9
	miR-3473b	15.0	19.0	14.0	27.0	13.0	6.0
UT>SiO <sub>2</sub>	miR-125a	0.3	0.4	0.3	0.2	0.6	1
UT>BLM	miR-192	0.2	0.1	0.1	0.2	0.8	0.6
	miR-328	0.1	0.1	0.1	0	0.2	0.6
	miR-421	0.3	0.2	0.2	0.3	0.5	0.5
	miR-676	0.2	0.1	0.2	0.3	0.5	0.3
	miR-1843b	0.3	0.4	0.2	0.1	0.4	0.5

## B

tag count

	miR name	UT	SiO <sub>2</sub> day7	day14	day28	BLM day7	day14	day28
UT<SiO <sub>2</sub>	miR-20a	6	561	249	161	520	38	20
UT<BLM	miR-101b	0	33	46	34	32	13	12
	miR-106b	0	146	71	54	78	21	12
	miR-146b	24	1061	880	702	1385	605	290
	miR-378c	0	136	148	110	66	83	42
	miR-378d	0	31	44	30	13	23	9
	miR-3473b	0	15	19	14	27	13	6
UT>SiO <sub>2</sub>	miR-125a	10807	3224	4198	3730	2670	6741	10852
UT>BLM	miR-192	285	46	40	27	56	224	165
	miR-328	53	7	7	3	0	8	34
	miR-421	76	22	18	13	24	38	39
	miR-676	82	18	11	13	24	41	28
	miR-1843b	18	6	8	4	2	8	9

## C



## D

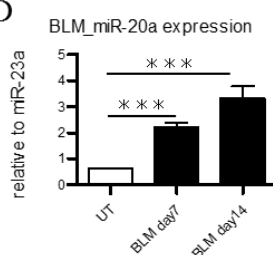


図6 ブレオマイシン誘導肺線維症モデルとシリカ誘導肺線維症モデルの両者の肺線維芽細胞のmiRNome解析の結果 (A, B) 両者のモデルにおいて発現量が増加または減少したmiRNAと、それぞれのmiRNAのday7, day14, day28の発現量を示した。UT, 未処置群 (A) fold-change (B) tag count (C) シリカおよび, (D) ブレオマイシン誘導肺線維症モデルにおける肺線維芽細胞のmiR-20a発現をリアルタイムPCRによって解析した。n=4, 実験回数1回

### ***In silico*でのmiRNA target遺伝子の予測**

上記のmiRNAの中から線維芽細胞の活性化への関与を検証するmiRNAの候補を絞るために、*in silico*解析を行った(図7A)。

*TGF-βR2*, *Hif1α*がmiR-20aのtarget遺伝子として予測された(図7B)。*TGF-βR2*はTGF-β1の膜受容体であるので、TGFβ パスウェイにおいて極めて重要な遺伝子である。*Hif1α*は低酸素に対して細胞や全身の恒常性を保つための主要な調節因子である。TGF-βが*Hif1α*の発現を誘導し、また*Hif1α*をヒトの線維芽細胞に過剰発現させると、TGF-β依存的に*Acta2*の発現量の増加を亢進させ、筋線維芽細胞への分化を促進したという報告がある[67,68]。

また、*Fos*がmiR-101bのtarget遺伝子として予測された(図7B)。*Fos*はヘテロ2量体タンパク質の転写因子であるAP-1を構成している。TGF-β1のヒト肺線維芽細胞に対する発現変化はPI3K/JNK/AktとAP-1に依存的であり、発現変化のためにはAP-1複合体に*Fos*と*JunD*が組み込まれることが必要である[69]。

4つのオンラインソフトウェアに示されている、上記の遺伝子がmiRNAのtargetとなっている可能性を表す数値を表記した(図7B)。miR-20aにおいては、*TGF-βR2*, *Hif1α*の順にtargetとなっている可能性が高いと判断された。

miR-20aとmiR-101bが肺線維芽細胞の活性化に関わっている可能性があると考えられた。また、day7~28にわたってmiRNome解析でのfold change値が高かったmiR-378cを選択した。また、発現が減少していたmiRNAの中で、未処置群の

発現量が高かったmiR-125a, miR-192を選択した。以上の5種類のmiRNAの線維芽細胞の活性化に与える影響を評価することにした。

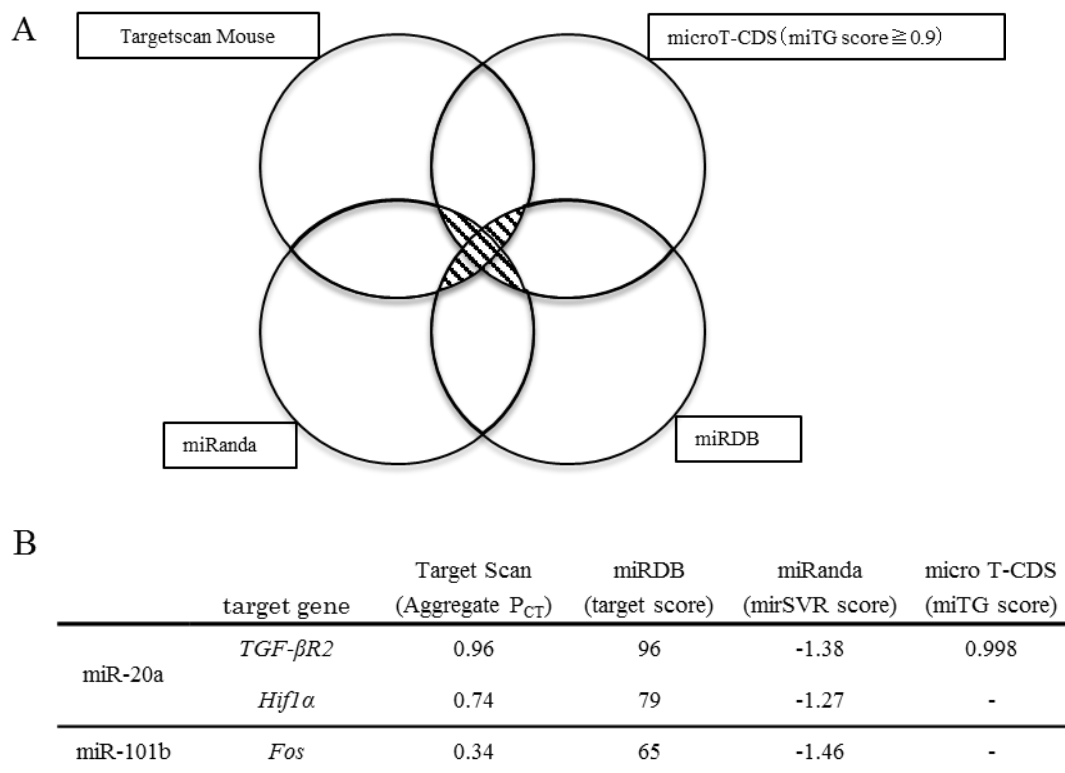


図7 miRNAのtarget 遺伝子の予測

(A) オンラインソフトウェアを用いてmiRNAのtarget遺伝子を予測した。図のように4つのうち3つ以上のソフトウェアで予測された遺伝子に候補を絞った。

(B) 4つのオンラインソフトウェアに記載されている、上記の遺伝子がmiRNAのtargetとなっている可能性を表す数値を示した。

## ルシフェラーゼアッセイによるプラスミドベクターのmiRNAの発現確認

作成したプラスミドにより、miRNAを強制発現可能かどうかを、miRNAの sensorベクターを作成し、renilla/firefly値を比較することで確認した。miR-20a, 101b, 125a, 192は発現ベクターではコントロールベクターに比較し、renilla/firefly値が1/3-1/5程度に低下しており、標的配列の切断が示唆されたが、miR-378cは十分な発現を確認できなかった(図8C)。miRNAごとにrenilla/fireflyのcontrol値が異なっていたのは、HEK293T細胞の内因性のmiRNAの発現量が違うためと考えられる。また、miR-378cの発現が不十分であったのは、典型的なヘアピン構造を形成しないためと考えられた。

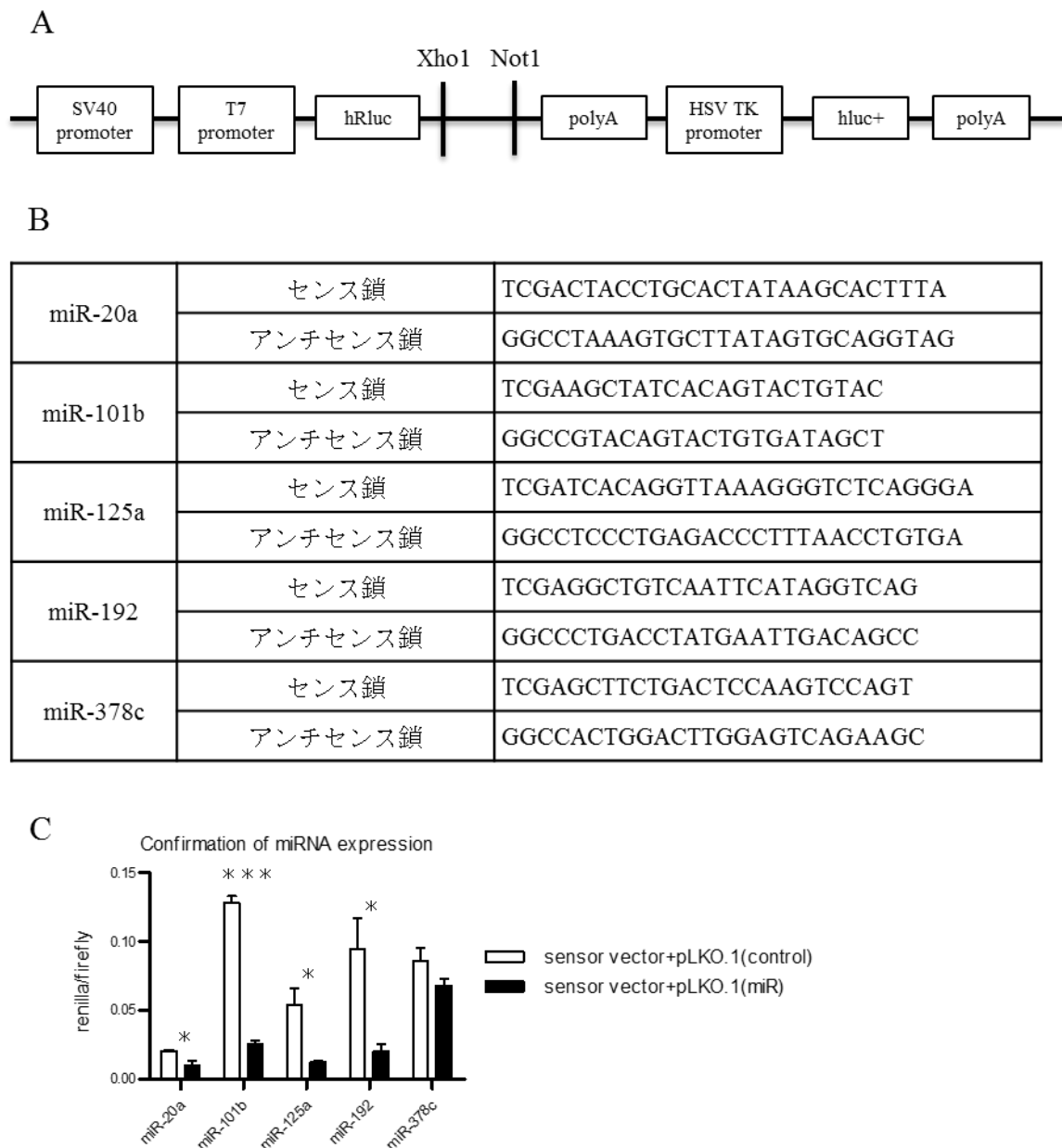


図8 ルシフェラーゼアッセイによるmiRNA発現プラスミドベクターの動作確認

(A-C) miRNAベクターまたはemptyベクターと、sensor vectorをHEK293T細胞にLipofectamine LTX (Life Technologies)を用いて共トランスフェクションし24時間培養した。(A) sensorベクターのプラスミドの構造を示す。XhoIとNotIの制限酵素で切断して、2本鎖DNAを挿入した。(B) 挿入された2本鎖DNAの配列を示す。5'鎖と3'鎖をアニーリングして2本鎖DNAを作成した。(C) Dual-Glo<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega)を用いて、renillaルシフェラーゼとfireflyルシフェラーゼの比を測定した。n=3, 実験回数1回

## レンチウイルスを用いた線維芽細胞活性化の評価 とmiRNAの絞り込み

*Colla2*-GFPマウス由来の初代培養肺線維芽細胞に、レンチウイルスベクターを用いてmiR-20a, 101b, 125a, 192を過剰発現させ、*in vitro*においてTGF- $\beta$ 1による肺線維芽細胞の活性化に与える影響を評価した。miR-20aを過剰発現させた線維芽細胞(miR-20a-線維芽細胞)は、empty vectorと比較して*Acta2* mRNAの発現量が減少している傾向であったが、その他のmiRNAではcontrolと比較して差は認められなかった(図9)。この結果から、5つのmiRNAのうちmiR-20aに候補を絞り込んで、下記の実験を進めていくことにした。

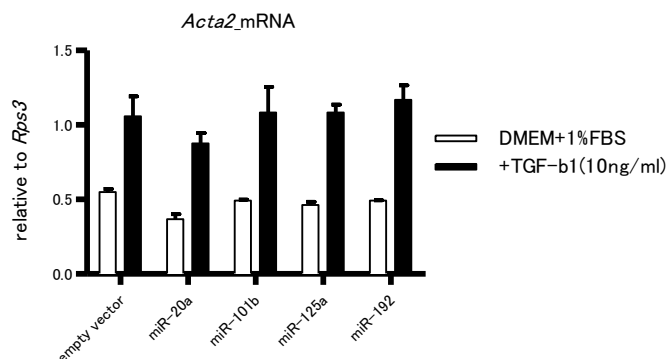


図9 レンチウイルスを用いた線維芽細胞活性化の評価 とmiRNAの絞り込み  
レンチウイルスにより遺伝子導入した*Colla2*-GFP 肺線維芽細胞を48ウェルプレートで24時間培養した。miR-20a, 101b, 125a, 146b, 192のベクターを遺伝子導入した。メディウムは1%FBS+DMEMに、TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml)を含んだものと含まないものを使用した。細胞からRNA抽出し、リアルタイムPCR法によって*Acta2*のmRNAの発現量を測定した。ハウスキーピング遺伝子とした*Rps3*に対する相対値を示す。n=3, 実験回数1回

## **Colla2-GFP 肺線維芽細胞を用いた線維芽細胞活性化の評価**

miR-20aを用いた様々な検証を行うため、レンチウイルスよりもウイルスが作成しやすいレトロウイルスベクターにウイルスベクターを変更した。

Colla2-GFPマウスから抽出した初代培養肺線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いてmiR-20aを過剰発現させた。*Acta2*のタンパク質の発現と*Colla2*のmRNAの発現の比較をするために、フローサイトメトリーによりMean fluorescent intensity (MFI)の測定を行った。mRNAの発現の比較をするために、定量的リアルタイム解析を行った。

まず、ウイルス感染96時間後の感染効率を、フローサイトメトリーを用いてレポーター遺伝子であるCD271の発現を解析することで評価した。miR-20a-線維芽細胞とempty vector-線維芽細胞いずれにおいても60%以上の感染効率を認めた(図10A)。また、CD271の発現量はmiR-20aとempty vectorの間において大きな差は見られなかった。次に、未刺激条件下におけるCD271陽性細胞の*Acta2*および*Colla2-GFP*のMFIを比較した。miR-20a導入細胞では、empty vector感染細胞と比較して*Acta2*、*Colla2-GFP*いずれも有意に減少していた(図10B, C)。

さらに、TGF- $\beta$ 1(10 ng/ml)による線維芽細胞の活性化に及ぼす影響を解析した。miR-20a導入線維芽細胞では、miR-20aの発現量はempty vectorと比較して4倍程度増加しており(図10D)、また*Acta2*のmRNAの発現量はempty vectorと比較して有意に減少していた(図10E)。これらの結果より、miR-20aの過剰発現が、未刺激時お

よびTGF- $\beta$ 1刺激時の線維芽細胞における*Acta2*と*Colla2*の発現量を減少させることを示唆された。



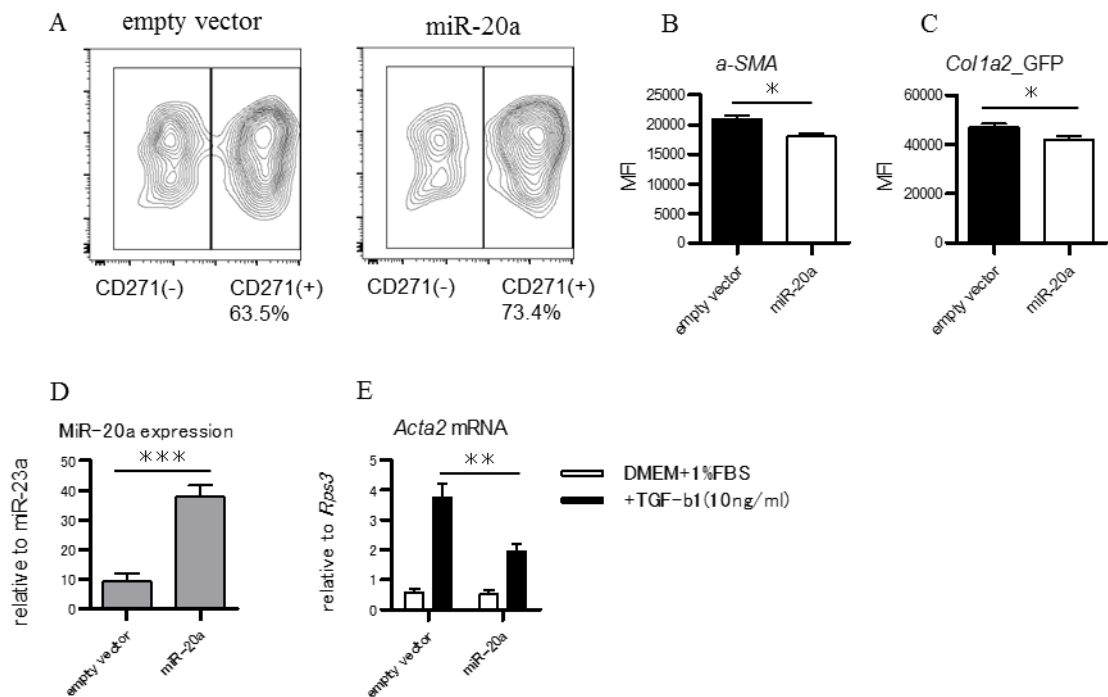


図10 *Col1a2*-GFP 肺線維芽細胞を用いた線維芽細胞活性化の評価

(A-C)レトロウイルスにより遺伝子導入した*Col1a2*-GFP 肺線維芽細胞を10%FBS+DMEMをメディウムとして、48ウェルプレートで96時間培養した。(A) フローサイトメトリーによって、CD271陽性細胞と陰性細胞を区別した解析結果を示す。(B) Intracellular stainingによってCD271陽性細胞における細胞内 $\alpha$ -SMAのMFIを測定した。n=4, 実験は3回行い、代表的なデータを示した。(C) CD271 陽性細胞の*Col1a2*-GFPのMFIを測定した。n=4

(D, E)レトロウイルスにより遺伝子導入した*Col1a2*-GFP 肺線維芽細胞を48ウェルプレートで24時間培養した。メディウムは1%FBS+DMEMに、TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml)を含んだものと含んでいないものを使用した。細胞をRNA抽出し、リアルタイムPCR法によって*Acta2*のmRNAの発現量とmiR-20aの発現量を測定した。*Acta2*の測定における内在性コントロールとして*Rps3*の発現量を用いた。の測定の場合は*Rps3*とした。miR-20aの測定における内在性コントロールとしてmiR-23aの発現量を用いたと。すべてのサンプルにおいて、遺伝子導入効率は70%以上だった。(D) miR-20a (E) *Acta2* (D, E) n=7, 統計的解析はunpaired t-tests (two-tailed)によって比較し、p値が0.05以下のものを有意差ありと判定した。実験回数3回行い、代表的なデータを示した。

*Acta2*-KO *Colla2*-GFP miceを用いた*in vitro*での肺線維芽細胞の活性化の評価

(図10E)とは別の手法で、*Acta2*の発現量を測定するために、*Acta2*-KO

*Colla2*-GFPマウスを用いた。*Acta2*-KO *Colla2*-GFPマウスから抽出した初代培養肺線維芽細胞をレトロウイルスによって遺伝子導入した。

遺伝子導入された*Acta2*-KO *Colla2*-GFPマウスの初代培養肺線維芽細胞の蛍光画像を示した(図11A-D)。TGF- $\beta$ 1で活性化された細胞は、されていない細胞と比較して、やや細胞面積が大きくなっており、*Acta2*-KOと*Colla2*-GFPの蛍光強度が強くなっていた。しかし、miR-20a-線維芽細胞とempty vector-線維芽細胞を視覚的判断で比較することは困難であったので、フローサイトメトリーを用いてそれぞれの細胞のMFIを測定することにした。

CD271の発現量はCD271陽性細胞と陰性細胞の間で十分に違いがみられた(図11E)。miR-20a-線維芽細胞は、TGF- $\beta$ 1(10 ng/ml)によって活性化された場合に、前述のリアルタイムPCRと同様に、*Acta2*-KOのMFIがempty vectorと比較して有意に減少していた。*Colla2*-GFPのMFIにおいてもempty vectorと比較して有意に減少していた(図11F, G)。この結果は、miR-20aの過剰発現により*Acta2*と*Colla2*のmRNAの発現量を減少させることが示唆された。

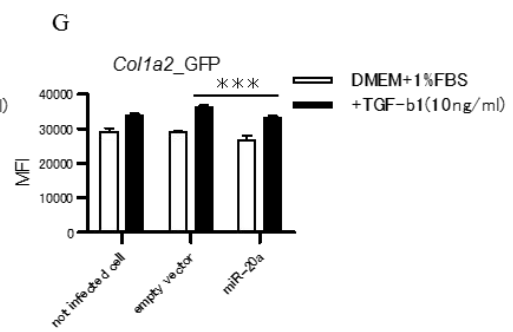
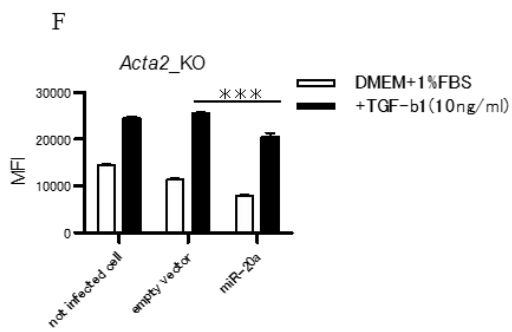
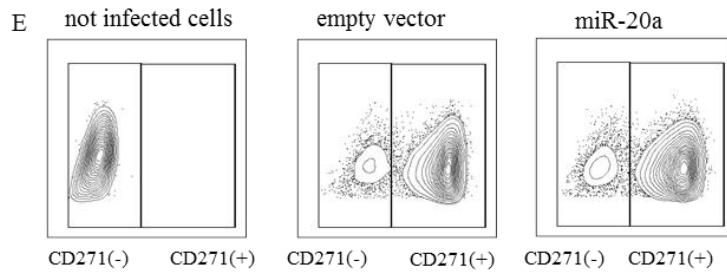
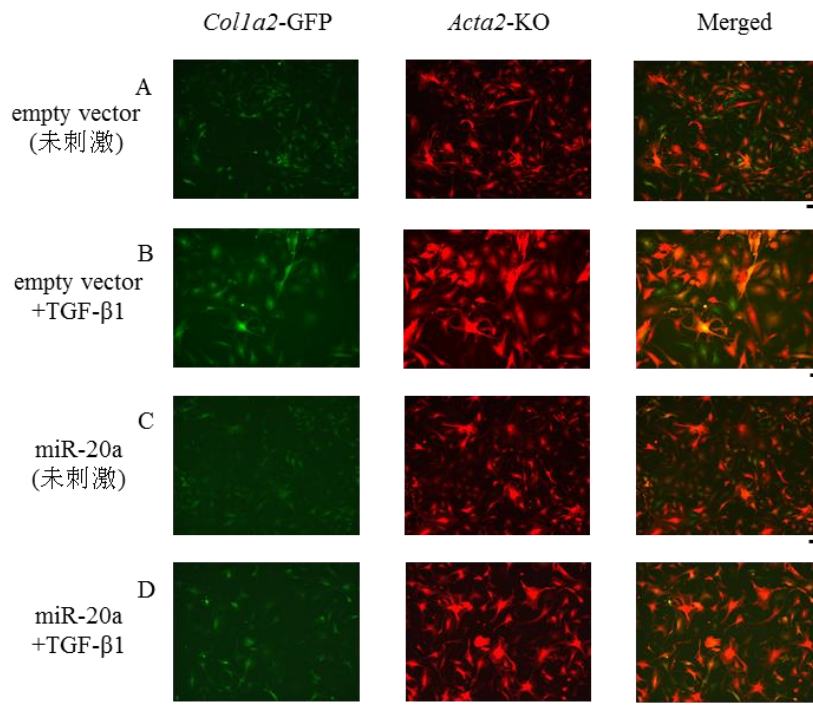


図11 *Acta2*-KO *Colla2*-GFP 肺線維芽細胞を用いた線維芽細胞活性化の評価  
(A-G)レトロウイルスにより遺伝子導入した*Acta2*-KO *Colla2*-GFP 肺線維芽細胞を48ウェルプレートで36時間培養した。メディウムは1%FBS+DMEMにTGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml)を含んだものと含んでいないものを使用した。培養後、メディウムをPBSに入れ替えて、蛍光顕微鏡で撮影した。  
その後、細胞の懸濁液をAPC anti-CD271抗体で染色して、フローサイトメトリー解析を行い、*Acta2*-KOと*Colla2*-GFPのMFIを測定した。スケールバー 100  $\mu$ m。  
(A-D) 蛍光顕微鏡の画像を示す。  
(A, B) empty vector (C, D) miR-20a  
(A, C) TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml)を含んでいないもの  
(B, D) TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml)を含んだもの  
(E) フローサイトメトリーによって、CD271陽性細胞と陰性細胞を区別した解析結果を示す。  
(F) *Acta2*-KOのMFI (G) *Colla2*-GFPのMFI  
(F, G) n=6, 実験は3回以上行い、代表的なデータを示した。

## コラーゲンゲルアッセイ

機能的な観点で線維芽細胞の活性化を評価するために、コラーゲンゲルアッセイを行い、線維芽細胞の収縮能を解析した。

コラーゲンゲルの画像を示した(図12A)。遺伝子導入効率はすべてのサンプルにおいて70%以上であり、miR-20a-線維芽細胞を培養したコラーゲンゲルは、empty vectorのコラーゲンゲルと比較して、TGF- $\beta$ 1で活性化した場合において、コラーゲンゲルの面積が増加していた(図12B)。3~5時間後から2群間のゲルの面積に差が生じ初め、7時間後に有意な差となった。これらの結果はmiR-20aの過剰発現により線維芽細胞の収縮能が低下する可能性を示唆している。

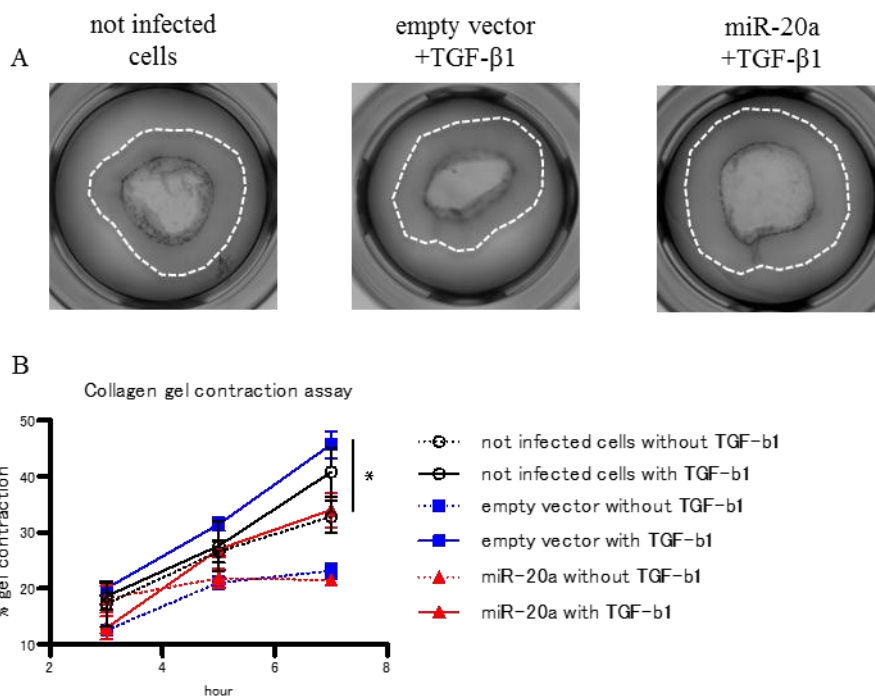


図12 コラーゲンゲル収縮アッセイ

(A-B) *Colla2*-GFP肺線維芽細胞を24時間ウイルス溶液に感染させた後、 $3 \times 10^4$  個の細胞をコラーゲンゲルに撒いた。メディアムは1% FBS+DMEMにTGF-β1 (10 ng/ml)を含んだものと含んでいないものを使用し、48 ウェルプレートで培養した。培養後にコラーゲンゲルをwellから切り離した。

(A) ゲル画像 TGF-β1を含んだメディアムで培養

(B) コラーゲンゲル収縮アッセイをグラフにまとめた。各細胞群の7時間後の%gel contractionをt-testにより比較した。

n=3, 実験は3回行い、代表的なデータを示した。

## Target遺伝子の確認

図7で予測された遺伝子が、実際にmiR-20aのtarget遺伝子となっているか検証するために、フローサイトメトリー解析とルシフェラーゼアッセイを行った。

MFIを測定することによって、miR-20aとempty vectorの*TGF-βR2*の発現量を比較した。また、ルシフェラーゼアッセイによって、miR-20aが、*TGF-βR2*の3'UTRの配列依存的に、その発現を減少させることができるかどうかを確かめた。

miR-20a-線維芽細胞では、empty vectorと比較して、*TGF-βR2*のMFIが減少していた(図13A)。また、miR-20aとmiR-20a sensorベクターが遺伝子導入されたHEK293T細胞の方が、miR-20aとmutantベクターと比較して、renilla/firefly ルシフェラーゼの比が減少していた(図13B)。

この結果は、miR-20aが、*TGF-βR2*遺伝子の3'UTRの相補的な配列依存的に、*TGF-βR2*の発現を減少させることが示唆された。

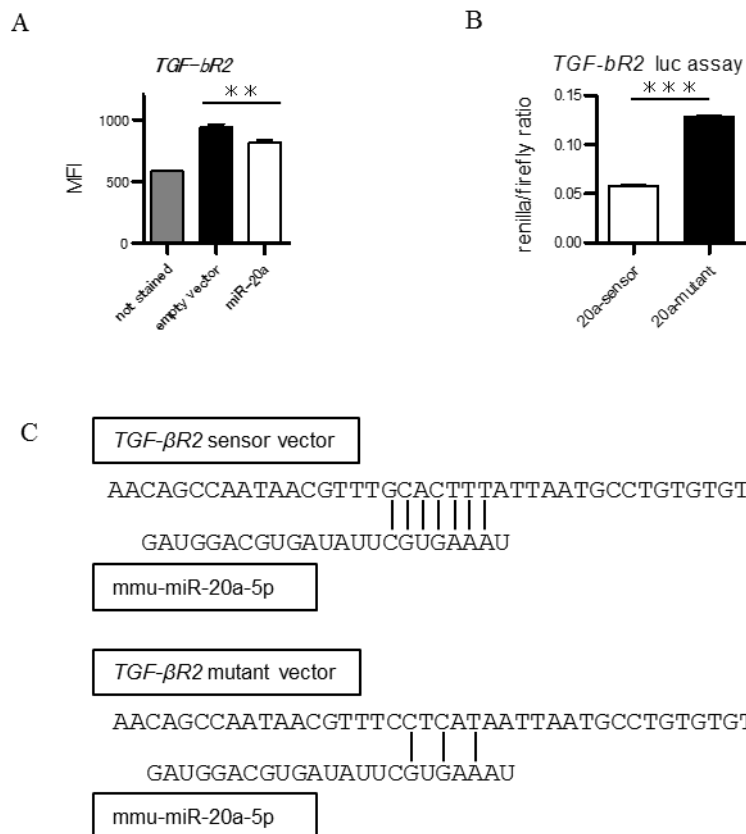


図13 Target遺伝子の確認 (A) レトロウイルスにより遺伝子導入した *Colla2*-GFP肺線維芽細胞を10%FBS+DMEMで5時間培養した。細胞懸濁液をPE anti-CD271抗体(Biolegend)とAPC anti-*TGF-βR2*抗体(R&D systems)で30分間染色し、3回洗浄後、フローサイトメトリー解析でCD271陽性細胞のAPC anti-*TGF-βR2*抗体のMFIを測定した。

(B) *TGF-βR2*のsensorベクターとmutantベクターを、psiCHECK™-2 Vector (Promega, USA) から作成した。2つのベクターのそれぞれと、miR-20aのベクターをHEK293T細胞に共トランスフェクションして24時間培養した。Dual-Glo® Reporter Assay Systemを用いて、renillaルシフェラーゼとfireflyルシフェラーゼの比を測定した。

(A, B) n=4, 実験は3回行い、代表的なデータを示した。

(C) *TGF-βR2*のsensorベクターとmutantベクターの配列を示す。



## IT-transfer モデルを用いた線維芽細胞活性化の評価

miR-20aが*in vivo*で肺線維芽細胞の活性化に与える影響を調べるために、*Colla2*-GFPマウス由来miR-20a過剰発現線維芽細胞を、野生型線維化誘導マウスに経気道的に移入するIT-transferモデルを使用した(図14A)。フローサイトメトリー解析によって、ドナー細胞をGFP陽性細胞として同定し、ウイルス感染細胞はCD271の発現により同定した。ウイルスの感染効率、IT-transferの前(図14B)、IT-transfer後(図14C)、いずれの時点においてもすべてのサンプルで96%以上だった。

回収された細胞の中のGFP陽性かつCD271陽性細胞数は、 $5\sim 8\times 10^4$ 個程度で、miR-20aとempty vectorの間で大きな差はなかった(図14D)。

経気道的投与されたマウスから回収されたmiR-20a-線維芽細胞では、*Acta2*, *Colla1*, *Colla2*, *Serpine1*のmRNAの発現量が、empty vectorと比較して有意に減少していた。一方で、*Spp1*の発現量は有意に増加していた(図14E-I)。



図14 IT-transfer モデルを用いた線維芽細胞活性化の評価 (A-F) レトロウイルスによって遺伝子導入された*Colla2*-GFP肺線維芽細胞を3日間培養した。MACSを使用してpositive selectionを行ってから、さらに10日間培養した。ブレオマイシン(1.25 mg/kg dissolved in 50  $\mu$ L of sterile saline solution)を投与されてから7日目(day7)のB6Jマウスに上記の細胞の懸濁液を経気道的投与した。1匹あたり $5 \times 10^6$ 個の細胞を移植し、これらの細胞をday10に回収した。GFP陽性とCD271陽性細胞をsortingによって回収し、それらの細胞をフローサイトメトリー解析、定量的リアルタイムPCR法に使用した。

(A) 実験のプロトコールを示した。

(B) 移植する前の細胞をフローサイトメトリー解析で遺伝子導入効率を測定した。

(C) B6Jマウスから回収された細胞をフローサイトメトリー解析で遺伝子導入効率を測定した。

(D) 回収された細胞数を示した。

(E-I) 定量的リアルタイムPCR法を用いてmRNAの発現量を測定し、線維芽細胞の活性化を評価した。ハウスキーピング遺伝子は*Rps3*とした。

(E) *Acta2* (F) *Colla1* (G) *Colla2* (H) *Serpine1* (I) *Spp1*

(E-I) empty vector: n=6, miR-20a: n=5, 実験回数1回

## IT-transfer モデルを用いたmiR20a発現線維芽細胞のトランスクリプトーム解析

遺伝子発現に対する効果を調べるために、IT-transferモデルから回収された肺線維芽細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行った。そして、miR-20a-線維芽細胞とempty vector-線維芽細胞の遺伝子発現分布を比較した。トランスクリプトーム解析の結果を示した(図15A, B)。

22824個の遺伝子の発現量を得た。低発現の遺伝子や極端なばらつきを避けるために、tag数が30以下であった遺伝子は取り除いた。miR20a 4ライブラリー、empty vector 4つのライブラリーの間で遺伝子発現量を比較する前に、各ライブラリー間で発現量を正規化し、tSNE法により外れ値を示したlibrary (miR-20a; 1ライブラリー、empty vector; 1ライブラリー)を除いた。その後、miR20aとempty vectorの間で統計的に有意に発現変動した遺伝子( $p < 0.05$ )をedgeRにより同定した。miR-20a-線維芽細胞のTag数をempty vectorのTag数で標準化した。これらの遺伝子のそれぞれのfold-changeは0.33~4.73の間に収まっており、1.5倍以上変動したものは101遺伝子であった。また、3分の2以下になったものは59遺伝子であった。

これらの遺伝子の中で、fold-changeが高かったものと低かった遺伝子を30個ずつリストアップした。その中で線維化に関連があるとされる遺伝子をピックアップし、定量的リアルタイムPCRで発現変動を確認した。*Adam12*, *Itga5*, *Ctgf* の

発現量が減少していた一方で、*Igfbp5*, *Decorin*, *Mmp3*の発現量が増加していた(図15C)。

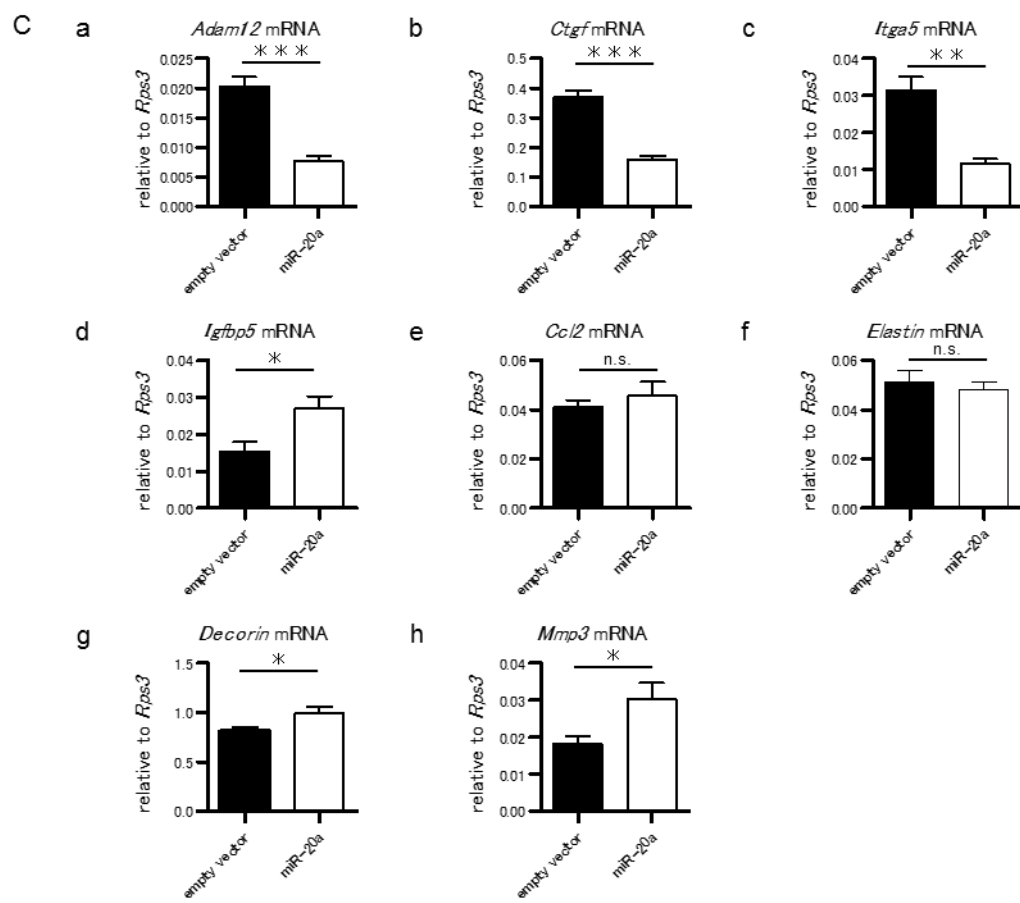
図15 IT transferモデルから回収した肺線維芽細胞のトランスクリプトーム解析の結果 (A) fold-changeが低い順に遺伝子を30個リストアップした。(B) fold-changeが高い順に遺伝子を30個リストアップした。(C) A,Bの中で線維化に関連のある遺伝子(A,Bで灰色でハイライト)の発現量を、リアルタイムPCR法によって測定した。ハウスキーピング遺伝子を*Rps3*とした。(a) *Adam12* (b) *Itga5* (c) *Ctgf* (d) *Igfbp5* (e) *Ccl2* (f) *Eln* (g) *Dcn* (h) *Mmp3*  
(a-h) empty vector: n=6, miR-20a: n=5, 実験回数1回

A

Gene Symbol	Gene Description	fold-change		
		miR-20a/ empty vector	LogCPM	P Value
<i>Tnn</i>	<i>Tenascin N</i>	0.33	4.96	< 0.001
<i>D17H6S56E-5</i>	<i>DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5</i>	0.43	5.88	< 0.001
<i>Spc24</i>	<i>Kinetochore-associated Ndc80 complex subunit SPC24</i>	0.43	4.98	< 0.001
<i>Ccnb2</i>	<i>Cyclin B2</i>	0.45	4.73	< 0.001
<i>Cenpa</i>	<i>Centromere protein A</i>	0.48	5.00	< 0.001
<i>Rian</i>	<i>RNA imprinted and accumulated in nucleus</i>	0.50	7.69	< 0.001
<i>Adam12</i>	<i>A disintegrin and metallopeptidase domain 12</i>	0.50	7.40	< 0.001
<i>Mki67</i>	<i>Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67</i>	0.51	5.23	< 0.001
<i>Tk1</i>	<i>Thymidine kinase 1</i>	0.51	5.12	< 0.001
<i>Scn1b</i>	<i>Sodium channel, voltage-gated, type I, beta</i>	0.52	5.49	< 0.001
<i>Gjb3</i>	<i>Gap junction protein, beta 3</i>	0.53	5.24	< 0.001
<i>Cdh2</i>	<i>Cadherin 2</i>	0.53	5.26	< 0.001
<i>Tspan18</i>	<i>Tetraspanin 18</i>	0.55	5.14	< 0.001
<i>Sec24d</i>	<i>Sec24 related gene family, member D</i>	0.55	6.08	< 0.001
<i>Tnks</i>	<i>Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase</i>	0.56	5.20	< 0.001
<i>Rn18s</i>	<i>18S ribosomal RNA</i>	0.56	12.51	< 0.001
<i>Rn45s</i>	<i>45S pre-ribosomal RNA</i>	0.57	12.61	< 0.001
<i>Nr1d2</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2</i>	0.57	5.42	< 0.001
<i>Itga5</i>	<i>Integrin alpha 5</i>	0.58	6.95	< 0.001
<i>Ctgf</i>	<i>Connective tissue growth factor</i>	0.58	9.66	< 0.001
<i>Acta2</i>	<i>Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>	0.58	8.97	< 0.001
<i>Top2a</i>	<i>Topoisomerase (DNA) II alpha</i>	0.58	5.48	< 0.001
<i>Sgk1</i>	<i>Serum/glucocorticoid regulated kinase 1</i>	0.59	7.59	< 0.001
<i>Rps4x</i>	<i>Ribosomal protein S4, X-linked</i>	0.61	6.30	< 0.001
<i>Stmn1</i>	<i>Stathmin 1</i>	0.61	5.18	< 0.001
<i>Sec61a1</i>	<i>Sec61 alpha 1 subunit</i>	0.61	6.12	< 0.001
<i>Ccnd1</i>	<i>Cyclin D1</i>	0.61	5.97	< 0.001
<i>Abce1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1</i>	0.61	5.09	< 0.001
<i>Aff1</i>	<i>AF4/FMR2 family, member 1</i>	0.61	6.23	< 0.001
<i>Ankrd52</i>	<i>Ankyrin repeat domain 52</i>	0.62	4.73	< 0.001

## B

Gene Symbol	Gene Description	fold-change		
		miR-20a/ empty vector	LogCPM	P Value
<i>LOC101056300</i>	<i>DNA-binding protein inhibitor ID-3</i>	4.73	4.52	<0.001
<i>LOC101056296</i>	<i>DNA-binding protein inhibitor ID-3</i>	4.51	4.44	<0.001
<i>Cfhr1</i>	<i>Complement factor H-related 1</i>	3.36	5.30	<0.001
<i>Ybx3</i>	<i>Y box protein 3</i>	3.20	5.75	<0.001
<i>Igfbp5</i>	<i>Insulin-like growth factor binding protein 5</i>	2.97	7.87	<0.001
<i>Spon2</i>	<i>Spondin 2, extracellular matrix protein</i>	2.85	4.58	<0.001
<i>Prg4</i>	<i>Proteoglycan 4</i>	2.85	5.94	<0.001
<i>Lmcd1</i>	<i>LIM and cysteine-rich domains 1</i>	2.81	4.68	<0.001
<i>Col10a1</i>	<i>Collagen, type X, alpha 1</i>	2.53	4.76	<0.001
<i>Lpl</i>	<i>Lipoprotein lipase</i>	2.47	7.20	<0.001
<i>Srp14</i>	<i>Signal recognition particle 14</i>	2.46	5.31	<0.001
<i>Ccl2</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	2.40	5.64	<0.001
<i>Cd200</i>	<i>CD200 antigen</i>	2.36	4.89	<0.001
<i>ApoE</i>	<i>Apolipoprotein E</i>	2.34	5.02	<0.001
<i>Eln</i>	<i>Elastin</i>	2.28	9.76	<0.001
<i>Serpine2</i>	<i>Serine peptidase inhibitor, clade E, member 2</i>	2.26	10.87	<0.001
<i>D430019H16Rik</i>	<i>RIKEN cDNA D430019H16 gene</i>	2.24	5.37	<0.001
<i>Dcn</i>	<i>Decorin</i>	2.20	12.77	<0.001
<i>Id3</i>	<i>Inhibitor of DNA binding 3</i>	2.17	5.10	<0.001
<i>Rgs2</i>	<i>Regulator of G-protein signaling 2</i>	2.13	6.26	<0.001
<i>Il6</i>	<i>Interleukin 6</i>	2.09	5.08	<0.001
<i>LOC105242417</i>	<i>Uncharacterized LOC105242417</i>	2.02	4.99	<0.001
<i>Rpl32</i>	<i>Ribosomal protein L32</i>	2.00	6.43	<0.001
<i>Fbln1</i>	<i>Fibulin 1</i>	1.99	4.89	<0.001
<i>Trf</i>	<i>Transferrin</i>	1.95	5.59	<0.001
<i>Adamts5</i>	<i>A disintegrin-like and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 5</i>	1.95	4.70	<0.001
<i>Olr1</i>	<i>Oxidized low density lipoprotein receptor 1</i>	1.95	6.10	<0.001
<i>Mmp3</i>	<i>Matrix metallopeptidase 3</i>	1.94	5.39	<0.001
<i>Tma7</i>	<i>Translational machinery associated 7</i>	1.92	5.67	<0.001
<i>Frzb</i>	<i>Frizzled-related protein</i>	1.91	6.10	<0.001





## 第四章 考察

肺線維症の克服に向けて、ECMの過剰な沈着をもたらす肺線維芽細胞の活性化制御機構の解明は、重要課題の一つである。miRNAによる転写後発現抑制は、1つのmiRNAが複数の標的遺伝子をもつこと、また配列の相同性に応じて抑制の強度が異なることなど、TGF- $\beta$ 1シグナルなどの分子標的療法とは異なる性質をもつ。本研究により、ブレオマイシンおよびシリカで誘導する肺線維症モデルマウスの肺から純化した線維芽細胞において、包括的miRNome解析を行い、mmu-miR-20aを含む複数のmiRNAが線維化誘導時に発現変動することを明らかにした。miR-20aは、両モデルにおいてday7という早期の段階から発現が増加していた。レトロウイルスを用いて*in vitro*において肺線維芽細胞にmiR-20aを過剰発現させると、TGF- $\beta$ 1の活性化による*Acta2*と*Colla2*の発現量の増加を抑え、また線維芽細胞の収縮能の上昇を抑えることがわかった。TGF- $\beta$ 2がmiR-20aのtarget遺伝子となることで、線維芽細胞の活性化に影響を与えていると考えられた。

また、miR-20aが、マウス生体内において肺線維芽細胞活性化に対して果たしている影響を調べるため、経気道的投与による移植モデルを使用した。経気道的投与モデルにおいても、*in vitro*と同様に*Acta2*, *Colla2*,の発現量の減少が認めら

れた。また、*Serpine1*の発現量も減少していた。*Serpine1*は、多くの細胞において線維化の成長因子、特にTGF- $\beta$ 1シグナルにより直接誘導される遺伝子として知られており[70]、このことから線維芽細胞内におけるTGF- $\beta$ パスウェイが、miR-20aによって抑えられていることが示唆された。

養子移入した細胞のトランスクリプトーム解析を行ったところ、miR-20の過剰発現により複数の遺伝子が発現変動することが明らかになり、線維化関連遺伝子の中では*Ctgf*と*Adam12*の発現量が減少していた。*Ctgf*はCCNファミリーの遺伝子であり、線維化促進性遺伝子として知られている。ブレオマイシンモデルの肺線維芽細胞において*Ctgf*の発現量が増加しており、*Ctgf*は*Colla2*のプロモーターを活性化し、肺の線維化に寄与することが報告されている [71]。*Ctgf*はTGF- $\beta$ 1シグナルにより発現誘導されること[72]、またTGF- $\beta$ 1とともに線維芽細胞の活性化を増強することが報告されており[73]、miR-20aはTGF- $\beta$ 1シグナルを抑制することで、線維芽細胞の過剰な活性化を抑制している可能性がある。皮膚や筋肉において急性組織障害によって誘導された血管周囲の*Adam12*陽性細胞が、癒痕の際のコラーゲン過剰産生細胞の前駆細胞の一部を成しており、*Adam12*をノックアウトしたマウスは線維化促進性前駆細胞の発生や間質へのコラーゲン沈着が制限されたと報告されている[74]。また、TGF $\beta$ シグナルを抑制する遺伝子として知られている*Decorin*の発現量の増加も認められた。*Decorin*は肺線

維症モデルにおいても報告があり、ブレオマイシンモデルにアデノウイルスを用いて*Decorin*を遺伝子導入すると、肺のヒドロキシプロリンの産生の増加を抑えられたと報告されている[75]。

*Acta2*、コラーゲン、*Ctgf*、*Adam12*、*Decorin*の遺伝子の変動から、miR-20aは線維化形成に抑制的に働くと考えられたが、一方で、*Spp1*や*Mmp3*などの線維芽細胞がTGFβ1によって活性化した場合に増加するいくつかの遺伝子の発現の増加も認められ、線維芽細胞の遊走を活性化させる可能性が示唆された。

以上から、miR-20aは、TGF-β1のシグナルを一概に抑えるのではなく、線維芽細胞の活性化を変化させる作用があると考えられた。

miR-20aは、癌細胞[76]、内皮細胞[77]、間質細胞、脂肪細胞[78]において*TGF-βR2*をtargetとすることでTGFβシグナルを抑える報告がされているが、線維芽細胞においては報告されたことはない。ヒトのIPFの肺組織とブレオマイシン誘導マウスの肺組織においてday28という後期の段階で、miR-20aの発現が減少することが報告されている[46]が、線維芽細胞のみに注目すると、ブレオマイシン誘導モデルの早期の段階でmiR-20aの発現が増加していた。

肺線維症モデルでは、マクロファージ、上皮細胞、線維芽細胞など様々な細胞が複数の役割を担っている。例えば、マクロファージは炎症性サイトカインの産生などを通じて炎症を増幅するとともに、死細胞やECMの除去などを通じ

て炎症、線維化の終息にも重要な役割を担うなど、線維化の過程は複雑である。今回の実験は、肺線維症におけるECMの主要な産生細胞である肺線維芽細胞とmiRNAの関連を、*Colla2*-GFPレポーターシステムとIT-transferを用いて特異的に解析したという点で、新規と言える。

トランスクリプトーム解析においてfold-changeが5倍以上または5分の1以下のように大きく変動した遺伝子はなかった。その理由として、miRNAはmRNAの3'UTRに対する相補的な配列を7~8塩基しか有していない場合が多く、shRNAやsiRNAと比較して遺伝子発現の抑制効果が小さいためだと考えられる。

また、IT-transferのモデルで、*Spp1*や*Mmp3*の発現が増加していたのは、これらの遺伝子がPDGF、TNF- $\alpha$ 、FGFシグナルなど、TGF- $\beta$ 1シグナル以外の経路で活性化されていること、またTGF- $\beta$ 2以外にmiR-20aのtarget遺伝子が存在しているためと思われた。しかし、今回の実験ではTGF- $\beta$ 2以外のtarget遺伝子は特定できなかった。トランスクリプトーム解析において、fold changeが大きく変動した遺伝子がなく、クラスター解析やパスウェイ解析ができなかったため、トランスクリプトーム解析から、miR-20aが抑えているシグナルの推測もできなかった。

しかし、miR-20aを過剰発現させた肺線維芽細胞において、コラーゲンなど呼吸不全の一因になっている遺伝子の発現量が減少していた。ブレオマイシンモデルでは、数週間で線維化が改善するが、その一因をmiR-20aが担っていると考

えられ、線維化が発症したときのnegative feedbackとしての役割を果たしていることが示唆された。

IT-transfer モデルにおいて、miR-20a-線維芽細胞では、empty vector-線維芽細胞と比較して、*Acta2*の発現量が3分の1程度、*colla1*・*colla2*の発現量が2分の1程度まで低下していた。ブレオマイシンモデルの肺線維芽細胞においても、ウイルスを用いてmiR-20aを過剰発現させた線維芽細胞においても、miR-20aの発現量の増加は同程度であったので、肺線維症モデルの線維化に対して、miR-20aは、IT-transferモデルの結果と同程度関わっているのではないかと考えられる。

今回マウス線維症モデルを用いて、線維化という病態が起こる過程において、miRNAが線維芽細胞の活性化に果たす役割を示せた。本知見のヒトへの外挿性は今後の検討課題であるが、mmu-miR-20a-5pとhsa-miR-20a-5pは同じ配列で、mmu-miR-20a-3pとhsa-miR-20a-3pは1塩基以外同じ配列である。今回線維化に関係があるのではないかと推測した*TGF-β2*や*Hif1α*はヒトにおいてもmiR-20a-5pのtargetとなっている。また、IPFと肺線維症モデルマウスでは、病因・線維化の経過が異なるが、TGF-β1が肺線維芽細胞を活性化させることは共通である。よって、今回得られた知見は、種を越えてヒトのIPFの線維芽細胞でも成り立つ可能性が高いと思われる。マウスモデルとIPFの違いとして、マウスモデルは線維化が可逆的であるが、IPFは不可逆的であるという点がある。ヒトIPFの線維芽細

胞では、miR-20aを含めたmiR-19-92クラスターの発現量が減少しており、クラスターを過剰発現させると、*in vitro*において線維芽細胞の活性化を抑えられたという報告があり[46]、マウスモデルのようにmiR-20aの発現量が上昇すれば、IPFも可逆的になる可能性がある。miR-20aを含めたmiR-19-92クラスターは転写因子c-MYCによる発現制御を受けることが報告されているが[79]、IPF患者の肺組織ならびに線維芽細胞では、c-MYC非依存的、メチル化感受性の発現制御も示唆されている[46]。線維芽細胞特異的なmiR-20aの発現制御機構の解明が、新たな治療標的の同定につながるかもしれない。近年、ヒト疾患研究では、本研究で行ったようなシングルセルレベルでの解析とは全く逆に、ゲノム全体を巨視的に見渡す「ゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study: GWAS）」が精力的に行われている。今後、ヒト肺線維症とmiRNAの関連についても同様のアプローチで治療標的の研究が進展すると予想されるが、本研究で用いたIT-transferの手法は、このような解析の中から得られた分子の機能を生体内で検証する上で極めて有用なアプローチと考えられる。

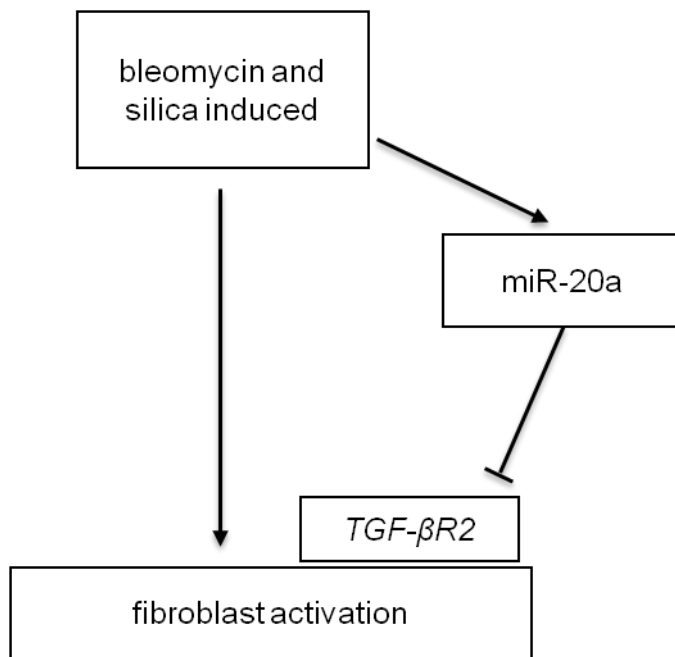


図14

- miR-20aは肺線維芽細胞の活性化を調節する。
- miR-20aは肺線維症モデルにおいてネガティブフィードバックとしての役割を果たす。

## 引用文献

1. American Thoracic Society/European Respiratory Society International  
Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial  
Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the  
European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors,  
June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit  
Care Med.* 165:277-304 (2002).
2. King TE Jr, Pardo A, Selman M: Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*,  
378:1949-1961 (2011).
3. Wolters PJ, Collard HR, Jones KD: Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis.  
*Annu Rev Pathol*, 9:157-179 (2014).
4. Noble PW, Barkauskas CE, Jiang D: Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators.  
*J Clin Invest*, 122:2756-2762 (2012).
5. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, Fingerlin TE,  
Zhang W, Gudmundsson G, Groshong SD, Evans CM, Garantziotis S, Adler KB,  
Dickey BF, du Bois RM, Yang IV, Herron A, Kervitsky D, Talbert JL, Markin C,  
Park J, Crews AL, Slifer SH, Auerbach S, Roy MG, Lin J, Hennessy CE, Schwarz  
MI, Schwartz DA: A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary



- fibrosis. *N Engl J Med*, 364:1503-1512 (2011).
6. Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, MacNee W, Thomeer M, Wallaert B, Laurent F, Nicholson AG, Verbeken EK, Verschakelen J, Flower CD, Capron F, Petruzzelli S, De Vuyst P, van den Bosch JM, Rodriguez-Becerra E, Corvasce G, Lankhorst I, Sardina M, Montanari M: High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 353: 2229-2242 (2005).
  7. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Raghu G, Anstrom KJ, King TE Jr, Lasky JA, Martinez FJ: Prednisone, azathioprine, and Nacetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 366:1968-1977 (2012).
  8. Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, Ogura T, Azuma A, Suga M, Taguchi Y, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Takeuchi M, Raghu G, Kudoh S, Nukiwa T; Pirfenidone Clinical Study Group in Japan: Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 35:821-829 (2010).
  9. Richeldi, L., du Bois, R.M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K.K., Costabel, U., Cottin, V., Flaherty, K.R., Hansell, D.M., Inoue, Y., Kim, D.S., Kolb, M., Nicholson, A.G., Noble, P.W., Selman, M., Taniguchi, H., Brun, M., Le Maulf, F., Girard, M., Stowasser, S., Schlenker-Hecege, R., Disse, B. & Collard, H.R.

- Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 370, 2071-2082 (2014).
10. Thabut G, Christie JD, Ravaud P, Castier Y, Dauriat G, Jebrak G, Fournier M, Lesèche G, Porcher R, Mal H: Survival after bilateral versus single-lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*, 151:767-774 (2009).
  11. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG: Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci, U S A* 100:8407-8411 (2003).
  12. Germano D, Blyszczuk P, Valaperti A, Kania G, Dirnhofer S, Landmesser U, Lüscher TF, Hunziker L, Zulewski H, Eriksson U: Prominin-1/CD133+ lung epithelial progenitors protect from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 179:939-949 (2009).
  13. Wang D, Morales JE, Calame DG, Alcorn JL, Wetsel RA: Transplantation of human embryonic stem cell-derived alveolar epithelial type II cells abrogates acute lung injury in mice. *Mol Ther*, 18:625-634 (2010).
  14. Lawson WE, Crossno PF, Polosukhin VV, Roldan J, Cheng DS, Lane KB,

- Blackwell TR, Xu C, Markin C, Ware LB, Miller GG, Loyd JE, Blackwell TS:  
Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF:  
association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294:1119-1126 (2008).
15. Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, Lang G, Fink L, Bohle RM, Seeger W, Weaver TE, Guenther A: Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 178:838-846 (2008).
16. Selman M, Pardo A: Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Natl Acad Sci, U S A*, 3:364-372 (2006).
17. Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA: Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med*, 14:429-440 (2008).
18. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, Uhal BD: Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol*, 277:1158-1164 (1999).
19. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, Uhal BD: Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by

- activated myofibroblasts. *Faseb J*, 19:854-856 (2005).
20. Keane MP, Strieter RM, Lynch JP 3rd, Belperio JA: Inflammation and angiogenesis in fibrotic lung disease. *Semin Respir Crit Med*, 27:589-599 (2006).
  21. Wynn TA: Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214:199-210 (2008).
  22. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G: The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 170:1807-1816 (2007).
  23. Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH: Bone marrow derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, 113:243-252 (2004).
  24. Yokota T, Kawakami Y, Nagai Y, Ma JX, Tsai JY, Kincade PW, Sato S: Bone marrow lacks a transplantable progenitor for smooth muscle type alpha-actin-expressing cells. *Stem Cells*, 24:13-22 (2006).
  25. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z: Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor- $\beta$ 1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 166:1321-1332 (2005).
  26. Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW, Hogan BL: Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without

- evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:1475-1483 (2011).
27. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badylak, S., Buhring, H.J., Giacobino, J.P., Lazzari, L., Huard, J. & Peault, B. A. perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301-313 (2008).
28. Hung, C., Linn, G., Chow, Y.H., Kobayashi, A., Mittelsteadt, K., Altemeier, W.A., Gharib, S.A., Schnapp, L.M. & Duffield, J.S. Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 188, 820-830 (2013).
29. Tsukui T, Ueha S, Shichino S, Inagaki Y, Matsushima K: Intratracheal Cell Transfer Demonstrates the Profibrotic Potential of Resident Fibroblasts in Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol*, 185: 2939-2948 (2015).
30. Ha M, Kim VN: Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15:509-524 (2014).
31. Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136:215-233 (2009).

32. Krol J, Loedige I, Filipowicz W: The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11:597-610 (2010).
33. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19:92-105 (2009).
34. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S: MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 20:460-469 (2014).
35. Tutar Y, Özgür A, Tutar E, Tutar L, Pulliero A, Izzotti A: Regulation of oncogenic genes by MicroRNAs and pseudogenes in human lung cancer. *Biomed Pharmacother* 83:1182-1190 (2016).
36. Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME: The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*, 17:19-36 (2010).
37. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC: Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 3:189-198 (2006).
38. Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Croce CM, Harris CC: MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A* 106:12085-12090 (2009).
39. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM: MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15805-15810 (2007).
40. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M: Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*, 492:376-381 (2012).
41. Sanuki R, Onishi A, Koike C, Muramatsu R, Watanabe S, Muranishi Y, Irie S, Uneo S, Koyasu T, Matsui R, Chérasse Y, Urade Y, Watanabe D, Kondo M, Yamashita T, Furukawa T: MiR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat. Neurosci*, 14:1125-1134 (2011).
42. Buckland J: Biomarkers: MicroRNAs under the spotlight in inflammatory arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 6:436 (2010).
43. Yamada M, Kubo H, Ota C, Takahashi T, Tando Y, Suzuki T, Fujino N, Makiguchi T, Takagi K, Suzuki T, Ichinose M: The increase of microRNA-21

- during lung fibrosis and its contribution to epithelial–mesenchymal transition in pulmonary epithelial cells. *Respir. Res*, 14:95 (2013).
44. Xiao J, Meng XM, Huang XR, Chung AC, Feng YL, Hui DS, Yu CM, Sung JJ, Lan HY: MiR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Mol. Ther*, 20:1251-1260 (2012).
45. Yang S, Cui H, Xie N, Icyuz M, Banerjee S, Antony VB, Abraham E, Thannickal VJ, Liu G. miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis. *FASEB J*, 27:2382-2391 (2013).
46. Mikhail A, Hitchcock CL, Wright VP, Nana-Sinkam SP, Piper MG, Marsh CB: Epigenetic regulation of miR-17~92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 187:397-405 (2013).
47. Pandit KV, Corcoran D, Yousef H, Yarlagadda M, Tzouveleki A, Gibson KF, Konishi K, Yousem SA, Singh M, Handley D, Richards T, Selman M, Watkins SC, Pardo A, Ben-Yehudah A, Bouros D, Eickelberg O, Ray P, Benos PV, Kaminski N: Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 182:220-229 (2010).
48. Liang H, Gu Y, Li T, Zhang Y, Huangfu L, Hu M, Zhao D, Chen Y, Liu S, Dong Y, Li X, Lu Y, Yang B, Shan H: Integrated analyses identify the involvement of



- microRNA-26a in epithelial-mesenchymal transition during idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Death Dis*, 5:e1238 (2014).
49. Liang H, Xu C, Pan Z, Zhang Y, Xu Z, Chen Y, Li T, Li X, Liu Y, Huangfu L, Lu Y, Zhang Z, Yang B, Gitau S, Lu Y, Shan H, Du Z: The antifibrotic effects and mechanisms of microRNA-26a action in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol. Ther*, 22:1122-1133 (2014).
50. Milosevic J, Pandit K, Magister M, Rabinovich E, Ellwanger DC, Yu G, Vuga LJ, Weksler B, Benos PV, Gibson KF, McMillan M, Kahn M, Kaminski N: Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 47:879-887 (2012).
51. Fukunaga S, Kakehashi A, Sumida K, Kushida M, Asano H, Gi M, Wanibuchi H: Integrative analyses of miRNA and proteomics identify potential biological pathways associated with onset of pulmonary fibrosis in the bleomycin rat model. *Toxicol Appl Pharmacol*, 286:188-197 (2015).
52. Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Ikeda K, Adachi E, Bou-Gharios G, Okazaki I, Inagaki Y: Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology*, 137:1459-1466 (2009).

53. Lakatos HF, Burgess HA, Thatcher TH, Redonnet MR, Hernady E, Williams JP, Sime PJ: Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation. *Exp Lung Res*, 32:181-199 (2006).
54. Tsukui T, Ueha S, Abe J, Hashimoto S, Shichino S, Shimaoka T, Shand FH, Arakawa Y, Oshima K, Hattori M, Inagaki Y, Tomura M, Matsushima K: Qualitative rather than quantitative changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 183:758-773 (2013).
55. Shichino S, Abe J, Ueha S, Otsuji M, Tsukui T, Kosugi-Kanaya M, Shand FH, Hashimoto S, Suzuki HI, Morikawa T, Inagaki Y, Matsushima K: Reduced Supply of Monocyte-Derived Macrophages Leads to a Transition from Nodular to Diffuse Lesions and Tissue Cell Activation in Silica-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Am J Pathol*, 185:2923-2938 (2015).
56. Igarashi T, Miyake K, Kato K, Watanabe A, Ishizaki M, Ohara K, Shimada T: Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. *Gene Ther*, 10: 219-226 (2003).
57. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W,

- Selbach M: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473:337-342 (2011).
58. Seo HS, Serra R: Deletion of Tgfb2 in Prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints. *Dev. Biol.*, 310:304-316 (2007).
59. Koli KM, Arteaga CL: Processing of the transforming growth factor beta type I and II receptors. Biosynthesis and ligand-induced regulation. *J Biol Chem*, 272:6423-6427 (1997).
60. Wells RG, Yankelev H, Lin HY, Lodish HF: Biosynthesis of the type I and type II TGF-beta receptors. Implications for complex formation. *J Biol Chem*, 272:11444-11451 (1997).
61. Jiang W, Tillekeratne MPM, Brattain MG, Banerji SS: Decreased Stability of Transforming Growth Factor beta Type II Receptor mRNA in RER+ Human Colon Carcinoma Cells. *Biochemistry*, 36:14786-14793 (1997).
62. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 30:2114-2120 (2014).
63. Schmieder R, Edwards R: Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27:863-864 (2011).

64. Langmead B, Salzberg S: Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9:357-359 (2012)
65. Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K: TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics*, 14:219 (2013).
66. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK: Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res*, 40:4288-4297 (2012)
67. Kottmann RM, Kulkarni AA, Smolnycki KA, Lyda E, Dahanayake T, Salibi R, Honnons S, Jones C, Isern NG, Hu JZ, Nathan SD, Grant G, Phipps RP, Sime PJ: Lactic acid is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and induces myofibroblast differentiation via pH-dependent activation of transforming growth factor-beta. *Am J Respir Crit Care Med*, 186:740-751 (2012).
68. Kaneko M, minematsu T, Yoshida M, Nishijima Y, Noguchi H, Ohta Y, Nakagami G, Mori T, Sanada H: Compression-induced HIF-1 enhances thrombosis and *PAI-1* expression in mouse skin. *Wound Repair Regen*, 23:657-663 (2015).
69. Wygrecka M, Zakrzewicz D, Taborski B, Didiasova M, Kwapiszewska G, Preissner KT, Markart P: TGF- $\beta$ 1 induces tissue factor expression in human lung

- fibroblasts in a PI3K/JNK/Akt-dependent and AP-1-dependent manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 5:614-627 (2012).
70. Samarakoon R, Higgins PJ: Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost*, 100:976-983 (2008).
71. Ponticos M, Holmes AM, Shi-wen X, Leoni P, Khan K, Rajkumar VS, Hoyles RK, Bou-Gharios G, Black CM, Denton CP, Abraham DJ, Leask A, Lindahl GE: Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. *Arthritis Rheum*, 7:2142-2155 (2009).
72. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N: A novel transforming growth factor  $\beta$  response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ*, 7:469-480 (1996).
73. Shi-wen X, Stanton LA, Kennedy L, Pala D, Chen Y, Howat SL, Renzoni EA, Carter DE, Bou-Gharios G, Stratton RJ, Pearson JD, Beier F, Lyons KM, Black CM, Abraham DJ, Leask A: CCN2 is necessary for adhesive responses to transforming growth factor- $\beta$ 1 in embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 281:10715-10726 (2006).
74. Dulauroy S, Di Carlo SE, Langa F, Eberl G, Peduto L: Lineage tracing and genetic

- ablation of *ADAM12*(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nat Med*, 8:1262-1270 (2012).
75. Kolb M, Margetts PJ, Galt T, Sime PJ, Xing Z, Schmidt M, Gauldie J: Transient Transgene Expression of *Decorin* in the Lung Reduces the Fibrotic Response to Bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med*, 163:770-777 (2001).
76. Jing C, Ma G, Li X, Wu X, Huang F, Liu K, Liu Z: MicroRNA-17/20a impedes migration and invasion via TGF- $\beta$ /ITGB6 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res*, 6:1549-1562 (2016).
77. Correia AC, Moonen JR, Brinker MG, Krenning G: FGF2 inhibits endothelial-mesenchymal transition through microRNA-20a-mediated repression of canonical TGF- $\beta$  signaling. *J Cell Sci*, 129:569-579 (2016).
78. Zhou J, Guo F, Wang G, Wang J, Zheng F, Guan X, Chang A, Zhang X, Dai C, Li S, Li X, Wang B: miR-20a regulates adipocyte differentiation by targeting lysine-specific demethylase 6b and transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Int J Obes (Lond)*, 39:1282-1291 (2015).
79. Dews M, Fox JL, Hultine S, Sundaram P, Wang W, Liu YY, Furth E, Enders GH, El-Deiry W, Schelter JM, Cleary MA, Thomas-Tikhonenko A: The Myc-miR-17~92 axis blunts TGF- $\beta$  signaling and production of multiple TGF- $\beta$ -dependent

antiangiogenic factors. *Cancer Res.* 70:8233-8246 (2010).

## 謝辞

本研究の遂行を御支援、御指導していただきました指導教官である東京大学大学院医学系研究科内科学専攻器官病態内科学講座 呼吸器内科学 長瀬隆英教授に深く感謝致します。

本研究全般に渡り、御指導及び御協力いただきました東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室 松島綱治 教授、上羽悟史 講師、研究室のメンバーに感謝申し上げます。

また、*Colla2-GFP*マウスを提供してくださった東海大学医学部 稲垣豊 教授、miRNAベクターの作成に関して御指導くださったMassachusetts Institute of Technologyの鈴木洋 博士に感謝申し上げます。