

論文の内容の要旨

論文題目 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

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。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。罹患率は年々上昇しており、全世界で 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。IPF の病因は解明されていないが、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と考えられている。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おり、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力な 1 つのアプローチである。

miRNAはヒトのタンパク質に翻訳される遺伝子の60%以上を標的としており、神経変性疾患、心血管疾患、炎症性疾患など多くの疾患に関わっていると報告されている。肺線維症マウスモデルやIPFにおいても、miRNAとの関連がいくつか報告されている。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、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報告されている。

しかし、これらの報告の多くのサンプルは肺組織由来であり、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おり、線維芽細胞に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を使用されており、肺線維症モデルにおいて変動するmiRNAは多数なため、線維化に関わっているmiRNAを同定するのは困難である。

よって、私たちはブレオマイシンとシリカ誘導マウスモデルの2つのモデルを使用し、両者において発現が増加または低下したmiRNAをリストアップした。また、肺線維芽細胞において変化するmiRNAを調べるため、Collagen I(α 2-green fluorescent protein (GFP)レポーターマウスを使用して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。

まず、Colla2-GFPマウスにブレオマイシン、シリカ粒子を経気道的に投与して肺線維症モデルを作成した。マウスの肺組織からLineage陰性、GFP陽性の線維芽細胞をcell sortingによって単離し、miRNome解析を行った。miRNome解析において、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上昇または低下したmiRNAを線維化に関係のあるものと考えた。両者のモ

デルのday7の発現量が、未治療群と比較して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の発現量が未治療群と比較して半分以下となっていたmiRNAは8個であった。それらのmiRNAの中からmiRNAの候補を絞るために、*in silico*解析を行って、miRNAのtarget遺伝子を検索した。*TGF-βR2*, *Hif1α*がmiR-20aのtarget遺伝子として予測され、*Fos*がmiR-101bのtarget遺伝子として予測された。このことから、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。そして、day7~28にわたって最も安定して高発現していたmiR-378cを選択した。また、発現が低下していたmiRNAの中で、未治療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。

各miRNAのプラスミドベクターを作製し、ルシフェラーゼアッセイによってmiR-20a, 101b, 125a, 192のプラスミドベクターのmiRNAの発現を確認できた。*Colla2*-GFPマウス由来の初代培養肺線維芽細胞に、miR-20a, 101b, 125a, 192のレンチウイルスベクターを遺伝子導入し、*in vitro*においてTGF-β1(10 ng/ml)による線維芽細胞の活性化を評価した。miR-20a導入線維芽細胞(miR-20a-線維芽細胞)が、empty vectorと比較して*Acta2*のmRNAの発現量が低下していた。この結果から、5種類のmiRNAのうちmiR-20aに候補を絞り込んで、以降の実験を進めていくことにした。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。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。次に、TGF-β1(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、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。また、別の手法で、*Acta2*の発現量を測定するために、*Acta2*-KO(Kusabira Orange) *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。miR-20a-線維芽細胞は、TGF-β1によって活性化された場合に、*Acta2*-KOのMFIがempty vectorと比較して有意に低下していた。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使用し、線維芽細胞の収縮能を測定した。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-β1で活性化した場合において、コラーゲンゲルの面積が上昇していた。このことから、miR-20aは線維芽細胞の収縮能を低下させる作用もあることが示唆された。

*in silico*解析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。miR-20a-線維芽細胞では、empty vectorと比較して、*TGF-βR2*抗体のMFIが低下していた。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低下していた。このことから、miR-20aが、*TGF-βR2*遺伝子の3'UTRに結合することで、*TGF-βR2*の発現を低下させることが示唆された。

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。*Colla2*-GFPマウス由来の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、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。最終的に遺伝子導入効率95%以上の線維芽細胞を移植した。ブレオマイシン(50 μ 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、線維芽細胞の懸濁液を気管内投与した。5 \times 10⁶個の細胞を50 μ 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)に回収した。GFP陽性かつCD271陽性細胞をcell sortingによって単離し、それらの細胞をフローサイトメトリー、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。気管内投与されたマウスから回収されたmiR-20a導入線維芽細胞では、*Acta2*, *Colla1*, *Colla2*, *Serpine1*のmRNAの発現量が、empty vectorと比較して有意に低下していた。一方で、*Spp1*の発現量は有意に上昇していた。遺伝子発現に対する効果を調べるために、トランスクリプトーム解析を行って、miR-20a-線維芽細胞とempty vector-線維芽細胞を比較した。22,824個の遺伝子の発現量を得ることができ、tag数が30以下であった遺伝子とp値が0.05以上の遺伝子を取り除いた。2つのライブラリーの間で遺伝子発現量を比較する前に、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で発現量を測定した。*Adam12*, *Itga5*, *Ctgf*の発現量が低下していた一方で、*Igfbp5*, *Decorin*, *Mmp3*の発現量が上昇していた。

*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*の発現量が上昇しており、*Ctgf*は*Colla2*のプロモーターを活性化し、肺の線維化に寄与していたという報告がある。また、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になっていた。*Adam12*をノックアウトしたマウスは線維化促進性の細胞の発生や間質へのコラーゲン沈着が制限されたという報告がある。*Decorin*はTGF β シグナルを抑制する遺伝子として知られており、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いう報告がある。

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活性化した場合において増加するいくつかの遺伝子の発現の増加も認められた。よって、miR-20aは、TGF- β 1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。

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

してしまうが、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。

IPF の線維芽細胞では miR-20a の発現が低下していたという報告があり、miR-20a の発現の低下が線維化の悪化につながっている可能性も考えられる。

miR-20a は miR-17-92 クラスターに存在しており、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、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。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。