

論文の内容の要旨

論文題目 マスト細胞の脱顆粒を制御する miRNA の同定と機能解析
(Identification and analysis of miRNAs which regulate
degranulation activity in mast cells)

氏 名 山 田 陽 史

マスト細胞は骨髄由来の細胞であり、皮膚や粘膜などの末梢組織で分化して細胞質に多数の顆粒を有する特徴的な構造を持つ。各種刺激により活性化され、脱顆粒に伴う化学伝達物質の遊離などを通じ、即時型アレルギー反応のエフェクター細胞として機能する。脱顆粒の代表的な刺激の一つに IgE を介した抗原抗体反応があげられる。マスト細胞表面には IgE と高い親和性を有する受容体 $Fc\epsilon RI$ が発現しており、IgE 抗体に抗原が結合して架橋され $Fc\epsilon RI$ の凝集が起これば、ヒスタミンなどの脱顆粒反応が惹起される。その他、化学的刺激など IgE 非依存的にマスト細胞を活性化させる経路もある。

マイクロ RNA (miRNA) とは約 21 塩基長からなる非翻訳機能性 RNA の一種で、mRNA の翻訳抑制や分解を引き起こすことで様々な遺伝子発現の制御に関わっていることが明らか

かになっている。現在、細胞増殖、幹細胞維持、細胞分化、細胞死など、多様な生物学的プロセスに関与する miRNA が同定されており、その発現異常が癌などの疾患発症に関与することも明らかにされつつある。マスト細胞と miRNA との関連に関しては、特に骨髄中の造血幹細胞からの分化系譜決定に関与する miRNA は知られているが、脱顆粒反応に注目した研究は少ない。マスト細胞の脱顆粒反応に関与する miRNA を同定することは、アレルギー疾患に対する新規創薬標的を見出すことにもつながると考えられる。

本研究では、まずマスト細胞の脱顆粒反応に miRNA 機構が関与しているか知見を得る目的で、miRNA の生合成に関与する Dicer の発現を siRNA で抑制して miRNA 全体の発現が抑制された状態のマスト細胞における脱顆粒反応の影響を検証した。マスト細胞としては、LAD2 というヒトマスト細胞株を用いた。LAD2 は SCF 存在下で増殖し、IgE 非依存的だけでなく IgE 依存的にも脱顆粒が起こり、本来のマスト細胞の機能を保持している点で、HMC-1 など他のヒトマスト細胞株とは異なる特徴を有する。LAD2 の脱顆粒反応は抗 IgE 抗体で刺激することで惹起させ、培地中に放出される β -hexosaminidase 量を測定して細胞中に含まれる全 β -hexosaminidase に対する割合を算出することで脱顆粒反応の程度を評価した。その結果、Dicer siRNA を導入した LAD2 では抗 IgE 抗体刺激により脱顆粒反応が低下した。これは miRNA 生合成阻害により総 miRNA 量が減少したことで脱顆粒反応が低下したことを示唆しており、miRNA 自体は本来、脱顆粒反応を促進させる方向に関与していると考えられた。

そこで、脱顆粒反応に関与する特定の miRNA を同定するため、LAD2 で発現する低分子 RNA ライブラリーを作成して miRNA のクローニング個数を調べた。miR-142-3p が最も多くクローニングされ、発現が高い miRNA であると考えられた。またクローニングと平行して、個別の miRNA を LAD2 に過剰発現させて脱顆粒具合を測定する機能スクリーニングも実施した。既知の 319 種の miRNA について、siRNA と類似の構造を有する miRNA mimic 分子をそれぞれ LAD2 に導入して過剰発現状態にし、脱顆粒反応の程度を

評価した。種々の miRNA のうち、miR-142-3p mimic を導入した LAD2 において抗 IgE 抗体刺激による脱顆粒促進が最も顕著であった。また、その脱顆粒促進は miR-142-3p mimic の導入濃度依存的に生じた。逆に miR-142-3p に対するアンチセンスを LAD2 に導入して内在性の miR-142-3p を阻害すると、抗 IgE 抗体刺激で脱顆粒が低下し、この効果も導入アンチセンス濃度に依存した。一般的にマスト細胞の脱顆粒反応において、Fc ϵ RI の活性化により細胞内カルシウム濃度が上昇することが知られている。そこで miR-142-3p mimic を導入して過剰発現させた LAD2、およびアンチセンスで miR-142-3p 発現を阻害した LAD2 それぞれにおいて、抗 IgE 抗体刺激後の細胞内カルシウム量変動を測定して miR-142-3p による影響を検証した。その結果、miR-142-3p を過剰発現させた LAD2 では刺激後の細胞内カルシウム量上昇がコントロール群に比べてより促進され、逆に miR-142-3p を阻害した LAD2 では刺激後の細胞内カルシウム量上昇がコントロール群に比べて減少した。この結果は β -hexosaminidase 測定による脱顆粒反応の結果とも一致する。これらの結果より miR-142-3p は本来、LAD2 の脱顆粒反応を促進させる方向に制御していることが示唆された。miR-142-3p が LAD2 で高発現している miRNA であることから、Dicer siRNA が導入された LAD2 での脱顆粒反応の低下は、主に miR-142-3p 減少が原因であることが推察された。そこで、Dicer siRNA 導入して miRNA 全体の発現量が低下した LAD2 に miR-142-3p を過剰発現することで脱顆粒反応の低下がレスキューできるかを検証した。Dicer siRNA と miR-142-3p mimic の両者を導入した LAD2 では抗 IgE 抗体刺激により脱顆粒具合が回復した。この結果は、LAD2 へ Dicer siRNA 導入すると内在性の miR-142-3p が減少するため抗 IgE 抗体刺激により脱顆粒反応が低下し、miR-142-3p mimic 導入により miR-142-3p 量を増加すると脱顆粒反応が回復したことを示唆している。

マスト細胞は Fc ϵ RI を介した IgE 経路だけでなく、IgE 非依存的にも活性化され脱顆粒反応が惹起される。例えば、塩基性ポリアミンであるコンパウンド 48/80 (c48/80) は IgE 非依存的に脱顆粒反応を惹起する物質の一つである。そこで抗 IgE 抗体刺激だけな

く c48/80 刺激による LAD2 の脱顆粒の影響も検証した。コントロール群の LAD2 では c48/80 刺激でも脱顆粒が惹起されたが、Dicer siRNA が導入された LAD2 では c48/80 刺激による脱顆粒反応が低下し、抗 IgE 抗体刺激時と同様の応答を示した。一方、Dicer siRNA と miR-142-3p mimic の両者を導入した LAD2 に対して c48/80 刺激をおこなうと、Dicer siRNA 導入 LAD2 と同様、脱顆粒が低下したままであり、miR-142-3p mimic 導入によるレスキュー効果は検出されなかった。これは miR-142-3p の脱顆粒反応促進活性は c48/80 刺激時には関与せず、IgE 経路依存的に作用することを示している。

更に、miR-142-3p の脱顆粒に対する作用の普遍性を検証するため、全身の miR-142 前駆体 (mir-142) を欠失させた KO マウスを作成し、骨髄から成熟マスト細胞を分化させて脱顆粒における影響を検証した。mir-142 KO マウスは正常に発生したため、骨髄細胞を単離し in vitro で成熟マスト細胞へ分化させ、IgE 刺激による脱顆粒を測定した。野生型由来の骨髄由来マスト細胞と比較すると、ヘテロ体由来では脱顆粒反応は同程度であり影響は検出されなかったが、ホモ体由来では脱顆粒具合が半分以下に低下した。マウスの初代培養系でも miR-142-3p が欠失すると脱顆粒反応が低下することが明らかとなり、本来、miR-142-3p は脱顆粒反応を促進させる方向へ制御する機能を有することが示唆された。

本研究ではヒトマスト細胞株 LAD2 の脱顆粒反応に miRNA が関与し、LAD2 で高発現する miR-142-3p が IgE 依存的に脱顆粒反応を促進させる方向へ制御することを明らかにした。また、miR-142-3p 抑制により脱顆粒反応が低下することをヒト細胞株だけでなくマウス初代培養系でも明らかにし、miR-142-3p の脱顆粒反応促進という制御機能が広い生物種で保存されている可能性を示した。