

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	奈田 利恵
学 位 論 文 題 目			
microRNA-146b activates the NF- $\kappa$ B pathway and improves intestinal injury in a mouse enteritis model.			
(マウス腸炎モデルにおいてmicroRNA-146bはNF $\kappa$ B経路を活性化し腸管炎症を改善する)			
共 著 者 名			
藤谷幹浩, 上野伸展, 盛一健太郎, 渡二郎, 水上裕輔, 佐藤一也, 高後裕			
未 公 表			
研 究 目 的			
<p>Human Genome Projectによりヒト遺伝子の塩基配列が解読された。約30億の塩基配列のうち遺伝子数は約10%と判明し、それ以外はnon-coding regionとして存在していることが明らかになった。最近、このnon-coding regionの一部から蛋白に翻訳されない短いRNA (small regulatory RNA)が転写されることが明らかになり、遺伝子の発現を調節する新たな生体機構と考えられるようになった。small regulatory RNAの一種であるmicroRNAは約20塩基からなるRNAで、標的mRNAに特異的に結合することで、遺伝子発現を制御する。microRNAは多くの生命体において発見されており、これらの一部は種を超えて保存されている。現在までに800以上のmicroRNAが同定され、ヒト遺伝子の約30%がこのmicroRNAによって調節されていると推測されている。</p> <p>疾患とmicroRNAの異常に関する研究は主に腫瘍性病変を対象としたものものから始まり、乳癌、肺癌、大腸癌などと特定のmicroRNA発現の異常が報告されているが、炎症性疾患と関連するmicroRNA異常の研究は非常に少ない。最近、単核球においてLipopolysaccharide (LPS)により、micorRNA-146 (miR-146), miR-132, miR-155が誘導されること、miR155がregulatory T cellの分化や胚形成に関係すること、炎症性腸疾患患者において複数のmicroRNAに発現異常があることが報告されたが、これらmicroRNA異常の炎症性疾患における役割や治療への応用に関しては明らかにされていない。我々は、腸炎モデルであるinterleukine 10欠損マウスのmicroRNA発現プロファイルを検討し、炎症粘膜においてmiR-146bの発現が増加していることを突き止めた(データ未公開)。</p> <p>そこで本研究では、腸管炎症モデルマウスに対して遺伝子導入を行い、microRNA発現を調節し、炎症性疾患におけるmiR-146bおよびそのvariantであるmiR-146aの役割とその治療効果および作用メカニズムについて検討した。</p>			

## 材料・方法

### マウス

C57/Bl6マウス(三共ラボ)を用いた。腸管を洗浄後に開放スライドグラスにて上皮をそぎ落として、蛋白分解酵素を含む界面活性剤を用いて可溶化した。分光光度計を用いて蛋白含有量を測定後、適当な濃度に希釈してwestern blottingによる解析に用いた。

### 遺伝子導入

pBasi mU6 Neo DNA, TaKaRa code 3228 (タカラ株式会社)を用いてmiR-146a, miR-146bの過剰発現ベクターおよびそれぞれのsiRNAによる発現抑制ベクターを作成した。各ベクターはhemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelopで処理した後、腹腔内投与を行った。

### 免疫染色

遺伝子導入効率を調べる目的で、GFP発現ベクターを腹腔内投与したマウスの腸管、肝臓、肺、腎臓、脾臓を摘出し、10%緩衝ホルマリン固定後4 $\mu$ mの切片を作成した。FITC標識抗GFP抗体を用いて免疫染色を行い、狭焦点顕微鏡にて観察した。腸炎モデル

C57Bl/6マウスに4%のdextran sodium sulfate (DSS)を自由飲水させて人工的な急性腸炎モデルマウスを作製した。各ベクターを7日間連続投与した後の体重、腸管長、組織学的炎症の程度(Bergらのスコア)を調べた。また、致死性の腸炎モデルとして4% DSSを自由飲水させて致死性の腸炎モデルを作製した。このモデルに対し連日遺伝子導入を行い、下血開始時期や生存日数の変化を観察した。

### Western blotting

腸管上皮から採取した試料を用いてWestern blot法により発現蛋白の解析を行った。炎症関連物質NF- $\kappa$ B, シグナル伝達系物質p38-MAPK, JNK, ERK, Aktに対する抗体およびそのリン酸化抗体を用いて、各経路の活性化を解析した。

## 成績

### 遺伝子導入効率

GFP発現ベクターを用いて腹腔内投与により遺伝子導入を行った。免疫染色の結果、GFPは腸管上皮細胞の細胞質に強く発現していた。一部、肺でGFPの発現が認められたが、肝臓、腎臓、脾臓には発現していなかった。したがって、本研究で用いた導入法は、腸管上皮への遺伝子導入に適していると考えられた。

### 急性腸炎モデルにおける腸管上皮障害に対する microRNA 発現調節の影響

4%DSSの自由飲水により作製された急性腸炎マウスモデルでは、腸管長が有意に短縮した。組織学的には、好中球やリンパ球の著明な浸潤を認め、びらんや潰瘍が形成され、Bergスコア3から4の強い炎症所見を呈していた。一方、miR-146b過剰発現ベクターの投与を行った群では、腸管短縮が軽減し、組織学的にも炎症細胞浸潤は軽度から中等度であり、びらん、潰瘍はほとんど認めなかった。Bergスコアは2以下であった。

miR-146aの過剰発現ベクターの投与を行った群では、炎症所見の改善は認められなかった。また、miR-146aおよびmiR-146bのsiRNAを投与した群においても、特に炎症所見の変化は認められなかった。

致死性腸炎モデルにおける下血出現時期、生存期間に対する **microRNA** 発現調節の影響

4%DSSの自由飲水により作製された致死性腸炎マウスモデルにmiR-146b過剰発現ベクターを投与した群では、コントロール群に比べて体重減少が抑制され、累積非出血率、累積生存率が有意に延長していた。一方、miR-146aの過剰発現ベクターの投与を行った群では、コントロール群と差がなかった。また、miR-146aおよびmiR-146bのsiRNAを投与した群においてもコントロール群と比較して累積非出血率、累積生存率に差は認めなかった。

腸炎モデルにおける各種シグナル伝達経路の活性化に対する **microRNA** 発現調節の影響

各ベクターを遺伝子導入した後に、腸管上皮よりタンパクを採取しWestern blotによって解析を行った結果、miR-146aおよびmiR-146b過剰発現ベクターを投与した群ではコントロール群に比べNF- $\kappa$ Bのリン酸化タンパクの有意な発現上昇を認めた。他のシグナル伝達系リン酸化タンパク(p38, MAPK, JNK, ERK, Akt)には変化が見られなかった。一方、miR-146aおよびmiR-146bのsiRNAを投与した群では、NF- $\kappa$ Bリン酸化蛋白の軽度低下を認めたものの有意な変化を来したリン酸化蛋白は認めなかった。

**miR-146b** 過剰発現ベクターによる累積非出血率、累積生存率延長効果に対するNF- $\kappa$ B阻害剤の影響

NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤であるpyrrolidine dithiocarbamate (PDCT)を致死性腸炎マウスモデルに投与したところ、miR-146b過剰発現ベクターを投与した群とコントロール群との間に累積非出血率、累積生存率の差は認めなかった。すなわち、NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤によりmiR-146b過剰発現ベクターによる効果は致死性腸炎マウスの改善効果は消失した。

#### 考察

本研究結果から、miR-146bの過剰発現は、急性腸炎による腸管障害を改善し、致死性腸炎マウスの生存期間を延長することが明らかになった。すなわちmiR-146bの発現増強は、腸管炎症に対する新しい治療法となる可能性が示唆された。これは、*in vivo*の系において、炎症性疾患に対するmicroRNA導入の治療効果を提唱した初めての研究である。また、miR-146b過剰発現はNF- $\kappa$ B のリン酸化を促進すること、NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤によりmiR-146b過剰発現の効果が消失することから、miR-146bの治療効果はNF- $\kappa$ B 経路の活性化を介して発現するものと考えられた。

一方、miR-146aの過剰発現はNF- $\kappa$ B のリン酸化を促進するものの、今回用いたDSS腸炎モデルに対する治療効果は認められなかった。miR-146aとmiR-146bの配列には、3'末端部にわずか2塩基の違いがあるのみだが、その標的mRNAはかなり異なることが知

られている。また、DSS腸炎では、NF- $\kappa$ B経路に関係した異常以外にTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL12など多くのサイトカインに発現異常があることから、この腸炎の発症機序には複数の細胞内シグナル伝達経路の異常が関係していると推察される。miR-146aにはDSS腸炎に対する治療効果が認められなかった理由として、NF- $\kappa$ B経路に関係するmRNA以外の、何らかの炎症に関係するmRNAの翻訳を抑制することで、腸炎の改善効果が妨げられたものと考えられる。また、miR-146aおよびmiR-146bのsiRNAはDSS腸炎の腸管障害に影響を及ぼさなかった。これは、NF- $\kappa$ B経路の活性化が様々な分子によって調節されているため、代償機構が働いたものと推測される。今後さらにmiR-146と他の細胞内シグナル伝達分子や炎症関連分子の発現との関係を検討していく必要があると考えられた。

#### 結論

本研究により、miR-146bの過剰発現は腸炎に対する治療効果を持つことが示唆された。また、この効果はNF- $\kappa$ B経路の活性化を介して発揮されると考えられた。これは、microRNAの発現調節が新しい炎症性腸疾患の治療戦略になる可能性を初めて示したものである。今後さらに、その他の細胞内シグナル伝達経路の活性化や、他のmicroRNAとの関連性を検討することで、microRNAの発現調節をベースとした新規の炎症性腸疾患治療法が開発され、臨床応用が可能になるものと考えられた。




#### 引用文献

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854.
2. Taganov, K.D. et al. (2006) NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12481–12486.
3. Silvia M, Agneta K, Erik M. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288: 1328–1338.

#### 参考文献

1. A case of small cell carcinoma of the oesophagus treated with endoscopic mucosal resection who remained in clinical remission for 18 months: its endoscopic features with specific light spectra. T Nata, M Fujiya, H Tanabe, N Ueno, Y Konno, C Ishikawa, Y Inaba, T Ito, R Sato, K Moriichi, K Okamoto, A Maemoto, Y Mizukami, J Watari, T Ashida, Y Kohgo. *BMJ Case Report*. Dec 9, 2009. (published online)
2. Immunoprecipitation of nucleosomal DNA is a novel procedure to improve the sensitivity of serum screening for the p16 hypermethylation associated with colon cancer. J Sakamoto, M Fujiya, K Okamoto, T Nata, Y Inaba, K Moriichi, H Tanabe, Y Mizukami, J Watari, T Ashida, Y Kohgo. *Cancer Epidemiology*. (2010).
3. Collagenous colitis appeared after 6-year administration of lansoprazole. K Sawada, M Fujiya, K Itabashi, Y Suzuki, K Kubo, T Nata, N Ueno, Y Inaba, K Moriichi, K Okamoto, K Ikuta, H Tanabe, Y Mizukami, Y Takagi, Y Kohgo. *Clinical Journal of Gastroenterology*. (2009)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	奈田 利恵
<p>審査委員長 若宮 伸隆 </p> <p>審査委員 河野 透 </p> <p>審査委員 高役 裕 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>microRNA-146b activates the NF-<math>\kappa</math>B pathway and improves intestinal injury in a mouse enteritis model. (マウス腸炎モデルにおいて microRNA-146b は NF<math>\kappa</math>B 経路を活性化し腸管炎症を改善する)</p>			
<p>ヒトゲノムプロジェクトにより、ヒト遺伝子の塩基配列が解読された。そのなかで、近年タンパク質に翻訳されない短い RNA (small regulatory RNA) が転写され、遺伝子発現を調節する新たな役割を担っていることが明らかにされている。そのなかで、microRNA は、約 20 塩基からなる RNA で、標的 RNA に特異的に結合することで、遺伝子発現を制御し、動物種を超えて保存されている。</p> <p>本研究では、腸炎モデルにおいて microRNA 発現ベクターや microRNA の抑制 SiRNA の腹腔内投与によって、microRNA 発現調節を行い、microRNA の腸炎モデルへの効果についての評価を行った。</p> <p>方法としては、C57/B16 マウスにおいて 4% dextran sodium sulfate (DSS) を投与し急性腸炎モデルを作成し、IL-10 KO マウスの腸炎モデルで上昇する microRNA-146b (miR-146b) を候補に選び、miR-146b 過剰発現ベクター投与し、対照群との治療効果について検討を行った。対照群として、miR-146b の 2 塩基置換 miR-146a と miR-146b の SiRNA をマウスに投与した。さらに、4% DDS 致死的腸炎モデルにおいても同様に、miR-146b 過剰発現ベクター投与を行い、対照群との効果について検討を行った。次に、上記腸炎モデルマウスの腸管上皮を用いて、各種シグ</p>			

ナル伝達経路の活性化についての miR-146b の効果を検討した。また、上記シグナル伝達経路活性化に関与すると考えられる NF- $\kappa$ B の阻害剤を同時投与し、腸炎モデルにおける miR-146b の効果に対する阻害剤の作用を検討した。

その結果として、急性腸炎モデルにおいて、miR-146b は対照群に比較して、有意に腸炎を改善する作用をもつことが認められた。さらに、致死性腸炎モデルにおいては miR-146b 投与群は、生存期間の延長と累積生存率の延長を認めた。また、対照群では、無処置群とほぼ同様の経過を認めた。それらの腸炎モデルマウスの腸上皮における生化学的検討では、miR-146b 投与群では有意に NF- $\kappa$ B のリン酸化がみとめられ、他のリン酸化タンパク質では変化が認められなかった。また、腸炎疾患モデルマウスにおいて、NF- $\kappa$ B 活性化阻害剤投与では、miR-146b 投与の効果が消失した。

本研究は、マウス腸炎モデルにおいて、microRNA 発現ベクターを投与することで NF- $\kappa$ B 経路の活性化を促し、腸炎を改善させようとする試みであり、上記のごとく明確な治療効果が得られたことを示したものである。得られた知見は今後、難治性炎症性腸疾患に対する治療に応用されるだけでなく、microRNA を治療に応用する扉を開けるものとして、臨床的に大変意義があると考えられた。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。