

論文の内容の要旨

論文題目 炎症性マクロファージを制御する長鎖ノンコーディング RNA

氏名 中山 幸輝

食の欧米化と運動不足によって肥満はますます増加しており世界的に深刻な問題となっている。飽和脂肪酸の摂取過多や過栄養が、糖尿病や脂肪肝、動脈硬化、いくつかの悪性腫瘍を引き起こすのは、免疫システムの再構築が原因であり、さまざまな炎症細胞やサイトカインが病態に関与している。免疫細胞の中でもマクロファージは質的にも量的にも中心的な役割を担っている。マクロファージは生体内で様々な表現型を示し、炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) と抗炎症性マクロファージ (M2 マクロファージ) という、相対する表現型のマクロファージのどちらが各種組織において優位であるかは病態を反映している。そして持続する炎症は病態を更なる悪循環へ陥れ、組織学的にも再構築を起こして元のホメオスタシスを保つことができなくなる。このような炎症の悪循環を断ち切り、組織再構築を元に戻すことは、種々の病態における治療の本質になりうると考えられる。そのためにも慢性炎症に関与する細胞におけるシグナル伝達や転写機構を解明することは病態把握と共に重要である。

例えば肥満における脂肪組織のマクロファージは、遊離脂肪酸や LPS をリガンドとして TLR4 が活性化される。マクロファージの TLR4 を刺激すると多様な遺伝子がそれぞれ特有の時間経過で発現される。中でも刺激後数時間から 1 日の間にピークを迎える二次反応群は、その転写機構が特徴的であり、様々なヒストン修飾やクロマチン構造変換に関与している。このようなエピジェネティックな変化を起こす修飾因子は、転写因子や何らかの補因子の働きによって細胞特異的、シグナル特異的な転写調節領域に誘導されていると考えられる。マクロファージにおいて転写因子とヒストン修飾因子の関連を示した報告は少ない。そこで私は、長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) がヒストン修飾因子と結合して炎症性サイトカインの発現調節領域に誘導すると仮説を立てた。

かつては非蛋白コード転写産物の多くは細胞活動において必要のないものと考えられていたが、lncRNA 自体が様々な転写調節や細胞の機能・生命維持、分化に重要な役割

を担っていることが次々と報告されるようになり注目されている。そこでまずはマクロファージで発現する lncRNA を同定し、特に LPS 刺激で発現が変化するものについて網羅的解析を行なった。さらに炎症性サイトカインの転写制御に関与する lncRNA を探索することを本研究の目的とした。

まずは、マクロファージの *in vitro* モデルとして使われている骨髄由来マクロファージとチオグリコレート誘導腹腔マクロファージを用いて、全ゲノムにおいてどれほどのノンコーディング遺伝子が発現しているかを評価した。LPS 刺激前後の幾つかの条件で RNA をシーケンスし、21,915 の発現する転写産物を同定した。この中にコーディング遺伝子として登録されていない 200 ヌクレオチド以上の lncRNA が 5,318 個含まれた。これらの発現量はコーディング遺伝子に比べると 1 桁少ない量である一方、核内により局在する傾向にあることが示された。また、マクロファージで発現する lncRNA に関しては細胞特異的な発現パターンを示し、その他の細胞種や臓器では発現が見られないものも多く見つかった。

一方、刺激依存性に発現量が増加する遺伝子群があり、骨髄由来マクロファージと腹腔マクロファージの二つの細胞系で、LPS 刺激 1 時間の早期に発現が増加している lncRNA が 425 個認められた。これらの lncRNA は刺激依存的に転写開始点近傍に p65 の結合領域をもち、NFκB シグナルにより転写を制御されていることが示唆された。

lncRNA が細胞内で炎症性サイトカインの発現制御に関与していると仮定した場合、これらの lncRNA は刺激依存的に転写され、核内で機能していると考えられる。さらには、炎症性サイトカインの活発な転写が行われている領域のクロマチンは多様な高次構造を取っていると考えられ、エンハンサーなどの遠位の調節領域とプロモーターがループを形成し、複雑なネットワークを形成していると考えられている。機能的 lncRNA はこのループで形成される転写の現場の大きな複合体に存在していると考え、これらのクロマチンを免疫沈降することで得られた RNA を解析することとした。マクロファージにおいて転写因子 PU.1 は、エンハンサー領域の中心に広く結合しており、マクロファージへの分化の過程で細胞特異的なエンハンサー領域を決定するパイオニアファクターと考えられている。抗 PU.1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降により、マクロファージ特異的なエンハンサー領域を含む、広範囲のクロマチンの集合が得られたことから、この中に含まれる RNA をシーケンスした。LPS 早期に発現が増加し、より核内に局在する 367 個の lncRNA の内、免疫沈降されなかったものを除き、残りの 235 の lncRNA について一つ一つ検討していった。データベースを参考にして、コーディング遺伝子を

除外し、繰り返し配列や分節重複、偽遺伝子を含んでいるものやマイクロ RNA 前駆体も除外した。以上により 11 の lncRNA を機能的 lncRNA の候補として選択した。

UUO（一側尿管結紮水腎症）モデルでは、腎臓に炎症性マクロファージと抗炎症性マクロファージが誘導される。そこで、それぞれをソートして RNA をシーケンスすることによって in vivo でも lncRNA の発現が見られることを確認した。幾つかの候補 lncRNA が高い発現を示し、マクロファージのフェノタイプによる発現の差を認めた。

そこで、これら候補 lncRNA を骨髄由来マクロファージにおいてアンチセンスオリゴでノックダウンして刺激後期（12 時間後）の炎症性サイトカインの発現で比較することにした。ある lncRNA のノックダウンによって *Tnf* の発現が有意に下がっていたことから、炎症性サイトカインの発現調節に関与していることが示唆された。