

## 審査の結果の要旨

氏名 中山 幸輝

本研究は、心血管病やメタボリックシンドロームの原因である慢性炎症において重要な役割を担っているマクロファージで発現する長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) について網羅的解析を行った。さらに LPS 刺激で誘導される lncRNA に関して、炎症性サイトカインの発現機構において機能的に働く lncRNA を探索したものであり、下記の結果を得ている。

1. マクロファージの *in vitro* の系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で LPS 刺激前後の RNA をシーケンスして、21,915 個の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 個認められた。この内、2 つの細胞系とともに LPS によって発現が増加する lncRNA が 425 個含まれた。
2. マクロファージで発現する lncRNA には細胞特異性があり、その他の細胞種、臓器では発現が見られないものが多い。また、より核内に局在する傾向がある点でコーディング遺伝子とは異なっていた。
3. 骨髄由来マクロファージにおいて転写因子 PU.1 に対するクロマチン免疫沈降を行なった。マクロファージでは、PU.1 がマクロファージ特異的なエンハンサー領域広範に結合しており、LPS 刺激後 NFκB が結合する部位は PU.1 結合領域に共存していた。
4. LPS 刺激後の骨髄由来マクロファージにおいて PU.1 で免疫沈降を行ない、得られたクロマチンから RNA を抽出してシーケンスを行なった。LPS で発現が増加する lncRNA の一部は PU.1 で免疫沈降されることから、いずれかのマクロファージ特異的なエンハンサー領域で機能している可能性が示唆された。
5. マウスの一側尿管結紮水腎症モデルを用いて *in vivo* の炎症性マクロファージと抗炎症性マクロファージをソーティングしてきた。これらの細胞の RNA をシーケンスすることで、上記 *in vitro* の系で発現していた lncRNA の中には *in vivo* でも高い発現を示すものがあり、フェノタイプによって発現が異なる lncRNA があることが分かった。
6. LPS で刺激が増加する lncRNA の内、核内に偏在し、PU.1 で免疫沈降されたものの中から発現量の多い 11 の lncRNA についてアンチセンスオリゴを用いてノックダウンを行なった。すると LPS 刺激 12 時間後の *Tnf* の発現が抑制される lncRNA が見つかった。発現制御に関与していることが示唆された。

以上、本論文はマクロファージにおいて lncRNA が多数発現しており、一部が刺激依存性に発現が調節されていることを明らかにした。またこれらの網羅的解析により、発現の細胞特異性と核内局在性が示された。さらに、免疫沈降を用いて機能的 lncRNA の探索を行ない、マクロファージにおいてもこれまで報告されていない新たな転写調節機構の存在が示唆された。これらの新たな知見は学位の授与に値するものと考えられた。