

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)

山田陽史

論文の内容の要旨

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 FcεRI が発現しており、IgE 抗体に抗原が結合して架橋され FcεRI の凝集が起こると、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 抗体刺激だけでなく 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。

目次

第1章 緒論	10
緒言	10
機能性 RNA としての microRNA	10
アレルギー疾患におけるマスト細胞の役割	11
アレルギー疾患と miRNA	12
本研究の目的と本論文の構成	13
第2章 材料と方法	14
ヒトマスト細胞の培養	14
LAD2 への miRNA、siRNA 等の導入	14
LAD2 の脱顆粒反応活性測定	15
miRNA ライブラリを用いた機能スクリーニング	16
miRNA の定量 PCR	17
低分子 RNA ライブラリの作製	18
MPSS 法による大量シーケンシング	18
miRNA マイクロアレイ解析	18
生細胞率測定	19
細胞内カルシウム測定	19
mRNA の定量 PCR	20
miRNA の in silico 標的遺伝子予測	21
miRNA 標的遺伝子のレポーターアッセイ	21
miR-142-3p KO マウス作製	22
マウス骨髄由来マスト細胞の初代培養と脱顆粒反応活性測定	22

compound 48/80 刺激下での miRNA 機能スクリーニング	23
mRNA アレイ解析	24
第 3 章 結果	25
第 1 節 マスト細胞の脱顆粒に関与する miRNA の探索	25
緒言	25
Dicer 抑制による脱顆粒反応への影響	26
LAD2 で発現する miRNA のプロファイリング	26
脱顆粒反応を促進させる miRNA の同定	27
脱顆粒に関与する miRNA の機能スクリーニング系構築	27
機能スクリーニングで選抜した miRNA の評価	28
第 2 節 マスト細胞の脱顆粒反応における miR-142-3p の役割	30
緒言	30
miR-142-3p の過剰発現・機能阻害による脱顆粒反応に対する影響	30
Dicer 抑制での脱顆粒反応低下の miR-142-3p 導入によるレスキュー	31
compound 48/80 刺激時の miR-142-3p の脱顆粒反応への影響	32
miR-142-3p 標的遺伝子探索	33
miR-142-3p 欠失マウス由来マスト細胞の脱顆粒反応	34
第 3 節 FcεRI 経路に非依存的な脱顆粒に関与する miRNA の探索	36
緒言	36
compound 48/80 刺激で脱顆粒反応が促進する miRNA	36
miR-29 family の解析	37
第 4 章 考察	39
マスト細胞の脱顆粒に関与する miRNA の探索	39

マスト細胞の脱顆粒反応における miR-142-3p の役割	42
FcεRI 経路に非依存的な脱顆粒に関与する miRNA の探索	46
第 5 章 総括	48
謝辞	51
引用文献	52
図表	59

第1章 緒論

緒言

分子生物学の進展に伴い、多くの疾患においてその発症メカニズムに関与する蛋白質などの生理活性物質、シグナル伝達経路、遺伝子発現調節機構等が解明されてきた。これにより創薬ストラテジーも変化し、疾患発症の鍵を握る分子に着目してその分子を特異的に阻害する分子標的薬の開発が一般的になっている。そのため、創薬における重要な要素は、標的分子の選定と特定の分子特異的に作用する薬剤設計技術の二つと考えられる。

特に標的分子の選定にあたり、ヒトゲノム解読は創薬の標的分子となり得る遺伝子候補の拡大に貢献したが、蛋白質をコードしている領域はヒトゲノム全体の2%に過ぎない(1)。これまではこの2%に相当する遺伝子に着目して標的分子が選定されていたが、残りの多くも蛋白質非コード RNA (non-coding RNA) として転写され RNA として機能を発揮する「機能性 RNA」が含まれており、これらの分子に着目することは、これまで知られていなかった生命現象の解明につながるだけでなく、創薬標的分子の更なる拡大という点でも重要な意義を持つ。

機能性 RNA としての microRNA

機能性 RNA のうち最も着目されている分子群として、microRNA (miRNA) がある。miRNA は最初線虫で見出された 20~25 塩基からなる小分子 RNA であり、相補性の高い mRNA に作用して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(2)。ヒトにおいてその存在が初めて報告されたのは 2001 年のことであるが、現在では miRBase(3) という miRNA のデータベース (<http://www.mirbase.org/>) 上には 1500 種を超える miRNA が同定

されている。

miRNA は、ゲノムから主に RNA polymerase II により、ステムループ構造を持った primary miRNA (pri-miRNA) として核内に転写される。pri-miRNA は RNase 酵素である Drosha/DGCR8 複合体によりプロセシングされ、ヘアピン構造を有する 70 塩基程度の precursor miRNA (pre-miRNA) となる。pre-miRNA は Exportin5 を介して核から細胞質へ輸送され、細胞質にて RNase 酵素である Dicer により切断されて miRNA/miRNA* 二本鎖が生成される。この二本鎖のうち一方の鎖が RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体に取り込まれ、miRNA としての機能を発揮する(4)。Fig.1-1 にヒトにおける miRNA 生合成経路を図示した。

各 miRNA の発現は組織、時期特異的に厳密に制御されており、発生や細胞増殖、細胞分化の調節に重要な役割を果たしていることが、近年、明らかとなってきている(5, 6)。miRNA と疾患に関する研究は端緒についたばかりであるが、癌を中心にして miRNA の発現異常が疾患と関係することを示す報告が急激に増加しており、創薬の標的分子として注目を集めつつある。

アレルギー疾患におけるマスト細胞の役割

アレルギー疾患は、十分な治療法が確立されておらず新薬が望まれる疾患分野の一つであるが、マスト細胞はアレルギー反応における重要なエフェクター細胞として機能することが知られている。

マスト細胞は骨髄の造血幹細胞由来の細胞であるが末梢血中には成熟細胞として存在せず、未分化のまま皮膚や粘膜などの末梢組織に移行し、その場所で分化・成熟し、細胞質に多数の顆粒を有する特徴的な構造を示すようになる。各種刺激により活性化されると脱顆粒を引き起こし、数多くの炎症性メディエーターを遊離する(7, 8)。

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 抗体と高い親和性を有する受容体 FcεRI が発現しており、生体外の多価抗原や IgE 抗体が FcεRI に結合した IgE 抗体に結合し、架橋することによって FcεRI が凝集すると、細胞内へのシグナル伝達が始まり、ヒスタミン放出などの脱顆粒反応が惹起される (Fig.1-2)。一方、マスト細胞の脱顆粒は IgE による FcεRI の活性化のみならず、アデノシンや塩基性ポリアミン compound 48/80、レクチンの一種であるコンカナバリン A など化学的刺激によっても惹起され、IgE/FcεRI 非依存的な経路も報告されている(7)。

脱顆粒により遊離する炎症性メディエーターとしては、ヒスタミン、トリプターゼ、ロイコトリエン、プロスタグランジン D2 などがあり、血管透過性の亢進、気管支平滑筋の収縮、粘液分泌などの作用を通じて、アレルギーにおける即時型反応を引き起こす。また、各種サイトカイン、ケモカインも合成、放出され、好酸球、好中球やリンパ球などの炎症細胞を反応局所に呼び寄せ、アレルギー炎症を継続させる。

アレルギー疾患と miRNA

従来のアレルギー治療薬は脱顆粒により放出されたメディエーターの拮抗作用を有するものが一般的であるが、対処療法の域を出ない。近年、より根治的な抑制を目指し、IgE に対する抗体医薬 (Xolair) が開発された(9)。これは血中 IgE に作用して、IgE がマスト細胞の FcεRI と結合するのを阻害して脱顆粒そのものを抑制する機序である。

前述したように miRNA はつい最近までその存在すら確認されていなかった。miRNA は当初、細胞増殖や分化に対する機能解析が進んだことから、癌との関連で研究が進んでいたが、miRNA により標的遺伝子の発現を負に制御する機構は普遍性が高いと考えられ、アレルギー疾患においてもその発症に

miRNA が関与している可能性はあると考えられた。実際、免疫システムで重要な役割を担う NFκB 経路において miR-146a が制御されていることが報告されている(10)。

私はアレルギー疾患の中心的役割を果たすマスト細胞においても、miRNA の制御機構が存在するかを解明することによって、マスト細胞の機能における新しい知見が得られると考え、本論文のテーマとした。

本研究の目的と本論文の構成

本研究は、マスト細胞の脱顆粒と miRNA との関連を解明することにより、新しい生物学的知見を得、アレルギー疾患に対する新規創薬標的分子としての可能性を提示することを主題としている。その主題のもとで、脱顆粒制御に関与する具体的な miRNA を同定し、その機能を解析することを具体的な目的とした。

第1章（本章）では、本研究の背景と目的を述べ、全体の導入部とした。

第2章では、本研究に用いた材料と方法について述べる。

第3章は第1節～第3節に分け、第1節ではマスト細胞の脱顆粒に関与する miRNA の探索の結果について、第2節では第1節で見出した miRNA のうち、miR-142-3p の機能を詳細に解析した結果について、第3節では FcεRI 経路に依存しない脱顆粒に関与する miRNA を見出した結果について、述べる。

第4章では、第3章の結果を踏まえた考察を述べる。

第5章では、第1から第4章の成果をまとめて本研究の意義を述べるとともに、今後の展開を考察することで総括とした。

第2章 材料と方法

ヒトマスト細胞の培養

LAD2 細胞は National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)より入手し、Stem Pro-34 SFM 培地 (Invitrogen) に 100 ng/mL の SCF、2 mM のグルタミン (Gibco)、25000 unit のペニシリンと 25000 μ g のストレプトマイシン (Gibco) および Stem Pro-34 SFM に添付されるサプリメントを添加した培地 (以下、LAD2 培養培地と呼ぶ) で培養した。

LAD2 への miRNA、siRNA 等の導入

siRNA、miRNA 前駆体はリポフェクション法により、LAD2 へ導入した。具体的には、終濃度 2 mM グルタミンのみを含む Stem Pro-34 SFM 培地 (以下、リポフェクション培地と呼ぶ) で LAD2 を洗浄した後に 5×10^5 個/ml となるよう懸濁し、6 well plate に 1 well あたり 1 ml ずつ播種した。その後、各種核酸を Gene Silencer (Genlantis) を用いて導入した。例えば終濃度が 30 nM となるように miRNA 前駆体を導入する場合、Gene Silencer 4 μ l とリポフェクション培地 21 μ l を混合し、20 μ M の miRNA 前駆体 1.5 μ L を 23.5 μ L のリポフェクション培地で希釈した混合液に加えた。これらの混合液を室温で 20 分間放置した後、1 well につき 50 μ l 添加して 37°C の 5% CO₂ インキュベーターで 5 時間リポフェクション反応させた。リポフェクション反応は LAD2 培養培地を 1 ml 添加することによって停止させた。なお mock 群とは、各種核酸を加えず、Gene Silencer とリポフェクション培地のみを添加して実施した試験区を指す。

miRNA 前駆体としては、Pre-miR™ miRNA Precursors (Ambion) を用い、

陰性対照としては特に断りがない限り、同じフォーマットの Pre-miR™ Negative Control #2 (Ambion) を用いた。

miRNA アンチセンスとしては、mature miRNA の相補鎖配列を全塩基について 2' -O-methyl 化した RNA (ファスマックにて委託合成) を用いた。また miRNA inhibitor は、特定の miRNA 機能を阻害するとされている Anti-miR™ miRNA Inhibitors (Ambion) を用い、陰性対照としては Anti-miR™ Negative Control #1 (Ambion) を用いた。

siRNA は QIAGEN 社あるいは Dharmacon 社の製品を使用した。各遺伝子に対する target 配列は以下の通り。

Dicer siRNA-1	AATGTGCTATCTGGATCCTAG
Dicer siRNA-2	ACTGCTTGAAGCAGCTCTGGA
Lamin A/C siRNA	CAGGTGGTGACGATCTGGGCT
LPP siRNA	CAGGAATTCCAATTAAATTTA
WASL siRNA	CAGATACGACAGGGTATCCAA
CBL siRNA	CCGTACTATCTTGTCAAGATA

LAD2 の脱顆粒反応活性測定

まず、脱顆粒反応の活性測定の前日に LAD2 に対して IgE で感作した。具体的には、1.0 µg/ml のヒトミエローマ IgE (Athens Research & Technology) を LAD2 培養培地で 3.0 µg/ml に希釈し、1 well あたり 200 µl ずつ添加 (終濃度 0.3 µg/ml) して 37°C の 5% CO₂ 濃度のインキュベーター中で一晩培養した。

翌日、遠心分離により培地を除き、Tyrode 緩衝液 (126.1 mM NaCl、4.0 mM KCl、1.0 mM CaCl₂、0.6 mM MgCl₂、0.6 mM KH₂PO₄、10 mM HEPES、5.6 mM D-グルコース、0.1% ウシ血清アルブミン、pH 7.4) で洗浄した後、Tyrode 緩衝液を 1.5 ml 添加して細胞を懸濁し、96 well plate に 1 well あたり

100 μ l ずつ分注した。次いで、抗 IgE 抗体刺激による脱顆粒反応の誘導を実施した。具体的には終濃度 10 μ g/ml となるよう調製したウサギ抗ヒト IgE 抗体 (DAKO, A0094) を 10 μ l ずつ加え、37°C の 5% CO₂ 濃度のインキュベーター中で 20 分間インキュベートした。遠心により上清を回収し、上清中の β -hexosaminidase 活性を測定することにより、脱顆粒反応の活性を測定した。 β -hexosaminidase 活性は、回収した上清 50 μ l に、40 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解した 4 mM p-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosanimide (Sigma) を 50 μ l 加え、37°C で 1 時間インキュベート後、0.2 M glycine (pH 10.7) を 100 μ l 加えたサンプルの 405 nm における吸光度をプレートリーダー 1420 ARV0sx (Perkin Elmer) を用いて 1 sec 測定することにより評価した。また、ウサギ抗ヒト IgE 抗体の代わりに最終濃度 1% の Triton X-100 を添加して同様の実験を行うことにより、LAD2 中の全 β -hexosaminidase 活性を測定した。脱顆粒の割合は、全 β -hexosaminidase 活性に対する上清中の β -hexosaminidase 活性の割合 (%) で算出した。

miRNA ライブラリを用いた機能スクリーニング

miRNA ライブラリは、Ambion 社製の human Pre-miRTM miRNA Precursor ライブラリを用いた。ライブラリ ver.1 は miRBase ver.7.1 (2005 年 10 月登録分) に登録された 319 種類の miRNA mimic が、ライブラリ ver.2 は 152 種類 (miRBase ver.9.2、2007 年 5 月登録追加分) の miRNA mimic が含まれている。当該ライブラリに対して効率よくスクリーニングするため、本実験では前述の 6well plate による脱顆粒反応の活性評価ではなく、96 well plate 上で Reverse Transfection 法と組合せた評価を実施した。

具体的には、96 well plate にリポフェクション培地を予め 18 μ l ずつ加え、さらに 1 μ M の前駆体 RNA を 2 μ l ずつ添加した (終濃度 25 nM)。次に、リ

ポフェクション試薬である TransIT-TKO (Mirus, MIR2154) 0.04 μl を 10 μl のリポフェクション培地と混合し、10 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ 96 well plate に添加した。この後、リポフェクション培地で洗浄した LAD2 を、96 well plate に 1 well あたり 4×10^3 cells/50 μl となるように播種した。リポフェクション法により該 miRNA mimic を導入した 2 日後または 7 日後に、終濃度が 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようリポフェクション培地で希釈したヒトミエローマ IgE (Athens Research&Technology, 16-16-090705-M) を 8 μl 添加し、37°C の 5% CO₂ 濃度のインキュベーター中で一晩培養した。翌日、終濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようウサギ抗ヒト IgE 抗体 (DAKO, A0094) を 40 μl 加え、30 分間インキュベートし脱顆粒を誘導した。脱顆粒活性の評価は前項と同様に β -hexosaminidase 活性を測定することで実施したが、遠心による細胞上清の回収は実施せずに、培地中に p-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosanimide を直接添加して 37°C で 3 時間インキュベートした後、吸光度をプレートリーダー EnVision (Perkin Elmer) で測定することで行った。測定後、終濃度が 1% となるよう Triton X-100 を培地に添加して同様の実験を行うことにより、LAD2 に含まれる全 β -hexosaminidase 活性を測定した。抗 IgE 抗体によって誘導された脱顆粒の割合は、1% Triton X-100 によって放出させた全 β -hexosaminidase 活性に対する割合 (%) で算出した。

miRNA の定量 PCR

LAD2 からの Total RNA 回収は mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) を使用した。

miRNA の定量は Taqman miRNA assay (Applied Biosystems) を使用した。Total RNA 10 ng に対し特定の miRNA に対する逆転写をおこない、製品添付のプロトコールに従って 7900HT (Applied Biosystems) を用いて qPCR 反応

を行った。各遺伝子の ΔCt 値は U6 RNA 発現量に対する補正を加えた。なお、ヒト各組織での miRNA 定量に用いた鑄型は、First Choice Human Total RNA (Ambion) を使用した。

低分子 RNA ライブラリの作製

LAD2 からの低分子 RNA ライブラリ作製によるクローニングは Lau らの方法(11)に従った。すなわち、前述のように LAD2 から回収した total RNA 200 μg を用いて、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動による低分子 RNA の切り出し、5' -adenylated-3' adaptor ligation、5' -adaptor ligation、逆転写、PCR 増幅、concatamerization、pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) への ligation を順次進め、低分子 RNA のクローニングを行なった。その後、クローニングした低分子 RNA の塩基配列を決定した。なお 5' -adenylated-3' adaptor は miRNA Cloning Linker (Integrated DNA Technologies) として販売されているものを用いた。

MPSS 法による大量シーケンシング

LAD2 から回収した 100 μg の total RNA を既報(12)に従い、Megaclone マイクロビーズを作製し、各 Megaclone マイクロビーズ上の Signature 配列を読み取った。Megaclone マイクロビーズの作製、配列取得はタカラバイオにて実施した。取得した約 100 万の配列データは、miRBase などのデータベースと照らし合わせて既知 miRNA の出現頻度を算出した。

miRNA マイクロアレイ解析

LAD2 由来の total RNA 100 ng を用いて miRNA マイクロアレイに供した。miRNA マイクロアレイは Agilent 社製のものを用い、プローブは miRBase

ver.9.1 を元に作製されている。ラベル化、ハイブリダイゼーションは miRNA Labeling Reagent and Hybridization Kit (Agilent) を用いて、タカラバイオ社にて実施した。またシグナル強度は、Agilent Feature Extraction ver. 9.5 (Agilent) のソフトを用いて算出した。

生細胞率測定

Cell Titer Glo (Promega) を用いて細胞内 ATP 量を測定することで、生細胞率を測定した。まず、リポフェクション培地で LAD2 を洗浄した後、96 well plate に 1 well あたり 2×10^4 cells/20 μ l となるよう播種した。次に、Gene Silencer を用いて miRNA mimic を導入した。miRNA 導入 3 日および 8 日後に、Cell Titer Glo を 50 μ l/well ずつ添加し、ARVOsx (Perkin Elmer) で吸光度を測定した。

細胞内カルシウム測定

抗 IgE 抗体刺激による細胞内カルシウム量を蛍光カルシウム指示薬の Fluo-4/AM の蛍光強度を指標として評価した。Fluo-4/AM は予め 1 mM となるよう DMSO に溶解させて凍結保存し、測定日にカルシウムアッセイ緩衝液 (20 mM HEPES, 115 mM NaCl, 5.4mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 13.8 mM D-Glucose, 2.5 mM Probenecid (SIGMA), 0.2% BSA (pH7.4)) で 1 μ M に希釈し、さらに終濃度 0.05%となるよう Pluoronic F-127 (10% Water, Molecular Probes) を添加して使用した。

カルシウム測定の前日に LAD2 に対し、ヒトミエローマ IgE (終濃度 0.3 μ g/ml) を添加し一晩感作させた。IgE 感作後、遠心分離により培地を除き、1 μ M Fluo-4/AM 溶液を 3 ml ずつ添加し、37°C、5% CO₂ 培養庫で 1 時間培養した。反応後にカルシウムアッセイ緩衝液で 2 回洗浄した後、当該緩衝液で 1 ×

10⁴ cells/80 μl となるよう懸濁し、80 μl ずつオプティカルボトムプレート (Nunc) に LAD2 を播種した。次に、ウサギ抗ヒト IgE 抗体 (DAKO) をカルシウムアッセイ緩衝液で 10, 50, 100 μg/ml となるようそれぞれ希釈した。さらに、これらをリガンド溶液としてポリプロピレンプレート 96-U (Nunc) に 100 μl/well ずつ添加した。リガンド添加後の細胞内カルシウム量変化は FDSS6000 (浜松フォトニクス) を用いて計測した。解析開始後 15 秒において各リガンド溶液を 20 μl/well ずつ添加し、1 秒ごとに Fluo-4 の蛍光強度を 166 回 (2 分 45 秒間まで) 計測した。データはリガンド添加前の Fluo-4 の蛍光強度を 1.0 としたときの相対値で示した。

mRNA の定量 PCR

mRNA 定量のため、LAD2 からの Total RNA 回収は miRNA 定量と同様に、mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) を使用した。

逆転写反応は SuperScript III First Strand (Invitrogen) を使用して行い、1 μg の Total RNA を鋳型として Oligo dT プライマーで cDNA を合成した。mRNA の定量は Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を利用し、シグナルの検出には 7900HT (Applied Biosystems) を使用した。なお ΔCt 値は、ハウスキーピング遺伝子の G3PDH の各サンプルにおける発現量を元に補正して算出した。qPCR 反応に利用したプライマー配列を以下の通り。

human Dicer, forward 5'- CTCCGAAGGAAGAGGCTGACTAT -3', reverse 5'- CCGTGTCAACACCACAGTTTTTC -3'

human MIP-1β, forward 5'- TGGTAGATTACTATGAGACCAGCAG -3', reverse 5'- CACACAGAATCAAATGTGTTATCC -3'

human LPP, forward 5'- GAAAACGTAGTTGGGGAAGG -3', reverse 5'-

AGTATTAATGTAGCAGGGCTCG -3'

human WASL, forward 5'- ACCATCAGGTTCCAACACTACTG -3', reverse 5'-
GGTGTAGACTCTTGGCCATC -3'

human CBL, forward 5'- GGAGACAGGAAAGAATGCTC -3', reverse 5'-
AAGGCATGCAACCTGATAAC -3'

human G3PDH; forward 5'- CCCATCACCATCTTCCAGGAGC -3', reverse
5'- TTCACCACCTTCTTGATGTCATCATA -3'

miRNA の in silico 標的遺伝子予測

予測標的遺伝子の探索は、既に我々が報告した通り、miRNA seed 配列 (miRNA の 5' 端の 2~8 塩基目の 7mer 配列) に対し、Watson-Crick 塩基対で完全に相補する配列を有する mRNA 3' UTR 領域配列を網羅的に調査する手法 (miGTS 法) により実施した(13)。

なお、3' UTR 領域を規定するため、ヒトゲノムに Refseq, EST, mRNA データをマッピングした UCSC データベース (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg17/database/>) を使用した。

miRNA 標的遺伝子のレポーターアッセイ

ヒトおよびマウス LPP mRNA に対し miR-142-3p が認識すると考えられる配列を psiCHECK-2 ベクター (Promega) の Renilla luciferase 遺伝子の下流 3'側にある XhoI-NotI サイトに挿入し、レポーターベクターを構築した。miR-142-3p 認識配列は野生型の他、seed 配列を置換した変異体を作製した。具体的な配列は Fig. 3-13A に示した。

500 ng のレポーターベクターと、20 nM の miR-142-3p mimic あるいは miRNA mimic コントロールを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて

HepG2 細胞に導入し、24 時間後の Renilla luciferase および Firefly luciferase 活性を Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて ARVOSx (Perkin Elmer) で測定し、Firefly luciferase 活性で補正した Renilla luciferase 活性を算出した。

miR-142-3p KO マウス作製

miR-142-3p KO マウス作製のため、ES 細胞に相同組換えで gene targeting する strategy は Fig. 3-14B に示した。miRBase 上では、マウス miR-142-3p 前駆体 (mir-142) 配列よりヒト miR-142-3p 前駆体 (mir-142) 配列の方が長く登録されていたが、マウスおよびヒト mir-142 近傍のゲノム配列は完全に一致していたため、ヒト mir-142 登録配列に相当する 87bp を targeting 領域とした。具体的な配列は次の通り。

5'-GACAGTGCAGTCACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTAACAGCACTGG
AGGGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGATGAGTGTACTGTG-3'

targeting 領域に隣接する 5' 側および 3' 側ゲノム配列のそれぞれ 2.0kb および 6.0kb を 129 マウスゲノムより PCR にてクローニングし、phosphoglycerate kinase promoter 下に neomycin 耐性遺伝子および thymidine kinase を有するベクターに組み込んだ。

ES 細胞へ transfection し G418 および DTT で選別した後、PCR にて組換え ES 細胞を確定させた。組換え ES 細胞は胚盤胞期の受精卵に注入してキメラマウスを発生させた。キメラマウスを C57BL/6 と交配して出生させ、更にそれら同士を掛け合わせて、ホモ体、ヘテロ体を得た。

マウス骨髄由来マスト細胞の初代培養と脱顆粒反応活性測定

マウス骨髄からのマスト細胞の初代培養は既報(14)に従った。すなわち、マ

ウス骨髄より無菌的に細胞を単離し、RPMI1640 培地 (Gibco) に 10% FCS、1% Penicillin-Streptomycin、1% non-essential amino acids、1% Sodium Pyruvate、50 μ M 2-mercaptoethanol、10% pokeweed mitogen-stimulated spleen-conditioned medium を添加した培地で培養した。約 6 週間培養した細胞を脱顆粒反応に供した。

脱顆粒反応の前日に 6 well plate に 5×10^5 cells/ well を播種し、終濃度が 1.0 ng/ml となるように抗 TNP マウス IgE 抗体 (BD Pharmingen) を加えて感作させ、24 時間後 Tyrode 緩衝液で懸濁し 96 well plate に 1 well あたり 4×10^4 cells の細胞を 100 μ L ずつ分注した。次いで、TNP-BSA (コスモバイオ) を加え、37°C の 5%CO₂ 濃度のインキュベーター中で 20 分間インキュベートすることで脱顆粒反応を誘導した。遠心により上清を回収し、上清中の β -hexosaminidase 活性を測定することにより、脱顆粒の程度を測定した。 β -hexosaminidase 活性測定は、LAD2 で 6 well plate で測定した方法と同様に実施した。

compound 48/80 刺激下での miRNA 機能スクリーニング

miRNA ライブラリは先に示したのと同様、Ambion 社の human Pre-miRTM miRNA Precursor ライブラリ ver.1 と ver.2 に含まれる、計 471 種の miRNA mimic を用いた。

miRNA mimic の LAD2 に対する transfection および脱顆粒活性評価は、基本的に先に記載した機能スクリーニングと同様の方法で実施した。但し、脱顆粒活性評価は transfection の 3 日後に、終濃度が 1.0 μ g/ml となるように compound 48/80 添加して刺激した。本スクリーニングでは miRNA mimic 導入時に Dicer siRNA-1 も同時に導入し、導入濃度はそれぞれ 25 nM ずつである。なお、陰性対照としては、Pre-miRTM Negative Control #1 (Ambion) を

使用した。

mRNA アレイ解析

Agilent 社の Whole Human Genome (4x44K)アレイを用いて発現解析を実施した。アレイ解析には、miR-29c mimic あるいは Pre-miR™ Negative Control #1 をそれぞれ 50 nM 導入し、48 時間後の LAD2 より抽出した total RNA を供した。RNA のラベル、ハイブリダーゼーション、スキャンはファルマフロンティアにて実施した。

第3章 結果

第1節 マスト細胞の脱顆粒に関与する miRNA の探索

緒言

マスト細胞は免疫担当細胞の一種であり、骨髄中の造血幹細胞からマスト細胞を含めた各種免疫細胞への分化過程における miRNA の発現プロファイルの変化が知られている。例えば、マウス細胞を用いた解析により、骨髄系前駆細胞からマスト細胞への分化過程で miR-223 の発現が減少し、miR-26a 等が増加すると報告されている(15)。また、マスト細胞の増殖に関与する miRNA の報告もある(16)一方で、マスト細胞の脱顆粒反応自体を miRNA との関連で着目した研究は少ない。

マスト細胞の脱顆粒反応に miRNA 機構が関与するか否かを確認するため、まず miRNA の生合成経路を阻害することで脱顆粒反応に対する影響を解析し、その後、個別の miRNA への特定を目指す探索を実施した。

マスト細胞の脱顆粒解析に供する材料は、マウスの骨髄細胞をマスト細胞に分化させた初代培養細胞が用いられることも多いが、均一の性質を有する細胞を大量に得ることが難しいこと、また創薬を目指す上でヒトでの解析を重視したいことから、本研究では LAD2 というヒトマスト細胞株を用いて解析を進めた。LAD2 は細胞表面に FcεRI と c-kit が変異を有さずに発現して 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る。これは、HMC-1 など他のヒトマスト細胞株とは異なる特徴であり、ヒト CD34 陽性初代培養マスト細胞とも類似し、本来のマスト細胞の機能を保持している細胞株と考えられている(17)。

Dicer 抑制による脱顆粒反応への影響

まず、miRNA による制御機構がマスト細胞の脱顆粒反応に関与しているかの知見を得る目的で、miRNA の生合成に関与する Dicer(2, 18)の発現を siRNA で抑制し、miRNA 全体の発現が低減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。

マスト細胞は、ヒトマスト細胞株である LAD2 を用い、IgE で LAD2 を感作した翌日に抗 IgE 抗体で刺激することで、IgE 依存的な脱顆粒反応を惹起させた。脱顆粒反応の活性は、培地中に放出される β -hexosaminidase 量を測定し、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評価した。

ヒト Dicer に対する siRNA 2 種類について 30 nM となるように LAD2 に導入し、7 日後の脱顆粒活性を測定した結果、どちらの Dicer siRNA 導入群でも、siRNA 非添加群 (mock) やコントロール siRNA 導入群 (Lamin A/C siRNA) に比べ、脱顆粒活性が低下した (Fig.3-1)。本結果は、Dicer 抑制により miRNA 量が低下すると脱顆粒反応の活性が低下したことを示唆しており、miRNA が脱顆粒反応に関与していると考えられた。

LAD2 で発現する miRNA のプロファイリング

LAD2 で発現する低分子 RNA ライブラリを作成して各 miRNA 毎のクローニング個数を調べ、LAD2 での miRNA 発現プロファイリングを実施した。

作成した低分子 RNA ライブラリの配列解析の結果、miRNA 成熟体と分類された miRNA の内訳を Table 3-1 に示す。この表からは miR-142-3p が最も多く含まれていることが示され、LAD2 では miR-142-3p が高発現していることが分かった。miR-142-3p 以外では、miR-21 や let-7 family が続いた。miR-21

は各種癌細胞株での発現亢進が報告されており(19)、let-7 family は細胞増殖との関連が示唆されている(20)。一方、miR-142-3p は造血系腫瘍との関連は報告されている(21)ものの、各種癌細胞株での発現は白血球由来以外の細胞株では顕著でない(22)ことから、miR-142-3p は単に細胞株として一般的な細胞増殖に関与しているのではなく、LAD2 を特徴づける何らかの機能に関連があると考えられた。miR-142-3p のヒト正常各組織における発現を調べてみると、脾臓・胸腺などで発現が高く (Fig.3-2)、既報(23)通り免疫細胞関連の組織で発現していることが確認された。

脱顆粒反応を促進させる miRNA の同定

LAD2 で取得された miRNA のうち、LAD2 での発現量や他細胞と比べた特異性を考慮して幾つかの miRNA に着目し、それらを過剰発現させて脱顆粒反応に対する影響を検証した。miRNA の過剰発現は、siRNA と類似の構造を有する miRNA mimic と呼ばれる分子を LAD2 に導入することで実施した。

各 miRNA mimic を LAD2 に導入し、3 日後および 7 日後に抗 IgE 抗体で刺激して脱顆粒反応の活性を測定した結果を Fig.3-3 に示す。その結果、miR-142-3p mimic を導入した LAD2 脱顆粒反応が顕著に促進された。miR-146a mimic も促進傾向が認められたが、miR-142-3p ほどではなかった。また、それ以外の miRNA mimic 導入群に関しては顕著な脱顆粒反応の変動は認められなかった。

脱顆粒に関与する miRNA の機能スクリーニング系構築

miR-142-3p 以外にも脱顆粒反応に対し顕著な促進活性を示す miRNA を探索するため、ヒト miRNA ライブラリを用いた網羅的な機能スクリーニングも実施した。

417種類の miRNA mimic を 50 nM にて LAD2 に導入し、導入 3 日後および 8 日後に IgE 依存的な脱顆粒反応を誘起した。各測定プレートに配置した陰性対照 RNA (siRNA All Star ctrl) 導入区の脱顆粒活性の値を 1.0 として、各 miRNA 前駆体導入区における脱顆粒の相対活性を算出した。各 miRNA における相対活性のヒストグラムを Fig.3-4A に示す。相対値が 1.0 より大きく脱顆粒促進傾向を示した miRNA は、トランスフェクション 3 日後では 225 種 (47.8%)、8 日後では 290 種 (61.6%) であった。

各プレートには脱顆粒を抑制することが知られている LAT に対する siRNA、および脱顆粒を促進させる LYN に対する siRNA を配置して陽性コントロールとしたが、どのプレートにおいてもそれぞれ想定された活性を示した (Fig. 3-4B)。また miR-142-3p mimic も同様に配置した結果、各プレートで脱顆粒反応の促進活性を確認した (Fig.3-4B)。これらの結果より、本スクリーニング系の妥当性を検証できた。

機能スクリーニングで選抜した miRNA の評価

417 種の miRNA mimic を 96 well plate に導入して脱顆粒活性の促進を示した miRNA について、改めて 6 well plate において脱顆粒活性を評価した。その結果、miR-200a、200c、361 でトランスフェクション 3 日目あるいは 8 日目において脱顆粒活性が促進することを見出した (Fig.3-5)。

一方、これらの miRNA が LAD2 にて発現しているかを確認するため、先に実施した以外の手法でも発現プロファイリングを実施した。具体的には Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS) 法による大量シーケンシング、および miRNA マイクロアレイ法の二つである。

MPSS 法は、マイクロビーズを利用して mRNA や miRNA の発現頻度解析を網羅的におこなう技術であり、解析対象となる RNA を cDNA にしてその断

片を個々にマイクロビーズ上に固定化し、ビーズの集団をまとめて解析することで、100万個程度の大量解析を可能にしている(12)。MPSS法により得た総数986,421配列(43,305種類)を解析した結果、LAD2で発現頻度が高い上位30種の既知miRNAをTable 3-2に示した。また、miRNAアレイ解析によりシグナル値の高い上位30種の既知miRNAはTable 3-3に示した。

低分子RNAライブラリ、MPSS法による大量シーケンシング、miRNAマイクロアレイ、の3つの手法のプロファイリングにおいて、miR-200a、200c、361の発現を確認した結果、どれも上位30位までには含まれておらず、どの手法においても発現量は非常に低かった(Table 3-4)。従って、これらのmiRNAはLAD2の脱顆粒反応に関与する可能性は低く、miRNA mimic導入による脱顆粒反応の促進結果は、本来のLAD2の反応を反映しているのではなく、標的遺伝子に対して作用した結果と考えられた。一方、miR-142-3pはどの手法でも上位に位置して高発現を示すことから、本来、LAD2で脱顆粒反応に関与する可能性が高いと考えられた。これらの結果より、miR-142-3p以上に脱顆粒反応を顕著に促進させるmiRNAは見出せず、miR-142-3pがFcεRI依存的に脱顆粒を促進するのに最も重要な役割を担うmiRNAであると考えられる。

第2節 マスト細胞の脱顆粒反応における miR-142-3p の役割

緒言

前節の検討結果より、LAD2 の脱顆粒反応に miRNA による制御機構が関与し、種々の miRNA の中でも LAD2 で高発現を示す miR-142-3p が脱顆粒反応を促進させる活性を有することが示された。

本節では、脱顆粒反応における miR-142-3p の機能をより詳細に解析するため、内在 miR-142-3p 量と脱顆粒反応との関係や、FcεRI を介しない刺激での脱顆粒反応に対する影響、LAD2 以外のマスト細胞での機能などを検討した。

miR-142-3p の過剰発現・機能阻害による脱顆粒反応に対する影響

miR-142-3p mimic 導入による脱顆粒反応の促進活性をより詳細に解析するため、導入濃度依存性を検証した。その結果、miR-142-3p mimic の導入濃度が増すと抗 IgE 抗体刺激による脱顆粒反応の促進活性が増強された (Fig. 3-6A, 3-6C)。逆に、LAD2 に内在する miR-142-3p 機能を阻害するため、miR-142-3p に対するアンチセンスを導入した場合の脱顆粒反応も調べた。その結果、miR-142-3p に対するアンチセンスを導入すると抗 IgE 抗体刺激で脱顆粒反応がコントロール群に比べて減少し、この作用も導入アンチセンス濃度に依存した (Fig. 3-6A, 3-6C)。また、miR-142-3p mimic およびアンチセンス導入による LAD2 増殖への影響を調べるため、導入 3 日後の生細胞数を測定した。その結果、miR-142-3p mimic の 30 nM 導入で若干の生細胞数減少傾向が確認されたが、増殖を大きく低下させるものではなかった (Fig. 3-7)。

一般的にマスト細胞の脱顆粒反応において、FcεRI 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(24)。そこで miR-142-3p を過剰

発現させた LAD2、および miR-142-3p 機能を阻害した 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。細胞内カルシウム量は、蛍光カルシウム指示薬である Fluo-4/AM の蛍光強度を指標として計測した。

miR-142-3p mimic および miR-142-3p inhibitor を LAD2 に導入し、3 日後に抗 IgE 抗体で刺激した後の細胞内カルシウム量変動を Fig. 3-8 に示す。無刺激では細胞内カルシウム量の顕著な変動は検出されなかったが、10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の抗 IgE 抗体添加によりカルシウム量が増加した。miR-142-3p mimic 導入の LAD2 では抗 IgE 抗体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 inhibitor を導入して内在 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。

以上の結果より、LAD2 の miR-142-3p 量に比例して抗 IgE 刺激時の細胞内カルシウム量が増加することが明らかとなった。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。

なお、LAD2 を抗 IgE 抗体で刺激することにより miR-142-3p 自体の発現量が増加しているかを検証するため、抗 IgE 刺激の 2 時間後および 6 時間後の LAD2 における miR-142-3p 量を測定した。その結果、抗 IgE 抗体刺激により 2 時間後に MIP-1 β mRNA の発現が 100 倍程度上昇し、既報(25)通り Fc ϵ RI の活性化による応答反応が確認できたが、miR-142-3p の発現はほとんど変化しなかった (Fig. 3-9)。

Dicer 抑制での脱顆粒反応低下の miR-142-3p 導入によるレスキュー

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作用は、主に内在の miR-142-3p 量減少が原因であることが推察される。そこで、Dicer siRNA 導入して miRNA 全体の発現量が低下した LAD2 に対し、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。

LAD2 に Dicer siRNA を導入すると Dicer mRNA 低下と共に miR-142-3p の低下が確認されたが (Fig. 3-10A, 3-10B)、Dicer siRNA と miR-142-3p mimic の両方を導入すると、Dicer mRNA 量が低下したまま miR-142-3p 量が増加した (Fig. 3-10A, 3-10B)。

この条件下で抗 IgE 抗体刺激による脱顆粒反応を測定した。Dicer siRNA と miR-142-3p mimic の両者を導入した LAD2 では、Dicer siRNA とコントロール miRNA mimic の両者を導入した LAD2 に比べて、抗 IgE 抗体刺激により脱顆粒具合が増加し、miR-142-3p mimic 単独導入群とほぼ同レベルにまで脱顆粒反応が促進された (Fig. 3-10C)。この結果は、Dicer siRNA 導入した LAD2 に対して抗 IgE 抗体刺激で脱顆粒反応が低下した主な原因は、Dicer mRNA 減少により内在性の miR-142-3p が減少したためであり、miR-142-3p mimic 導入により miR-142-3p 量が増加すると脱顆粒反応が回復したことを示している。

compound 48/80 刺激時の miR-142-3p の脱顆粒反応への影響

マスト細胞は FcεRI 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 compound 48/80 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(7, 26)。そこで LAD2 に対し、抗 IgE 抗体刺激だけでなく compound 48/80 刺激による IgE 非依存的な経路での脱顆粒反応の影響も検証した。

Dicer siRNA を導入した LAD2 では compound 48/80 刺激により、コントロール群に比べ脱顆粒反応が低下し (Fig. 3-6B, 3-6D)、抗 IgE 抗体刺激時と同

様の応答を示した。一方、miR-142-3p mimic あるいは miR-142-3p アンチセンスを導入した LAD2 において compound 48/80 刺激での脱顆粒反応に大きな影響は与えなかった (Fig. 3-6B, 3-6D)。

更に、Dicer siRNA と miR-142-3p mimic の両者を導入した LAD2 に対して compound 48/80 刺激をおこなうと、Dicer siRNA 導入 LAD2 と同様、脱顆粒反応の活性が低下したままであった (Fig. 3-10D)。つまり、抗 IgE 抗体刺激時とは異なり 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。この結果は、miR-142-3p の脱顆粒反応促進活性は compound 48/80 刺激時には関与せず、IgE 経路依存的な経路に作用することを示している。

miR-142-3p 標的遺伝子探索

一般に miRNA は多数の遺伝子発現抑制に関与する。このため、miR-142-3p の標的遺伝子を探索するには miR-142-3p seed 配列に相補する 3' UTR 上の配列の個数や、標的遺伝子の機能、LAD2 における内因性発現量など複数の情報を活用し、多面的に解析することが必要である。

本研究ではまず、miRNA の seed 配列の相補性に着目して、miR-142-3p の標的サイトが 3' UTR 内にヒトおよびマウスに対して 1 箇所以上有する 27 遺伝子を選抜した。次にこれらの中から、DNA マイクロアレイによる LAD2 発現プロファイルにおいて発現フラグが付与された遺伝子を 6 つ絞り込んだ。

これらの遺伝子に対する siRNA を LAD2 に導入して、抗 IgE 抗体刺激による脱顆粒反応を測定した結果、LPP および WASL に対する siRNA を導入した LAD2 では脱顆粒反応の促進が検出された (Fig. 3-11B, 3-11C)。これらの siRNA は対象遺伝子を KD することは確認している (Fig. 3-11A)。

また、上記アプローチとは別の方法による絞り込みも実施した。miR-142-3p は IgE 経路依存的に脱顆粒反応を促進させる活性を有するため、カルシウムシ

グナル系ではなく IgE 受容体シグナル伝達系で、抑制方向に関与していると思われる因子をピックアップし、このうち miR-142-3p の標的サイトが 3' UTR 内にヒトに対してのみ 1 箇所以上有する遺伝子も選抜した。その結果、c-cbl (CBL) が miR-142-3p の標的サイトを有していた。CBL についても KD が確認された siRNA (Fig. 3-11A) を LAD2 に導入し、抗 IgE 抗体で刺激した結果、脱顆粒反応を促進させた (Fig. 3-11B, 3-11C)。

LPP、WASL、CBL それぞれの mRNA と miR-142-3p が作用する配列の関係を Fig. 3-12 に示した。LPP、WASL、CBL の発現を抑制することにより miR-142-3p 過剰発現と類似の表現型を示したことから、これらが miR-142-3p 標的遺伝子群の一部である可能性が考えられた。

更にこれらの標的遺伝子候補のうち LPP に着目し、miR-142-3p が作用すると考えられる 3'UTR 配列を luciferase 発現プラスミドの下流に挿入したレポーターベクターを構築し、miR-142-3p 導入による luciferase 活性の変動を測定した。また、miR-142-3p が作用しないように seed 配列に対応する領域を塩基置換した変異体ベクターも構築して比較した。レポーターベクターに挿入した配列を Fig. 3-13A に示す。

その結果、レポーターベクターと共に miR-142-3p を導入した細胞では、コントロール miRNA 導入を導入した細胞に比べ、luciferase 活性が大きく減弱し、ヒト LPP でもマウス LPP でも同様であった。一方、変異体ベクターの場合、miR-142-3p 導入でも luciferase 活性は変化しなかった (Fig. 3-13B)。これは、miR-142-3p が LPP の 3'UTR に含まれる配列に直接作用して、LPP の発現低下に関与していることを示唆している。

miR-142-3p 欠失マウス由来マスト細胞の脱顆粒反応

更に、miR-142-3p の脱顆粒反応に対する作用の普遍性を検証するため、マ

ウスでの作用を検討した。マウス初代培養マスト細胞へ miRNA mimic や inhibitor を *in vitro* で導入することは困難であったため、全身の miR-142-3p を欠失させた KO マウスを作成して影響を調べることにした。miRNA データベース (miRBase ver.19) において、マウス miR-142-3p は 11 番染色体に位置し、ヒト miR-142-3p 配列と比較した結果、両者の配列は完全に完全に一致していた (Fig. 3-14A)。miR-142-3p の欠失は、ES 細胞での相同性組換えにより、miR-142-3p を含む前駆体領域 (mir-142) を neomycin 耐性遺伝子に置き換えることで作製した (Fig. 3-14B)。

mir-142 欠失ホモ体は胎生致死になることなく通常通り出生した。そこで、野生型マウス、ヘテロ体マウス、ホモ体マウス、それぞれの成体から骨髓細胞を単離し、*in vitro* で成熟マスト細胞へ分化させ、TNP-IgE による感作と翌日の TNP 刺激により、脱顆粒反応の活性を測定した。その結果、野生型由来の骨髓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 (Fig. 3-14C)。

マウスの初代培養系でも miR-142-3p が欠失すると IgE 経路の刺激による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 IgE 経路の刺激による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。

第3節 FcεRI 経路に非依存的な脱顆粒に関する miRNA の探索

緒言

これまでの検討から、miR-142-3p が FcεRI 依存的に脱顆粒反応を促進させる機能を有していることが明らかとなった。

一方、Dicer に対する siRNA を導入した LAD2 を用いた結果より、抗 IgE 抗体刺激による FcεRI 依存的な脱顆粒反応だけでなく、compound 48/80 刺激による FcεRI 非依存的な脱顆粒反応に対しても、miRNA による制御機構が関与することが示された。従って、FcεRI 非依存的な脱顆粒反応に対しては、miR-142-3p ではなく、別の miRNA により制御されていると考えられる。

そこで本節ではマスト細胞の脱顆粒反応において miRNA 機構による制御の全体像を解明するため、FcεRI 非依存的な脱顆粒反応に関する miRNA の探索を試みた。

compound 48/80 刺激で脱顆粒反応が促進する miRNA

LAD2 に対して compound 48/80 単独で惹起される脱顆粒反応は抗 IgE 抗体刺激に比べ比較的大きいため、この活性が更に促進するか否かの判定は難しいと考えられた。従って、miRNA ライブラリを用いた機能スクリーニングでは compound 48/80 単独刺激ではなく、Dicer siRNA 導入下で脱顆粒活性が低下した LAD2 に対して、compound 48/80 刺激をおこなう条件での探索を実施した。

Dicer siRNA および miRNA mimic を共導入した LAD2 に対して、3 日後に compound 48/80 刺激をおこない、脱顆粒反応の活性を測定し、miRNA mimic の陰性対照導入区での脱顆粒活性を 1.0 とした時の相対活性を算出した。全 417

種の miRNA mimic の導入実験を 2 回独立しておこない、どちらかで相対活性が 100%以上を示した miRNA を選抜した。

417 種の miRNA mimic 導入実験は 96 well plate 下での検討であるため、選抜した miRNA について、6 well plate にて Dicer siRNA との共導入による脱顆粒反応を測定した。その結果、特に miR-29a、29b、29c が、Dicer siRNA 導入による脱顆粒反応の抑制をレスキューし、脱顆粒反応を促進させることを見出した (Fig. 3-15A)。Mrgx2 遺伝子は compound 48/80 の受容体と考えられている GPCR であり(27)、コントロールとして用いた。

miR-29 family の解析

miR-29a、29b、29c について、Dicer に対する siRNA を導入した LAD2 に対する作用だけでなく、miRNA mimic 単独導入での作用も検討した。その結果、miR-29a、29c mimic だけを導入した LAD2 でも compound 48/80 刺激による脱顆粒反応の促進効果が確認された (Fig. 3-15B)。

miR-29a、29b、29c は Fig. 3-15C で示す通り seed 配列が同一であり、全体の相同性も非常に高く、miR-29 family を形成していると言える。第 2 節で検討した LAD2 における miRNA プロファイリングの結果、miR-29 family 全ての発現が確認され、その中でも miR-29c が高い発現量を示した。このことから、miR-29 family が compound 48/80 刺激による脱顆粒反応を促進させる活性は、単なる強制発現によるアーティファクトではなく、LAD2 での本来の機能を反映していると考えられる。

miR-29 family のうち、特に発現が高い miR-29c について機能を推定するため、miR-29c mimic を LAD2 に導入し、48 時間後の mRNA アレイ解析を実施した。陰性対照コントロール導入群に対して 1.5 倍以上発現が低下した遺伝子リストを Table 3-5 に示した。これらのうち、miGTS 法により miR-29c の標

的遺伝子として *in silico* で予測されたものは、TSPAN5、FZD5、NUCKS1 の
3 種であった。

第4章 考察

マスト細胞の脱顆粒に関与する miRNA の探索

miRNA による発現制御機構が細胞増殖や分化など、多様な生物学的プロセスに関与することは知られているが、マスト細胞の脱顆粒反応における miRNA の関与についてはほとんど知られていない。まず私は miRNA の生合成に必須な Dicer 遺伝子の発現を siRNA で抑制した状態のマスト細胞株 LAD2 に対し、IgE 依存的な刺激で脱顆粒を惹起させた。その結果、コントロール群に比べて脱顆粒反応が低下したことを見出した。これは miRNA 生合成経路の抑制により総 miRNA 量が減少すると脱顆粒反応が低下したことを示唆しており、miRNA 機構自体は本来、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。

LAD2 での脱顆粒に関与する miRNA を特定する一環として、3 つの異なる手法で LAD2 で発現する miRNA をプロファイリングした。具体的には、低分子 RNA ライブラリ作製、MPSS 法、miRNA マイクロアレイである。どの手法を用いても miR-142-3p が LAD2 において高い発現を示すことが確認できた。低分子 RNA ライブラリ作製と MPSS 法はどちらも低分子 RNA を抽出して、両端にアダプターを結合し逆転写したものをクローニングして配列を取得するという点で共通している。一方、miRNA マイクロアレイ法は mature miRNA 配列に対応した複数のプローブとのハイブリダーゼーションによる検出であり、直接の配列シーケンスとは異なり、miRNA 前駆体や一塩基のみ異なる miRNA など類似の miRNA を検出する懸念があり、各 miRNA の Tm 値が異なるという問題点もある。しかし、プローブ配列を 60 塩基長にして一つのプローブに mature miRNA 配列を複数搭載し Tm 値を一定に揃えていること、また、ラベリング手法を工夫することで miRNA 前駆体とのハイブリダイゼーションを回

避していることから、これらの懸念を解消している(28)。3種の異なる手法でプロファイリングした結果を比較すると、上位に位置する miRNA は概ね同じであった。特に、miR-142-3p、miR-21 はどの手法でも上位に位置した。一方、miR-494 は miRNA マイクロアレイでは最もシグナル値が高い結果であったが、低分子 RNA ライブラリ、および MPSS 法では一つもクローニングされなかった (data not shown)。miR-494 をコードするゲノム領域はリピート由来ではなく、各種データベースに対する検索で相同性の高い配列は見出せなかったことから、LAD2 に存在する別の配列を検出した可能性は低い。miR-494 の末端塩基が修飾されているなどの理由でクローニングできなかった、との可能性は否定できないが、miRNA マイクロアレイを開発したグループから、miR-494 は他のほとんどの miRNA とは異なりヒトの種々の組織由来 RNA に対して同じシグナル値を示すことが報告されており(29)、マイクロアレイのプローブ配列設計に由来する何らかのアーティファクトではないかと考えられる。

LAD2 で発現する miRNA プロファイリングの結果、miR-142-3p は高発現する miRNA であることが示された。miR-142-3p は血液系細胞で高発現する miRNA として知られており(22)、免疫細胞の一種であるマスト細胞株 LAD2 でも高い発現を示したことは、これまでの知見とも一致する。miR-142-3p は特に分化過程での機能が知られており、例えば miR-142-3p の強制発現により T 細胞への分化が亢進することや、miR-142-3p の発現が低下することで Treg の機能が発揮される(30)などの報告があるが、脱顆粒との関連は報告されていない。

これまでマスト細胞の脱顆粒に関与する miRNA として miR-221 が報告されている(31)。miR-221 を強制発現したマウス骨髄由来マスト細胞では IgE 経路の刺激により脱顆粒反応が促進されることが示されているが、我々の結果では miR-221 mimic を LAD2 に導入しても抗 IgE 抗体刺激による脱顆粒反応に対

して大きな影響は検出されなかった。この違いは、miRNA 過剰発現方法が miRNA mimic 分子の導入とレンチウイルスベクター導入との点で違いがあること、あるいは評価細胞がヒト LAD2 細胞株とマウス骨髄由来マスト細胞とで異なること、に起因する可能性があると考えられる。

本研究では miRNA ライブラリを用いて脱顆粒を指標として機能スクリーニングも実施した。まず脱顆粒に影響を与える miRNA を幅広く選抜する目的で、96 well plate を用いたアッセイを実施した。脱顆粒の相対活性の分散が、トランスフェクション 3 日後より 8 日後の方がやや増大しており、8 日後の脱顆粒活性では miRNA による直接の効果だけでなく、二次的効果の影響を受ける可能性があることを示唆すると考えられた。96 well plate による評価の後、促進活性を示した miRNA について 6 well plate を用いた評価を実施した。96 well plate での評価では、評価した miRNA の約半数が程度の大小はあるものの脱顆粒促進活性を示したが、6 well plate で顕著な促進活性を示したものは、miR-200c など極わずかであった。96 well plate での機能スクリーニング時には、miRNA mimic の transfection が reverse 法であり、また、細胞を含んだ well において β -hexosaminidase 量を測定しているが、6 well plate では miRNA mimic を forward transfection で導入し細胞上清を回収して β -hexosaminidase 量を測定しており、この違いが反映されたものと考えられる。大量の miRNA を評価するために、96 well plate での評価はやむを得なく、一般に薬剤スクリーニングなどでは良く用いられる手法であるが、その後の 6 well plate による評価での絞り込みが重要であると考えられた。

機能スクリーニングで miR-142-3p 以外にも miR-200c など幾つかの miRNA も脱顆粒促進活性を示す miRNA として見出すことができた。これらの miRNA は LAD2 でほとんど発現していないことから、LAD2 において脱顆粒反応に関与しているとは考えにくい。しかし本 miRNA 配列が脱顆粒反応を促進させる

活性を有することから、この miRNA の作用点を解析することで、脱顆粒に関する新しい知見が得られる可能性はあると考えられる。

マスト細胞の脱顆粒反応における miR-142-3p の役割

第3章第2節では miR-142-3p は LAD2 において過剰発現すると抗 IgE 抗体刺激での脱顆粒反応の活性が増加し、逆に miR-142-3p の阻害により抗 IgE 抗体刺激での脱顆粒反応の活性が低下したことを示した。β-hexosaminidase による脱顆粒反応だけでなく、細胞内カルシウム量の変動という指標でも同様の結果を示した。これは、LAD2 の miR-142-3p 量と脱顆粒反応の活性とが相関することを示している。つまり、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。

第1節において、Dicer siRNA を導入した LAD2 では抗 IgE 抗体刺激による脱顆粒反応が低下したことを示したが、miR-142-3p mimic を導入により Dicer siRNA 導入による脱顆粒反応低下をレスキューできたことから、このことが支持される。

miR-142-3p は白血病細胞株 K562 の増殖を抑制するという報告があり(32)、LAD2 においても miR-142-3p mimic を 30 nM 導入した群において若干の細胞増殖抑制が検出された。しかし、脱顆粒活性は細胞に含まれる β-hexosaminidase 量に対して刺激により放出された割合で評価しているため、脱顆粒活性の評価が細胞増殖の影響を受けることはないと考えられる。

compound 48/80 による刺激では、Dicer siRNA を導入した LAD2 において脱顆粒反応が低下し、抗 IgE 抗体刺激と同様の結果であったが、miR-142-3p mimic を導入しても compound 48/80 刺激での脱顆粒反応は低下したままであり、抗 IgE 抗体刺激とは異なった結果を示した。また、miR-142-3p mimic およびアンチセンス導入をそれぞれ単独に導入した場合でも、compound 48/80

刺激による脱顆粒反応に対して大きな影響は与えなかった。この結果は compound 48/80 刺激による脱顆粒反応にも miRNA 機構は関与しているが、miR-142-3p ではなく別の miRNA が関与していることが示唆される。つまり、miR-142-3p の LAD2 に対する脱顆粒反応の促進活性は、compound 48/80 など IgE 非依存的な経路には作用せず、Fc ϵ RI を介した IgE 経路依存的な経路に作用すると考えられる。compound 48/80 刺激による脱顆粒反応も細胞内カルシウム動員により脱顆粒反応が惹起されることから(33, 34)、miR-142-3p の作用点は Fc ϵ RI で架橋されたシグナルが伝わり細胞内カルシウム動員が起こるまでの間にあると推察される。

なお、抗 IgE 抗体による刺激の有無で LAD2 の miR-142-3p 発現量が変動することはなかった。このことは、miR-142-3p が発現上昇して脱顆粒反応を促進させるのではなく、IgE 経路の刺激の前から脱顆粒反応の活性度を規定する因子として機能していると考えられる。

LAD2 はヒト由来のマスト細胞株であり、より普遍的な miR-142-3p の作用を検証するため miR-142-3p 欠失マウスを作製した。ホモ KO 体は致死にならず出生したことから、miR-142-3p が血球系細胞の分化に関わるものの、発生に致命的な影響を与えることはないことが示された。これまでに多くの miRNA 欠損マウス作製が報告されているが、mRNA 欠損マウスに比べて致死性を示すものは少なく、何らかの刺激を与えることで初めて野生型とは異なる応答を示すものが殆どである(35-37)。miR-142-3p のホモ KO 骨髄細胞由来の初代培養マスト細胞が脱顆粒刺激に対する反応性が低下したことは、LAD2 だけでなく、マウス初代培養系でも miR-142-3p の脱顆粒反応に対する作用が示され、miR-142-3p が生物種を超えてマスト細胞一般の脱顆粒反応に対して作用している可能性が高いことを示した点で重要な意義があると考えられる。もちろん miR-142-3p の KO マウス由来の細胞がマスト細胞への分化過程に影響

が生じて脱顆粒の反応性が低下した可能性は否定できないため、この点は、今後の検討すべき課題と言える。

また、miR-142-3p の KO マウスも他の miRNA KO マウスで見られたのと同様に、刺激に対して応答が異なる表現型を示した。これは他の miRNA KO マウスでも報告されている特徴であり、miR-142-3p でも同様の特徴を示すことが確認できた。

miR-142-3p を完全に欠失しても、ある程度の脱顆粒反応は検出された。この結果は、miR-142-3p の代償機構が作用した可能性、あるいは miR-142-3p が脱顆粒反応を促進させる活性は有するものの脱顆粒の開始反応自体には関与していない可能性が考えられる。また、ヘテロ KO マウスでは脱顆粒反応に対する影響が確認できなかったため、脱顆粒反応へ影響を与えるには少なくとも内在する miR-142-3p の半分以上の阻害が必要と考えられる。

miR-142-3p KO マウスの欠損領域には miR-142-5p も含まれており、miR-142-3p KO マウスの表現型に miR-142-5p 欠損による影響も出ている可能性は否定できない。しかし、LAD2 での miRNA のプロファイリングでは miR-142-3p の方が miR-142-5p よりも発現量が高く (Table 3-1, 3-2, 3-3)、マウス骨髄細胞由来の初代培養マスト細胞でのプロファイリングでも同様の報告があることから(15)、KO マウスの表現型には miR-142-3p の影響が強く出ていると推察される。

マウス骨髄細胞由来の初代培養マスト細胞の系では、compound 48/80 刺激に対する応答は検証していない。これは、マウス骨髄細胞由来のマスト細胞は、そもそも IgE 非依存的な経路での刺激には応答しないためである(7, 38)。しかし KO マウス由来マスト細胞の結果より、miR-142-3p が IgE 依存的な経路で脱顆粒促進に関与することには変わりはない。

miRNA は多数の標的遺伝子を抑制することで、その機能を発揮する。

miRNAにより標的遺伝子の発現が抑制されることから、標的遺伝子の siRNA を導入して発現抑制した場合と、miRNA の過剰発現が類似の表現型を示すと考えられる。本研究では標的予測プログラム miGTS を用いて、miR-142-3p の seed 領域の相補配列を含む相同性の高い配列を有する遺伝子を抽出し、そのうち LPP、WASL、CBL に対する siRNA の導入によって脱顆粒反応が促進され、miR-142-3p の過剰発現と類似の表現型を示すことを明らかにした。このことから、これらの遺伝子が miR-142-3p の標的遺伝子の一部である可能性が示唆された。LPP はアクチン重合の促進因子である VASP や α -actinin に結合し、アクチン線維の調節に関与している(39)。また、WASL (別名 N-WASP) は Cdc42 で活性化されアクチン重合を促進する(40)。一般にアクチン構造は Fc ϵ RI がシグナル分子の集積する脂質ラフトへ移行することに影響を与え(41)、アクチン重合阻害によりマスト細胞の脱顆粒反応が促進されることが知られている(42)ことから、LPP や WASL もアクチン線維の調節を通じて脱顆粒反応に関与していると推察される。一方、CBL はマスト細胞において Lyn や Syk をユビキチン化することで IgE-Fc ϵ RI を介したシグナルを負に制御することから(43)、CBL を抑制することで IgE 経路依存的に脱顆粒反応が促進されると考えられる。

これらの遺伝子のうち、レポーターアッセイの結果から LPP が miR-142-3p で直接制御されることが明らかとなった。本実験は LAD2 ではなく HepG2 細胞での結果であるが、LPP の 3'UTR 配列に miR-142-3p が直接作用して発現を制御していると考えられる。他の標的遺伝子でも同様の事象の有無を確認するとともに、LAD2 を用いたレポーターアッセイにより、LAD2 で発現する他の miRNA との競合などが起きていないか等を確認して、標的遺伝子としての精査を更に進めることも必要である。

miRNA により制御される標的遺伝子は数百に上り、そうした制御の総和が

miRNA の性質を決定していると言われている(44)。今回 miR-142-3p の標的遺伝子候補として LPP、WASL、CBL を示したが、それぞれの siRNA 導入により促進された脱顆粒反応の程度は、miR-142-3p 導入よりも影響が小さかった。従って、これらは標的遺伝子群の一部にすぎず、他にも多くの標的遺伝子が存在し、これらが複数制御されることで miR-142-3p の脱顆粒反応の促進という活性につながると考えられる。

FcεRI 経路に非依存的な脱顆粒に関与する miRNA の探索

マスト細胞の脱顆粒は、IgE を介した抗原抗体反応によりマスト細胞の表面に発現する FcεRI が架橋することで惹起されるだけでなく、FcεRI 非依存的に惹起される経路も存在する。これまでの検討結果により、Dicer siRNA を導入した LAD2 に対して、抗 IgE 抗体で刺激した場合も、compound 48/80 で刺激した場合も脱顆粒反応が低下したことから、どちらの経路でも miRNA 機構が関与していることが明らかとなった。FcεRI 依存的な脱顆粒には、miR-142-3p が重要な役割を担っているが、compound 48/80 刺激のような FcεRI 非依存的な脱顆粒には関与していなかった。

もともと LAD2 において compound 48/80 刺激による脱顆粒は IgE 刺激よりも強いため、FcεRI 経路非依存的な脱顆粒に関与する miRNA の探索には、単独で miRNA を過剰発現させて脱顆粒の活性増強を調べるよりも、Dicer siRNA による活性低下をレスキューする miRNA を探索した方が感度がよいと考え、本手法で実施した。その結果、miR-29 family を導入した LAD2 では compound 48/80 による刺激での脱顆粒反応を促進することを見出した。Dicer siRNA 導入による脱顆粒反応の低下もレスキューしたため、LAD2 では少なくとも compound 48/80 刺激による脱顆粒反応に miR-29 family が寄与していると考えられる。

miR-29 family は、CDK6 に作用して細胞増殖を制御する(45)、あるいは IFN γ の産生を抑制して免疫応答に関与する(46)、等の報告があるものの、マスト細胞に関連した機能の報告はない。本研究では miR-29 family 作用点解明の一助として、miR-29c を導入した LAD2 で発現が低下した mRNA を抽出した。1.5 倍以上低下した遺伝子 51 種が抽出されたが、seed 配列の相補性を基にした *in silico* 解析により miR-29c 配列が抑制する可能性のある遺伝子は 3 つに留まった。これは、miR-29c を導入して 48 時間後の mRNA 発現を解析したため、miR-29c の直接の標的だけでなく、標的遺伝子の抑制により引き起こされる 2 次的な遺伝子発現制御の影響を受けたためと考えられる。miR-29c 配列が直接作用する配列を有し、miR-29c 導入により発現が低下した遺伝子として、frizzled family の一つである frizzled 5 (FZD5)、tetraspanin family の一つである tetraspanin 5 (TSPAN5)、nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1 (NUCKS1)、を見出した。FZD5 および TSPAN5 は細胞膜上に、NUCKS1 は核内で作用する遺伝子であり、脱顆粒との関連は現時点では不明であるが、今後、これらの機能を調べることで、Fc ϵ RI 非依存的な脱顆粒機構の詳細が解明されるものと期待される。

第5章 総括

本論文は、マスト細胞の脱顆粒と miRNA との関連を解明することにより、新しい生物学的知見を得、アレルギー疾患に対する新規創薬標的分子としての可能性を提示することを主題としている。

まず第1章では、創薬標的分子の拡大という点で miRNA に着目する意義を説明し、miRNA の生合成や疾患との関連についての現状を紹介した。また、アレルギー疾患におけるマスト細胞の重要性を概説し、マスト細胞の脱顆粒と miRNA との関連を解明する意義を明確にした。

第2章では、本研究に用いた材料と方法について述べた。

第3章は3つの節に分け、第1節ではまずマスト細胞の脱顆粒に miRNA 機構が関与するかを検証するために、Dicer siRNA を導入したヒトマスト細胞株 LAD2 に FcεRI 依存的な刺激による脱顆粒を惹起させた。Dicer siRNA 導入で miRNA 量全体が低下すると FcεRI 依存的な脱顆粒反応の低下が確認できたことから、脱顆粒反応に miRNA 制御機構が関与していることが明らかとなった。そこで脱顆粒に関与する特定の miRNA を同定するため、LAD2 で発現する miRNA のプロファイリング、各 miRNA mimic 導入による脱顆粒活性測定をおこない、LAD2 で高発現を示す miR-142-3p が FcεRI 依存的な脱顆粒反応を担う miRNA であることを明らかにした。

第2節では、脱顆粒における miR-142-3p の機能をより詳細に解析した。miR-142-3p は、LAD2 における量と脱顆粒活性とが相関し、Dicer siRNA 導入による脱顆粒反応低下をレスキューしたことから、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された。miR-142-3p は脱顆粒刺激時に発現が変動しないことから、脱顆粒反応の活性度を規定する

因子として機能することが示唆された。こうした miR-142-3p の作用は FcεRI 依存的な刺激で惹起される脱顆粒反応において機能を発揮するが、compound 48/80 のような FcεRI 非依存的な刺激での脱顆粒反応には無関係であった。また、miR-142-3p KO マウスを作製し、ホモ体では脱顆粒反応が抑制されたことから、miR-142-3p の機能が生物種を超えて保存されている可能性についても議論した。今後の課題は、標的遺伝子の同定や発現制御を含めた miR-142-3p 作用の更なる解明、マウスマスト細胞における miR-142-3p のより詳細な解析、などである。

miR-142-3p は FcεRI 非依存的な脱顆粒反応には関与していないが、Dicer siRNA を導入した LAD2 において、compound 48/80 刺激でも脱顆粒反応の活性が低下したことから、miR-142-3p とは別の miRNA が関与していると考えられた。そこで第3節では、Dicer siRNA 導入 LAD2 に対し、compound 48/80 刺激で脱顆粒反応をレスキューする miRNA の探索をおこない、miR-29 family を見出した。

第4章では第3章の各節の結果を踏まえて、それぞれ考察した。

miRNA の機能として、細胞増殖や分化など発生に関与する報告が多いが、本研究は脱顆粒の活性度を規定する miRNA が刺激の種類に応じて存在することを示した。脱顆粒は即時的な反応機構であり、こうした生命現象にも miRNA が関与していることは、脱顆粒反応に留まらず、数多くの生理現象に miRNA 機構が関与していることが示唆され、癌以外にも様々な疾患発症に miRNA が関与していることが考えられる。

本研究を通じてマスト細胞の脱顆粒反応に関与する miRNA を見出した。特に、miR-142-3p は FcεRI 依存的に脱顆粒反応を促進し、この制御機構が広い生物種で保存されている可能性を示した。この結果より、miR-142-3p 等を制

御することでアレルギー疾患に対する創薬の可能性が提示できたと考えられる。現在、miRNA の発現を制御する技術や生体内への核酸送達技術が進んで、miRNA を標的とした医薬品の一つが臨床開発段階に入っており(47)、miRNA 分子を標的とした創薬が更に加速していくと期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの貴重なご教示とご激励を賜りました協和発酵キリン株式会社の吉田哲郎博士、大阪大学微生物病研究所の蓮輪英毅博士に厚くお礼を申し上げます。

また、本研究の共同研究者として大変お世話になりました小坂恭子研究員、宮澤達也研究員、倉田和美研究員、および実験のサポートを頂いた神垣昌世氏、羽山和美氏、滝いづみ氏に深く感謝致します。

最後に、数々の有効なアドバイスをいただきました協和発酵キリン株式会社の皆様に感謝致します。

2014年1月 山田陽史

引用文献

1. Mattick JS. (2001) Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.* 2:986-91.
2. Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
3. Kozomara A, Griffiths-Jones S. (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 39:D152-D157.
4. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 11:228-234.
5. Kloosterman WP, Plasterk RH. (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell.* 11:441-450.
6. Croce CM. (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 10:704-714.
7. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. (1997) Mast cells. *Physiol Rev.* 77:1033-1079.
8. Kalesnikoff J, Galli SJ. (2008) New developments in mast cell biology. *Nat Immunol.* 9:1215-1223.
9. Rodrigo GJ, Neffen H, Castro-Rodriguez JA. (2011) Efficacy and safety of subcutaneous omalizumab vs placebo as add-on therapy to corticosteroids for children and adults with asthma: a systematic review. *Chest.* 139:28-35.
10. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. (2006)

NF κ 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.

11. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862.
12. Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H, Takayama M, Asada K, Mirochnitchenko O, Inouye M, Kato I. (2006) The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Res.* 34:1765-1771.
13. Nakano H, Miyazawa T, Kinoshita K, Yamada Y, Yoshida T. (2010) Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells. *Int J Cancer.* 127:1072-1080.
14. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. (2001) Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 167:2250-2256.
15. Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, Socci ND, Krichevsky AM, Thai TH, Rajewsky N, Marks DS, Sander C, Rajewsky K, Rao A, Kosik KS. (2005) MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol.* 6:R71.
16. Mayoral RJ, Pipkin ME, Pachkov M, van Nimwegen E, Rao A, Monticelli S. (2009) MicroRNA-221-222 regulate the cell cycle in mast cells. *J Immunol.* 182:433-445.
17. Kirshenbaum AS, Akin C, Wu Y, Rottem M, Goff JP, Beaven MA, Rao

- VK, Metcalfe DD. (2003) Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcεRI or FcγRI. *Leuk Res.* 27:677-682.
18. Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *293*:834-8.
19. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2257-2261.
20. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, Brown D, Slack FJ. (2007) The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 67:7713-7722.
21. Bellon M, Lepelletier Y, Hermine O, Nicot C. (2009) Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood.* 113:4914-4917.
22. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA. (2007) Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 67:2456-2468.
23. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 303:83-86.

24. Kraft S, Kinet JP. (2007) New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol.* 7:365-378.
25. Nakajima T, Inagaki N, Tanaka H, Tanaka A, Yoshikawa M, Tamari M, Hasegawa K, Matsumoto K, Tachimoto H, Ebisawa M, Tsujimoto G, Matsuda H, Nagai H, Saito H. (2002) Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fcεreceptor I cross-linking: an interspecies comparison. *Blood.* 100:3861-3868.
26. Ferry X, Brehin S, Kamel R, Landry Y. (2002) G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. *Peptides.* 23:1507-1515.
27. Tatemoto K, Nozaki Y, Tsuda R, Konno S, Tomura K, Furuno M, Ogasawara H, Edamura K, Takagi H, Iwamura H, Noguchi M, Naito T. (2006) Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 349:1322-8.
28. Wang H, Ach RA, Curry B. (2007) Direct and sensitive miRNA profiling from low-input total RNA. *RNA.* 13:151-159.
29. Ach RA, Wang H, Curry B. (2008) Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnol.* 8:69.
30. Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, Zhang GM, Feng ZH. (2009) miR-142-3p restricts cAMP production in CD4⁺CD25⁻ T cells and CD4⁺CD25⁺ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep.* 10:180-185.
31. Mayoral RJ, Deho L, Rusca N, Bartonicek N, Saini HK, Enright AJ,

- Monticelli S. (2011) MiR-221 influences effector functions and actin cytoskeleton in mast cells. *PLoS One*. 6:e26133.
32. Sun W, Shen W, Yang S, Hu F, Li H, Zhu TH. (2010) miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP- β . *Cell Res*. 20:1158-1169.
33. Senyshyn J, Baumgartner RA, Beaven MA. (1998) Quercetin sensitizes RBL-2H3 cells to polybasic mast cell secretagogues through increased expression of Gi GTP-binding proteins linked to a phospholipase C signaling pathway. *J Immunol*. 160:5136-5144.
34. Kashem SW, Subramanian H, Collington SJ, Magotti P, Lambris JD, Ali H. (2011) G protein coupled receptor specificity for C3a and compound 48/80-induced degranulation in human mast cells: roles of Mas-related genes MrgX1 and MrgX2. *Eur J Pharmacol*. 668:299-304.
35. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 316:575-579.
36. Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliott JL, Bassel-Duby R, Sanes JR, Olson EN. (2009) MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. 326:1549-1554.
37. Zheng GX, Ravi A, Calabrese JM, Medeiros LA, Kirak O, Dennis LM, Jaenisch R, Burge CB, Sharp PA. (2011) A latent pro-survival function for the mir-290-295 cluster in mouse embryonic stem cells. *PLoS Genet*. 7:e1002054.

38. Ogasawara T, Murakami M, Suzuki-Nishimura T, Uchida MK, Kudo I. (1997) Mouse bone marrow-derived mast cells undergo exocytosis, prostanoid generation, and cytokine expression in response to G protein-activating polybasic compounds after coculture with fibroblasts in the presence of c-kit ligand. *J Immunol.* 158:393-404.
39. Grunewald TG, Pasedag SM, Butt E. (2009) Cell Adhesion and Transcriptional Activity - Defining the Role of the Novel Protooncogene LPP. *Transl Oncol.* 2:107-116.
40. Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell.* 97:221-231.
41. Holowka D, Sheets ED, Baird B. (2000) Interactions between FcεRI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 113:1009-1019.
42. Frigeri L, Apgar JR. (1999) The role of actin microfilaments in the down-regulation of the degranulation response in RBL-2H3 mast cells. *J Immunol.* 162:2243-2250.
43. Molfetta R, Peruzzi G, Santoni A, Paolini R. (2007) Negative signals from FcεRI engagement attenuate mast cell functions. *Arch Immunol Ther Exp.* 55:219-229.
44. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 455:58-63.
45. Zhao JJ, Lin J, Lwin T, Yang H, Guo J, Kong W, Dessureault S,

- Moscinski LC, Rezania D, Dalton WS, Sotomayor E, Tao J, Cheng JQ. (2010) microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood*. 115:2630-2639.
46. Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, Liu M, Hua M, Li N, Yao H, Cao X. (2011) The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat Immunol*. 12:861-869.
47. Jackson AL, Levin AA. (2012) Developing microRNA therapeutics: approaching the unique complexities. *Nucleic Acid Ther*. 22:213-225.

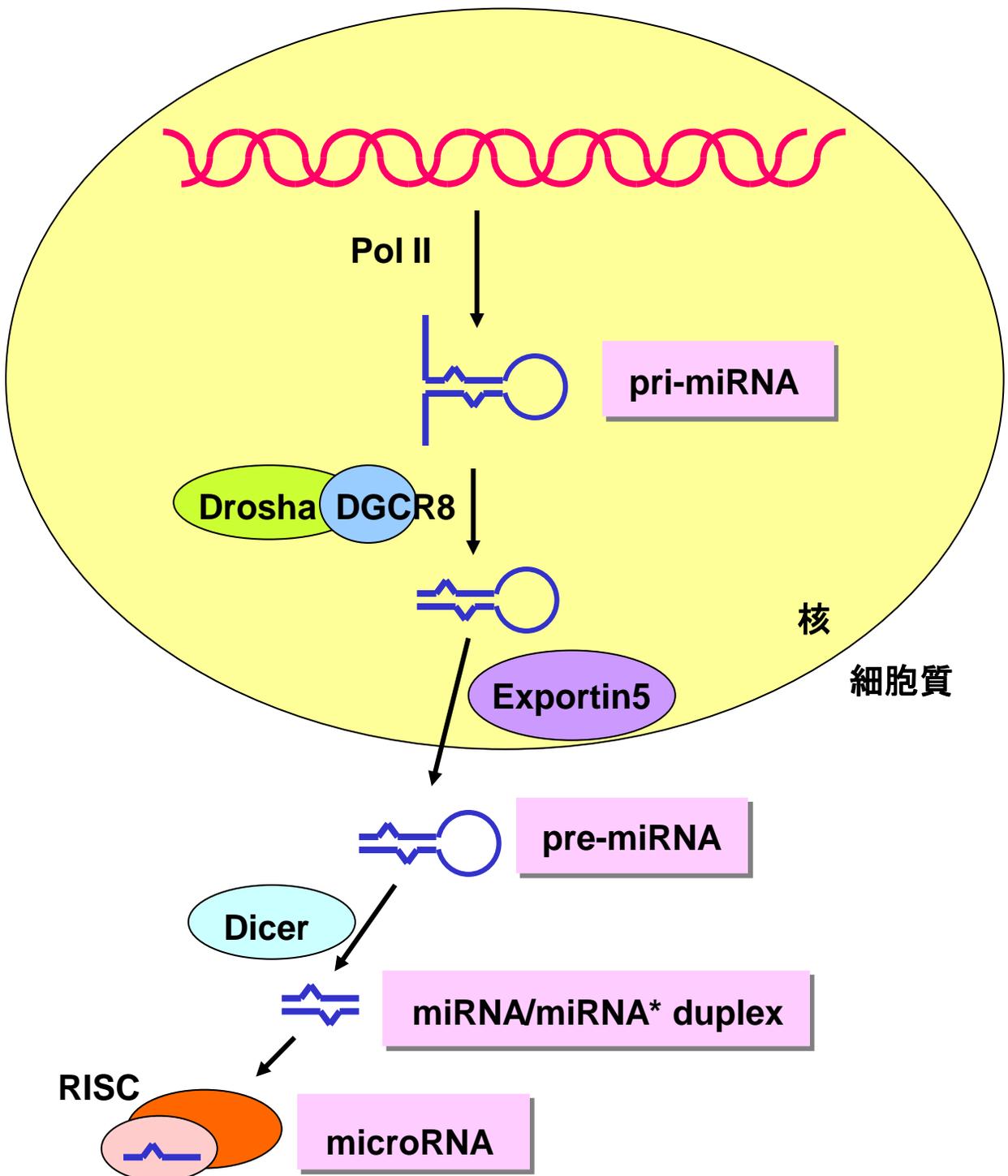


Figure. 1-1 miRNAの生合成経路

miRNAはpol IIIによりpri-miRNAとして転写されpre-miRNAにプロセッシングされる。Exportin5を介して細胞質へ輸送されDicerにより切断されてmiRNA/miRNA*二本鎖が生成される。このうち一方の鎖がRISCに取り込まれ、miRNAとして機能する。

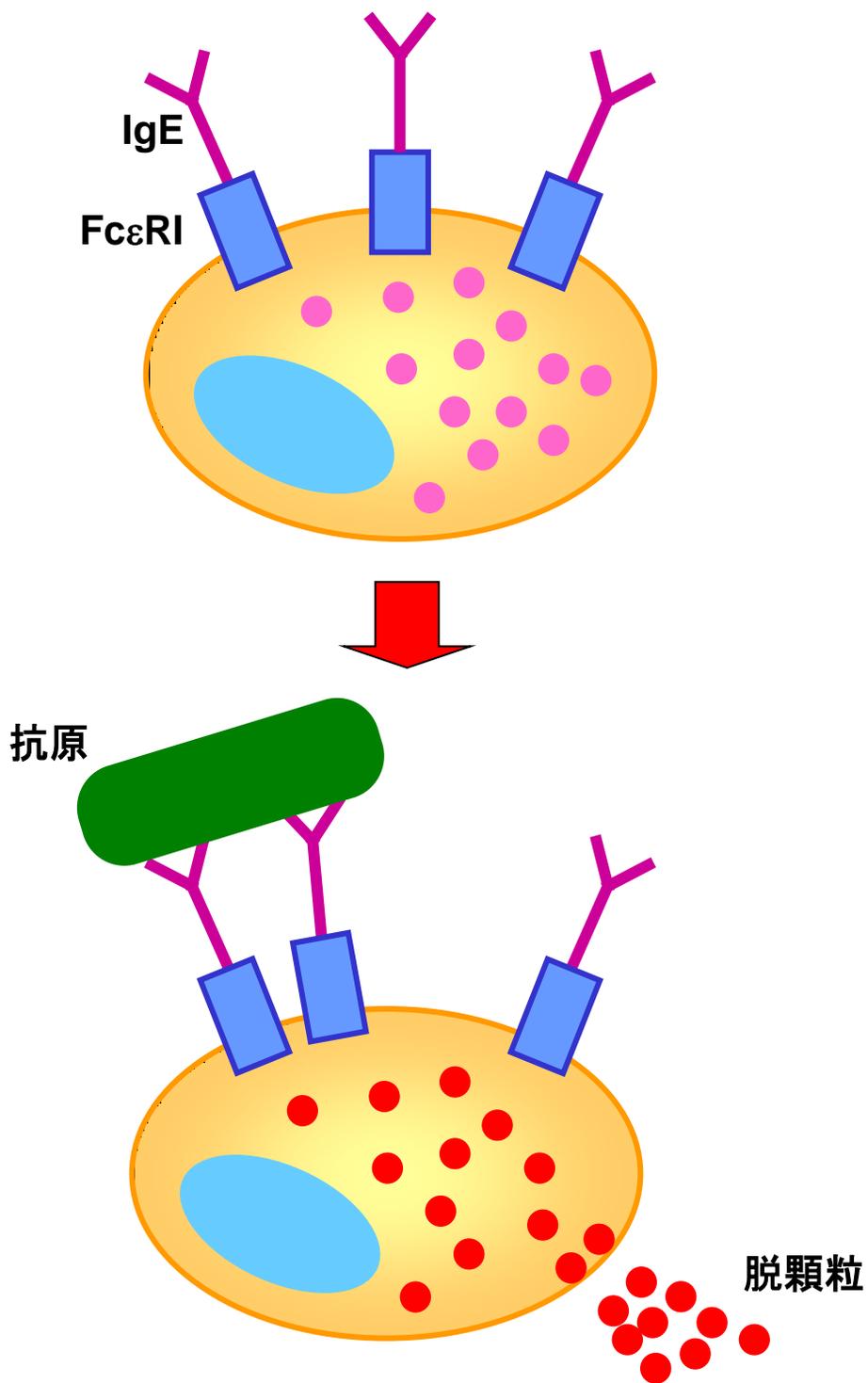


Figure. 1-2 IgEを介したマスト細胞の脱顆粒機構

マスト細胞表面に発現するFcεRIにIgE抗体が結合し、生体外の多価抗原やIgE抗体がIgEに結合して架橋することでFcεRIが凝集すると脱顆粒反応が惹起される

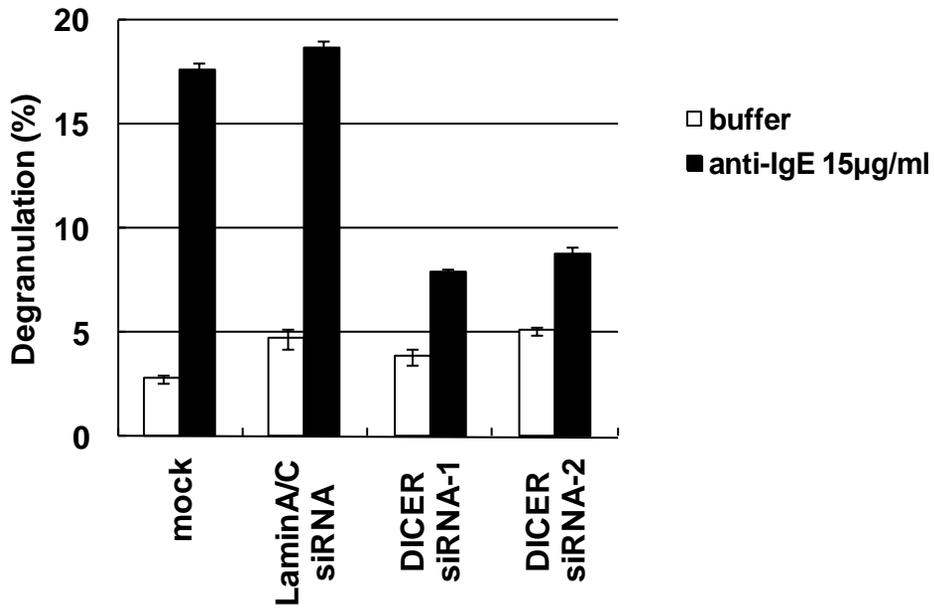


Figure. 3-1 各種siRNA導入後の脱顆粒反応

LAD2に各siRNA 30 nM導入7日後、抗IgE抗体刺激(■)あるいは無刺激(□)にて惹起させた脱顆粒活性を示す。測定は3回おこない、 β -hexosaminidase release活性の平均値 \pm SDで表した。

miRNA name	Count	(%)
miR-142-3p	796	24.38
miR-21	243	7.44
let-7a	185	5.67
let-7f	172	5.27
miR-16	139	4.26
miR-23a	119	3.64
miR-221	103	3.15
miR-146a	98	3.00
miR-29c	98	3.00
miR-15b	92	2.82
miR-30c	61	1.87
let-7b	53	1.62
let-7g	50	1.53
miR-26b	49	1.50
miR-29b	46	1.41
miR-191	45	1.38
miR-30b	45	1.38
miR-34a	45	1.38
miR-181a	44	1.35
miR-223	42	1.29
miR-106b	38	1.16
let-7i	37	1.13
miR-103	35	1.07
miR-125a	34	1.04
miR-142-5p	30	0.92
miR-24	26	0.80
miR-29a	25	0.77
miR-222	24	0.74
miR-17-5p	22	0.67
let-7d	22	0.67
other miRNAs	447	13.69
total	3265	

Table. 3-1 低分子RNAライブラリ作製によるLAD2発現miRNAのプロファイリング
miRBase ver.9.2に従って既知miRNAを分類し、上位30位までのmiRNAを示した。

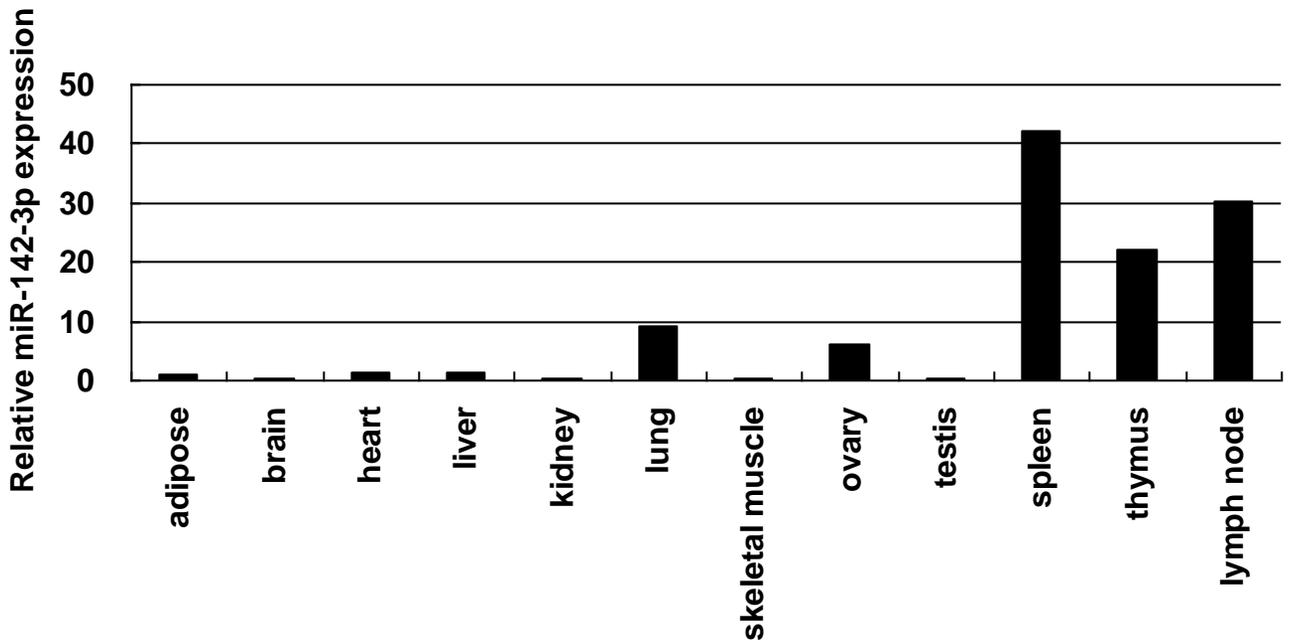


Figure. 3-2 ヒト各種組織中のmiR-142-3p発現量

ヒト各種正常組織中のmiR-142-3p相対発現量を示した。脂肪組織での発現量を1.0とした場合の相対発現量で表した。

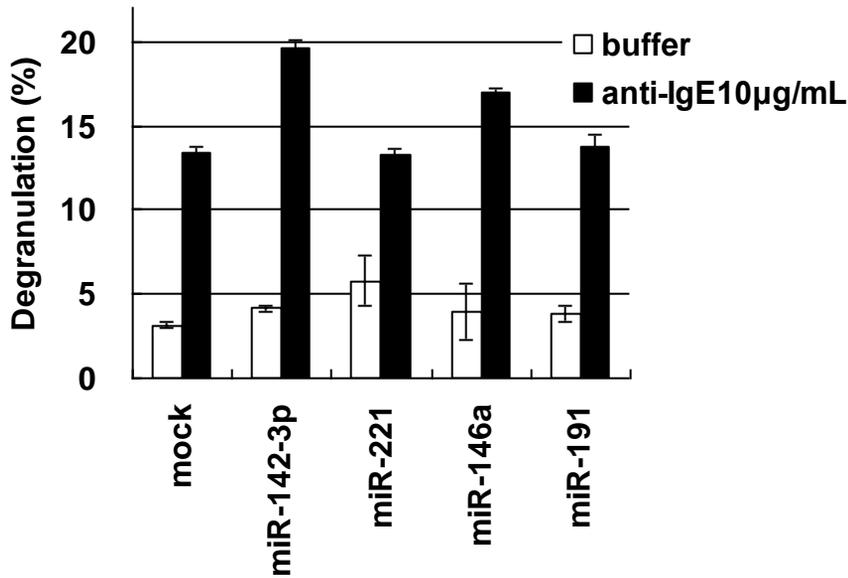
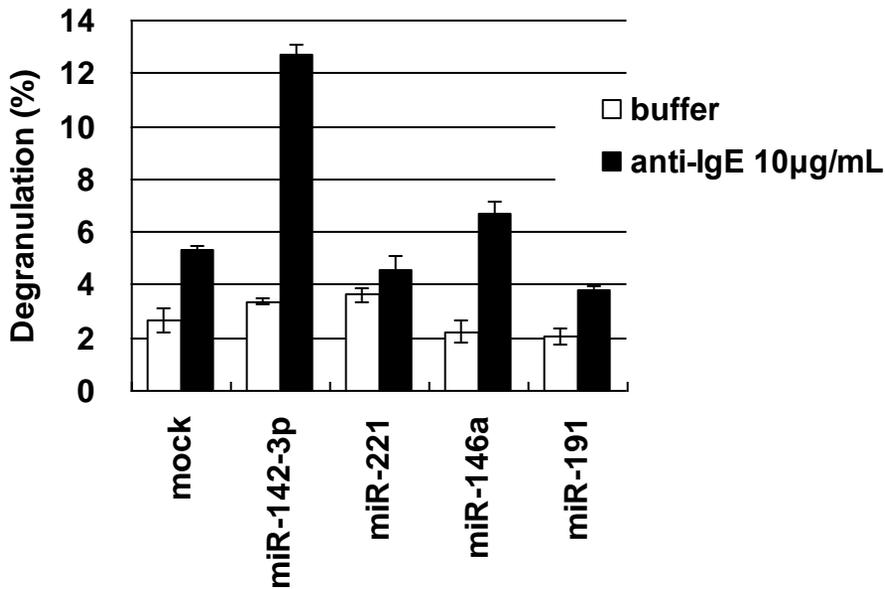
A**B**

Figure. 3-3 各種miRNA mimic導入細胞の脱顆粒反応

LAD2に各miRNA mimic 30nM導入3日後(A)および7日後(B)、抗IgE抗体刺激(■)あるいは無刺激(□)にて惹起させた脱顆粒活性を示す。測定は3回おこない、 β -hexosaminidase release活性の平均値 \pm SDで表した。

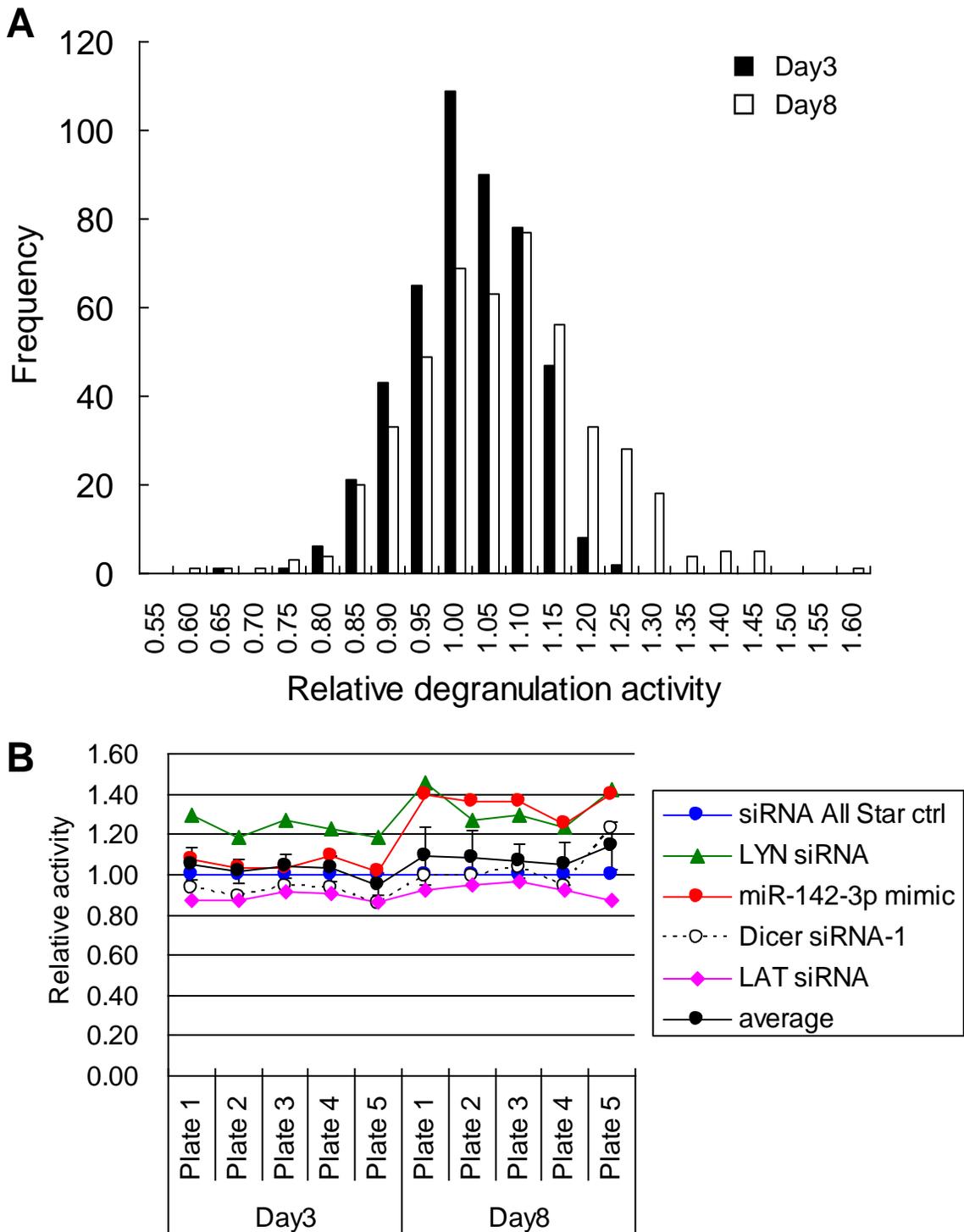


Figure. 3-4 機能スクリーニングによるmiRNAの探索

A: 各miRNA mimicを導入した脱顆粒活性の相対値のヒストグラムを示した。■はDay3、□はDay8における測定結果を示す。相対活性は陰性対照であるsiRNA All Star ctrl導入区における β -hexosaminidase Release%を1.0として算出した。B: 各種対照RNAの相対活性を示す。

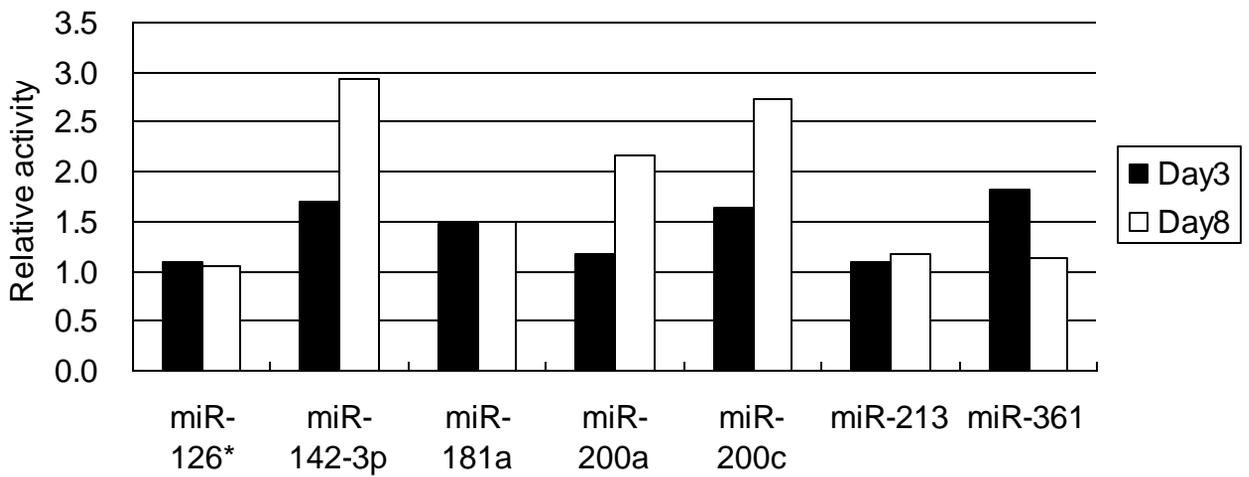


Figure. 3-5 機能スクリーニングで選抜したmiRNA導入後の脱顆粒反応

LAD2に各miRNA mimic 25 nM導入3日後(■)あるいは8日後(□)、10 μ g/mlの抗IgE抗体刺激にて惹起させた脱顆粒活性を示す。測定は3回おこない、 β -hexosaminidase release活性の平均値 \pm SDで表した。

Annotation	TPM
hsa-miR-21	27687
hsa-miR-142-3p	18674
hsa-miR-23a	18515
hsa-miR-24	14157
hsa-miR-221	13263
hsa-miR-29c	12542
hsa-miR-16	11898
hsa-miR-146a	9624
hsa-miR-27a	8389
hsa-let-7f	8065
hsa-let-7a	5602
hsa-miR-29b	5518
hsa-miR-103	5094
hsa-miR-181a	5037
hsa-miR-15b	4996
hsa-miR-34a	4994
hsa-miR-15a	4652
hsa-miR-223	4320
hsa-miR-22	4282
hsa-miR-26a	4151
hsa-miR-29a	4011
hsa-miR-142-5p	3793
hsa-miR-191	3765
hsa-miR-422b	3758
hsa-miR-26b	3492
hsa-miR-339	3361
hsa-miR-148a	3045
hsa-miR-222	2811
hsa-miR-101	2592
hsa-let-7g	2370

Table. 3-2 MPSS法によるLAD2でのmiRNAプロファイリング

TPMIは100万個あたりのクローニングタグ数 (Tags Per Million)を表し、上位30位までを示した。

miRNA Name	Signal
miR-494	4033.9
miR-29c	2792.7
let-7f	2600.3
let-7a	2520.6
miR-146a	2399.8
miR-16	2375.4
miR-142-3p	2073.4
miR-23a	1703.6
miR-21	1631.6
miR-222	1466.3
miR-370	1151.2
miR-15b	1140.9
miR-107	1140.6
miR-34a	1133.9
miR-24	1019.3
miR-29b	973.1
miR-103	967.6
miR-22	949.3
miR-27a	933.7
miR-768-3p	925.9
miR-29a	911.9
let-7b	880.0
let-7g	878.1
let-7i	834.4
miR-181a	828.5
miR-513	825.3
miR-142-5p	810.8
let-7d	764.7
let-7e	675.8
miR-422b	663.2

Table. 3-3 miRNA arrayによるLAD2のプロファイリング
 数値はアレイ解析でのシグナル値を表し、上位30位までを示した。

	Cloning		MPSS (TPM)	Array (Signal)
	(Count)	(%)		
miR-142-3p	796	24.38	18674	2073.4
miR-200a	0	0.00	2	-0.4
miR-200c	3	0.09	60	130.2
miR-361	0	0.00	708	181.1

Table. 3-4 miR-142-3p, 200a, 200c, 361のプロファイリング法の比較

低分子RNAライブラリ作製でクローニングされた個数、MPSS法でのTPM値、miRNAアレイでのシグナル値を示した。

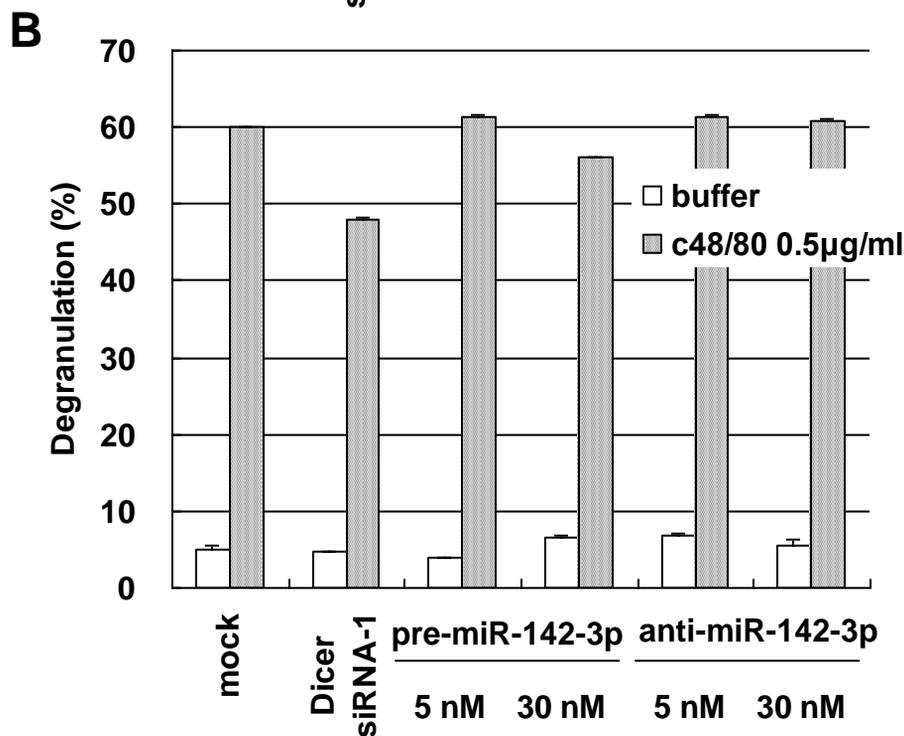
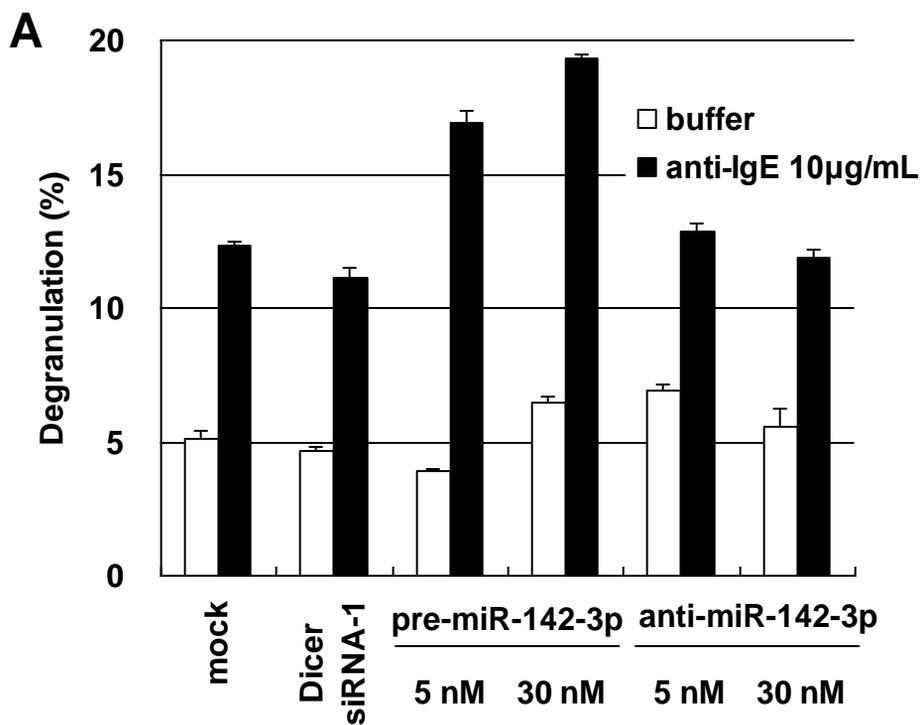


Figure. 3-6 miR-142-3p導入量と脱顆粒反応との関係

LAD2にmiRNA mimicあるいはantisense導入3日後(A,B)および7日後(C,D)、抗IgE抗体(A)あるいはcompound 48/80(B)刺激にて惹起させた脱顆粒活性を示す。測定は3回おこない、 β -hexosaminidase release活性の平均値 \pm SDで表した。

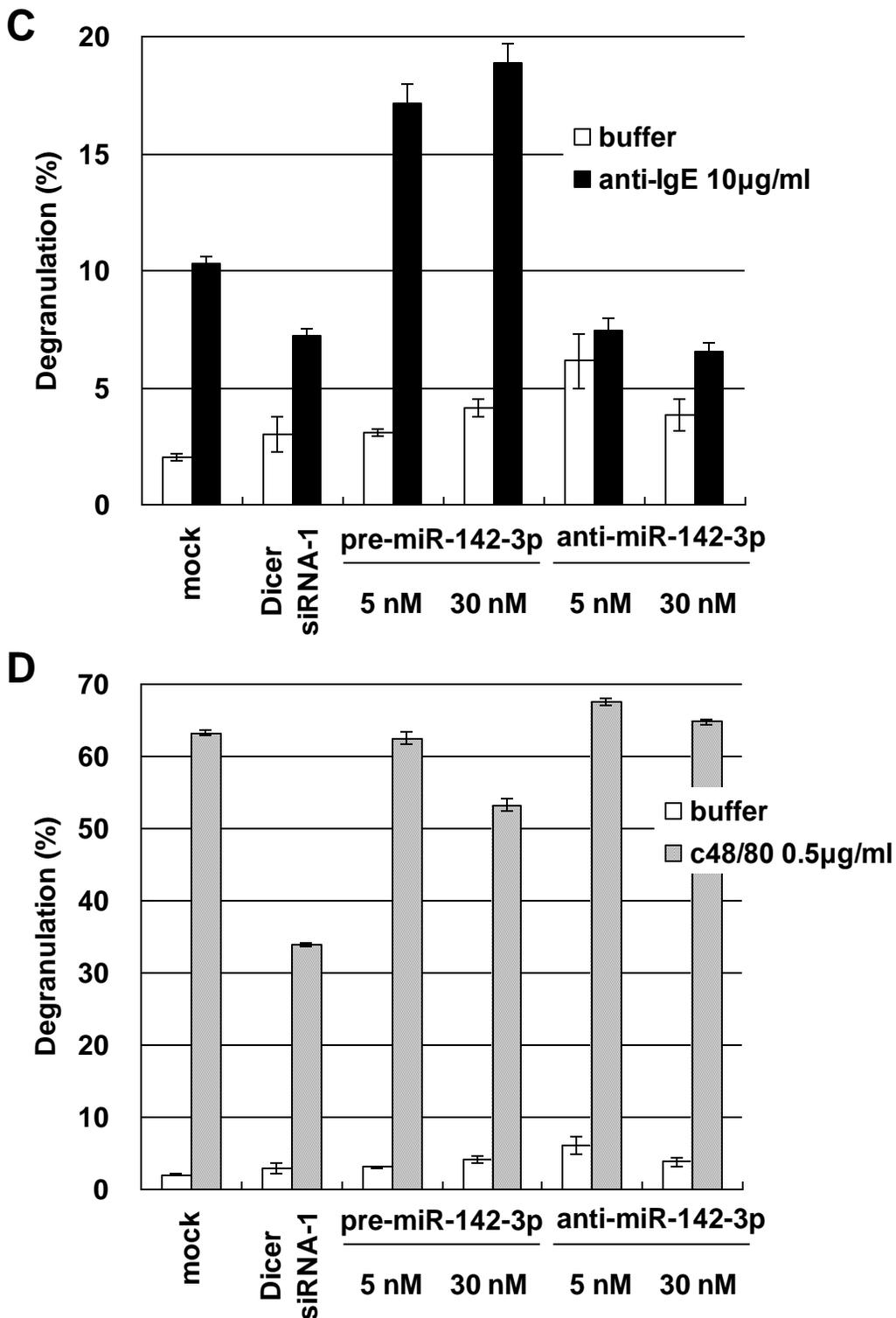


Figure. 3-6 miR-142-3p導入量と脱顆粒反応との関係

LAD2にmiRNA mimicあるいはantisense導入3日後(A,B)および7日後(C,D)、抗IgE抗体(C)あるいはcompound 48/80(D)刺激にて惹起させた脱顆粒活性を示す。測定は3回おこない、 β -hexosaminidase release活性の平均値 \pm SDで表した。

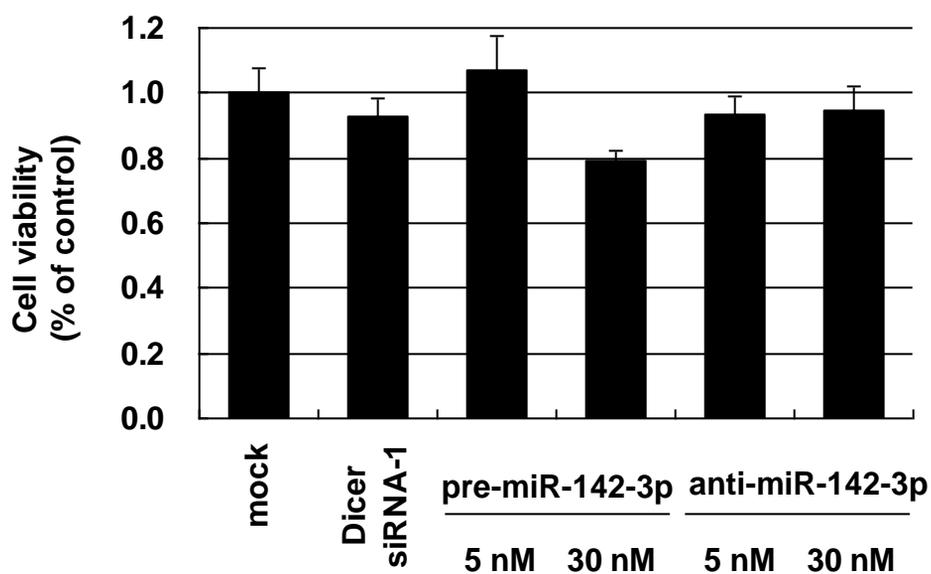


Figure. 3-7 miR-142-3p導入量と生細胞率との関係

LAD2にmiRNA mimicあるいはantisense導入3日後、生細胞数をmock群を1.0とした時の相対値を示す。測定は3回おこない、平均値±SDで表した。

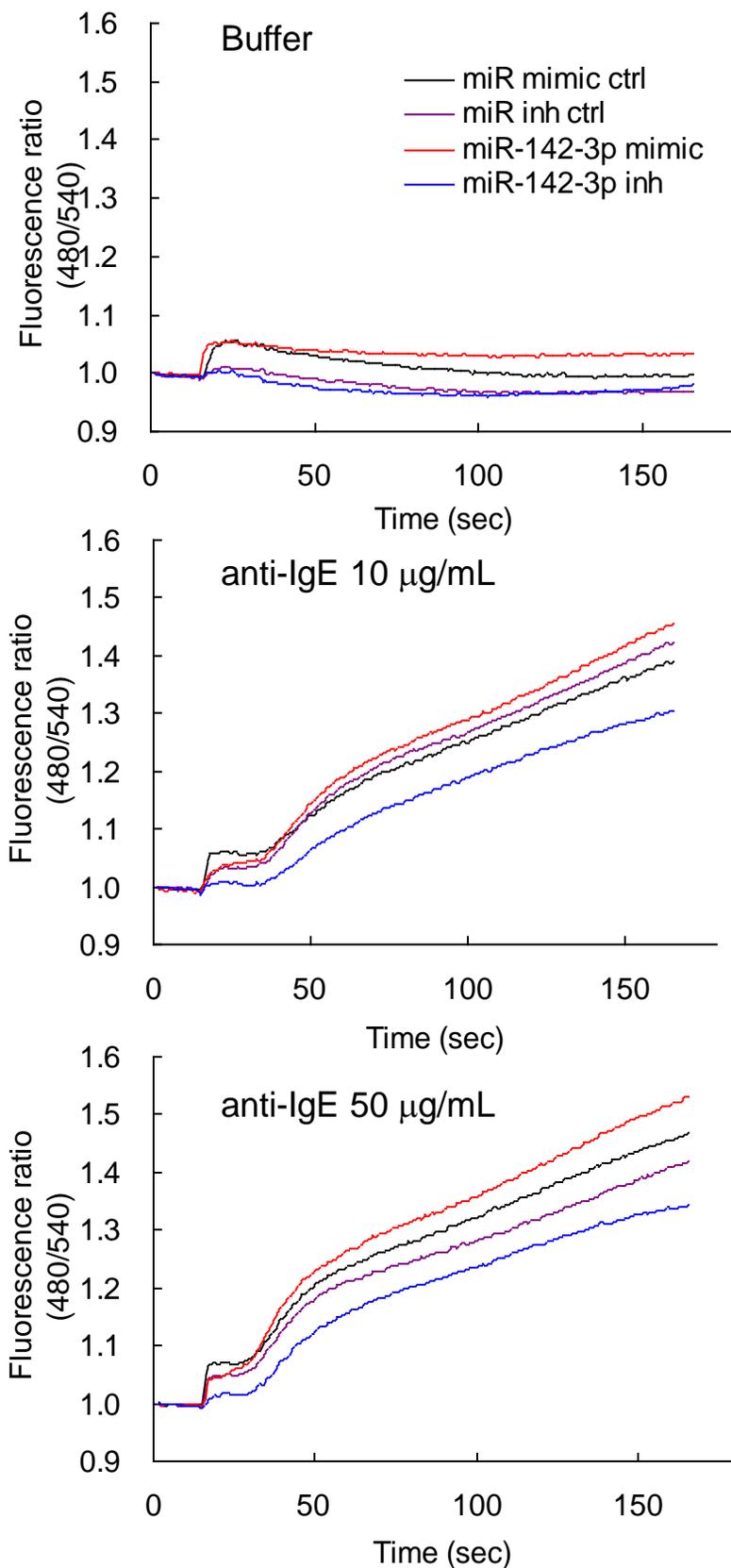


Figure. 3-8 miR-142-3p導入量と細胞内カルシウム変動との関係

LAD2へ各種核酸30nM導入3日後、抗IgE抗体で刺激した後の細胞内カルシウム量の変動を示す。刺激時を1.0とした時の相対値を継時的に表した。

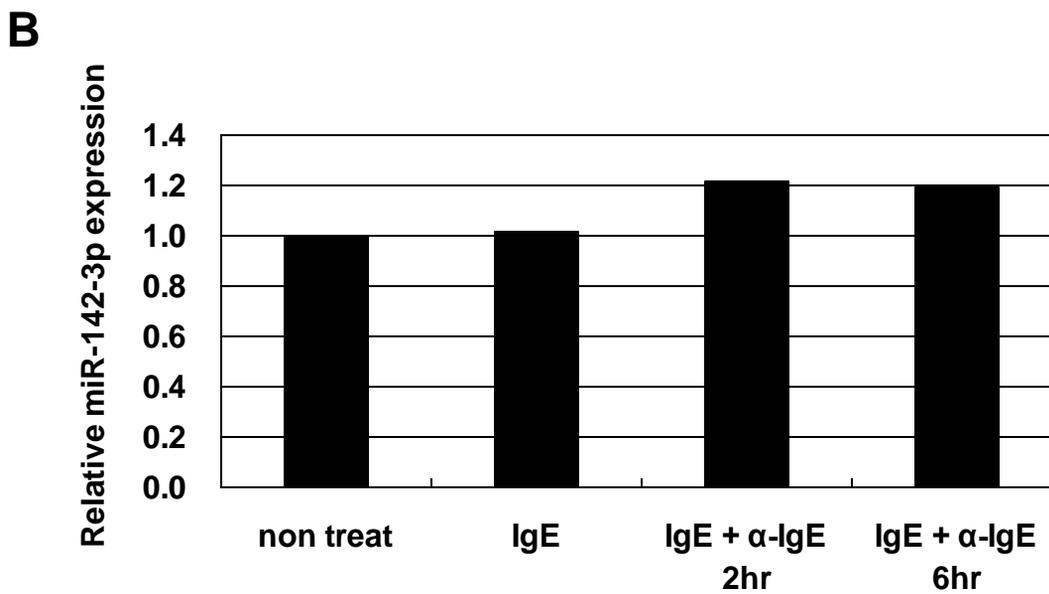
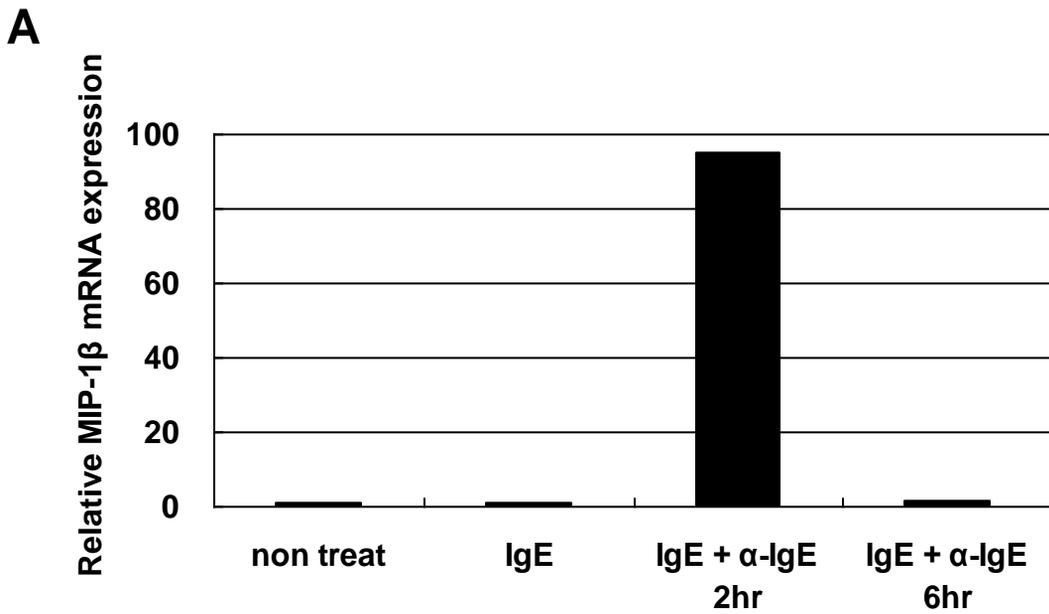


Figure. 3-9 抗IgE抗体刺激後の発現変動

IgE感作後、抗IgE抗体刺激2時間後および6時間後のMIP-1 β mRNA(A)およびmiR-142-3p(B)の相対発現量を示した。IgE群はIgEのみを添加したLAD2、non treatはIgE感作も実施していないLAD2で、non treat群を1.0とした相対値を表した。

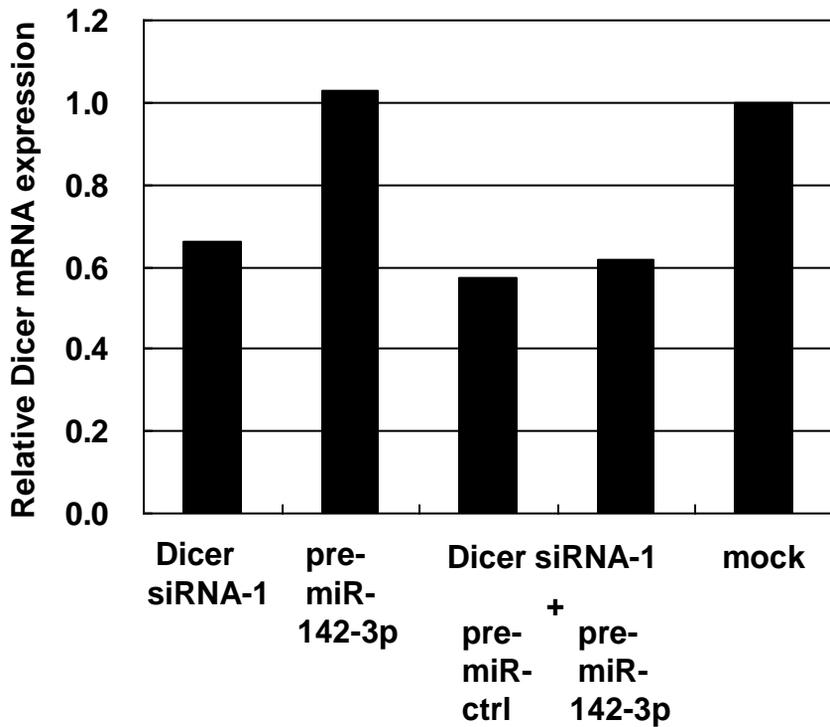
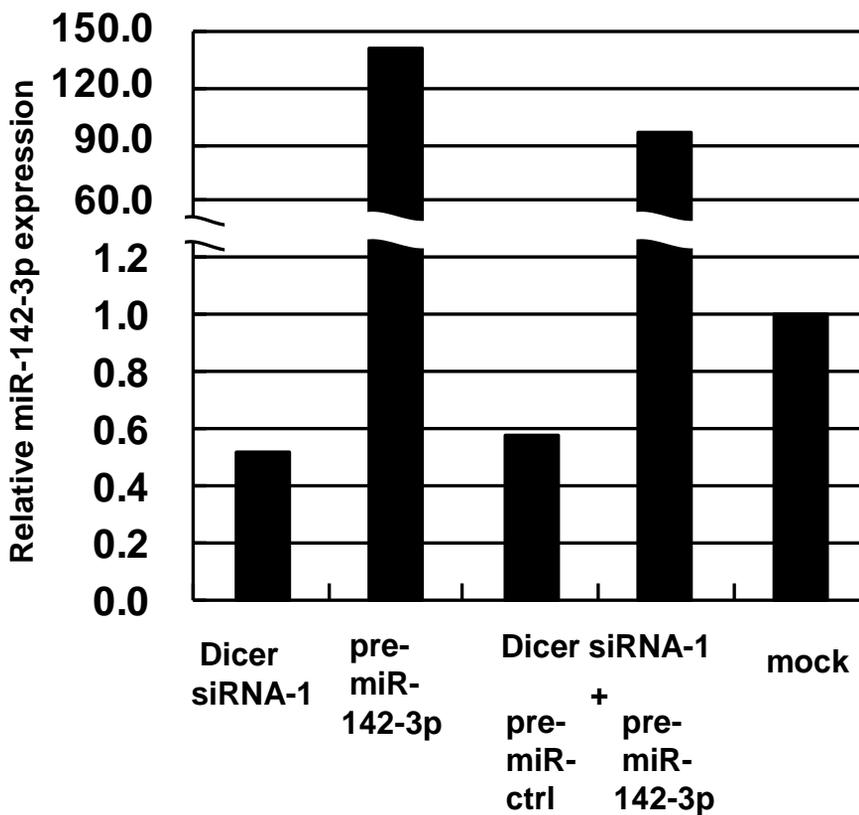
A**B**

Figure. 3-10 Dicer siRNAで低下した脱顆粒のmiR-142-3p導入によるレスキュー
 (A) 各種核酸30nM導入2日後のDicer mRNA発現量を、mock群を1.0とした相対値で示した。(B) 各種核酸30nM導入2日後のmiR-142-3p発現量を、mock群を1.0とした相対値で示した。

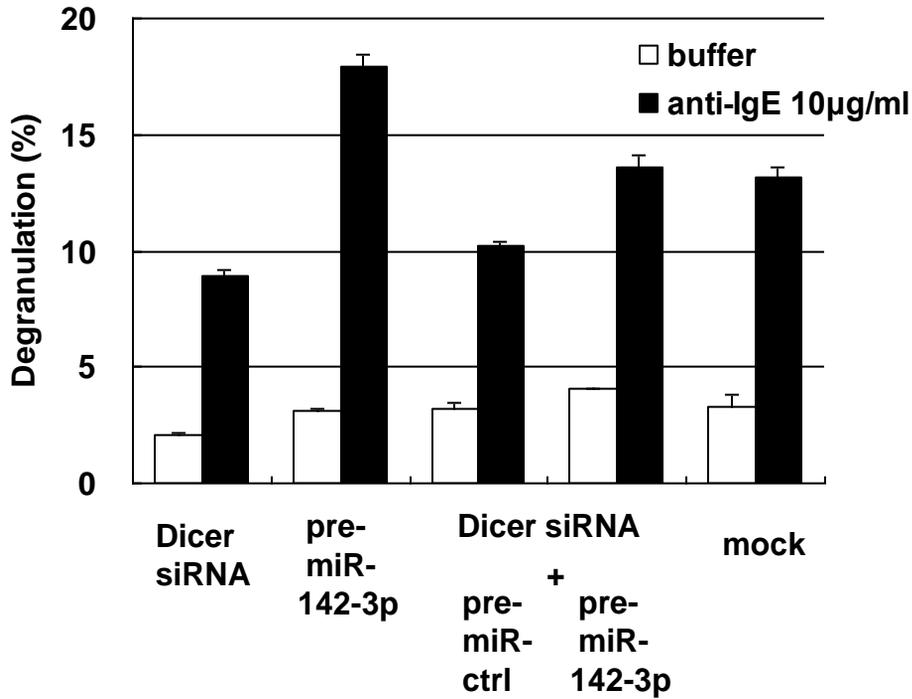
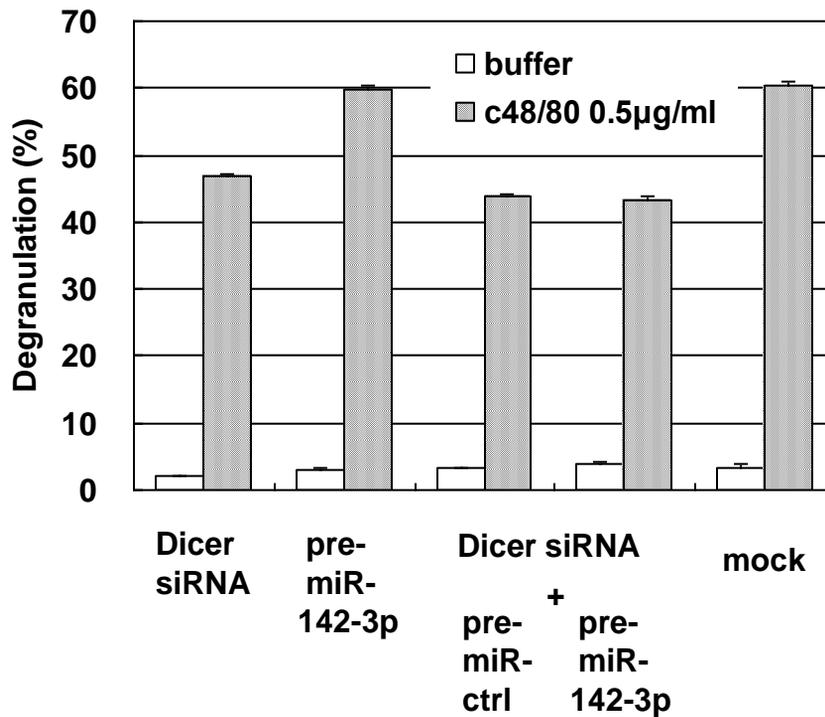
C**D**

Figure. 3-10 Dicer siRNAで低下した脱顆粒のmiR-142-3p導入によるレスキュー
 LAD2へ各種核酸30nM導入3日後、抗IgE抗体(C)あるいはcompound 48/80(D)刺激により惹起させた脱顆粒活性を示す。測定は3回おこない、 β -hexosaminidase release活性の平均値 \pm SDで表した。

A

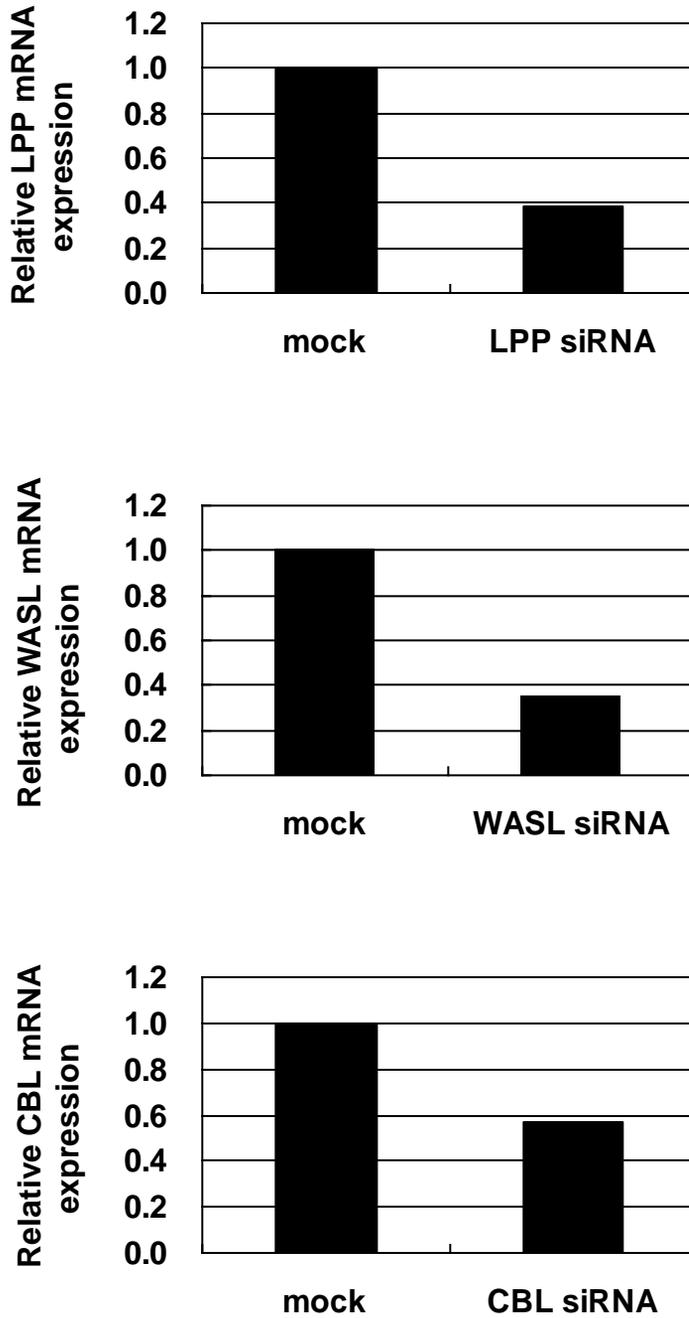


Figure. 3-11 miR-142-3p標的遺伝子候補の脱顆粒反応

(A) HeLa細胞へ20nMのsiRNAを導入し、2日後の各mRNA発現量をmock群を1.0とした時の相対値で示した。

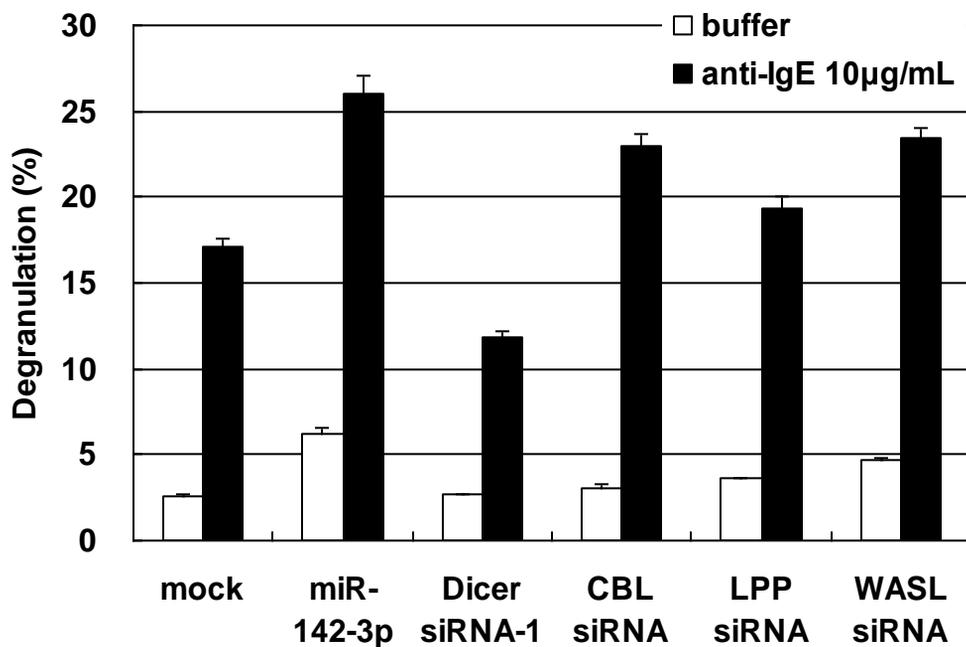
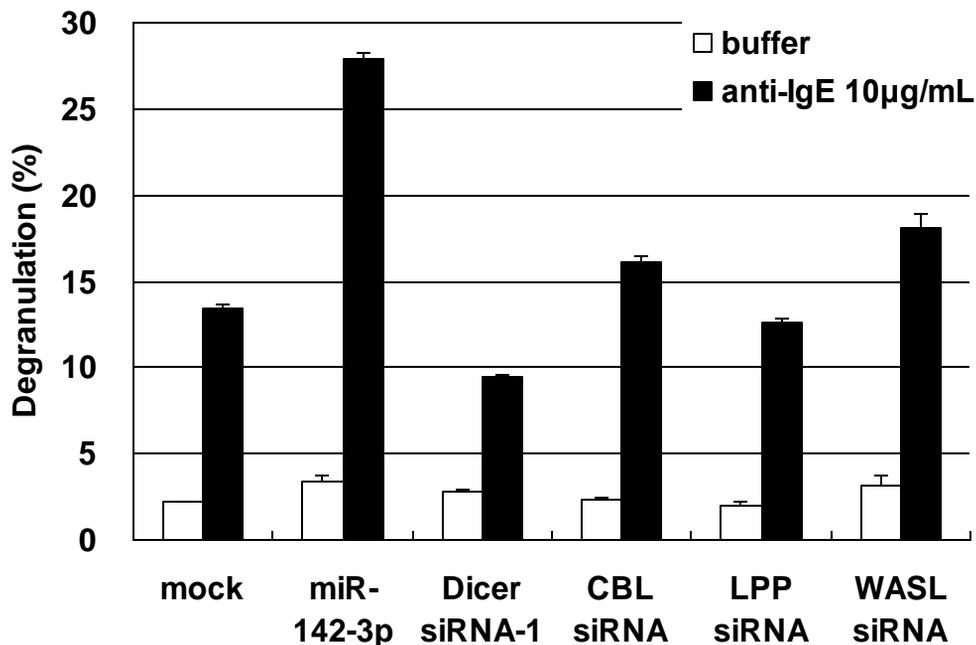
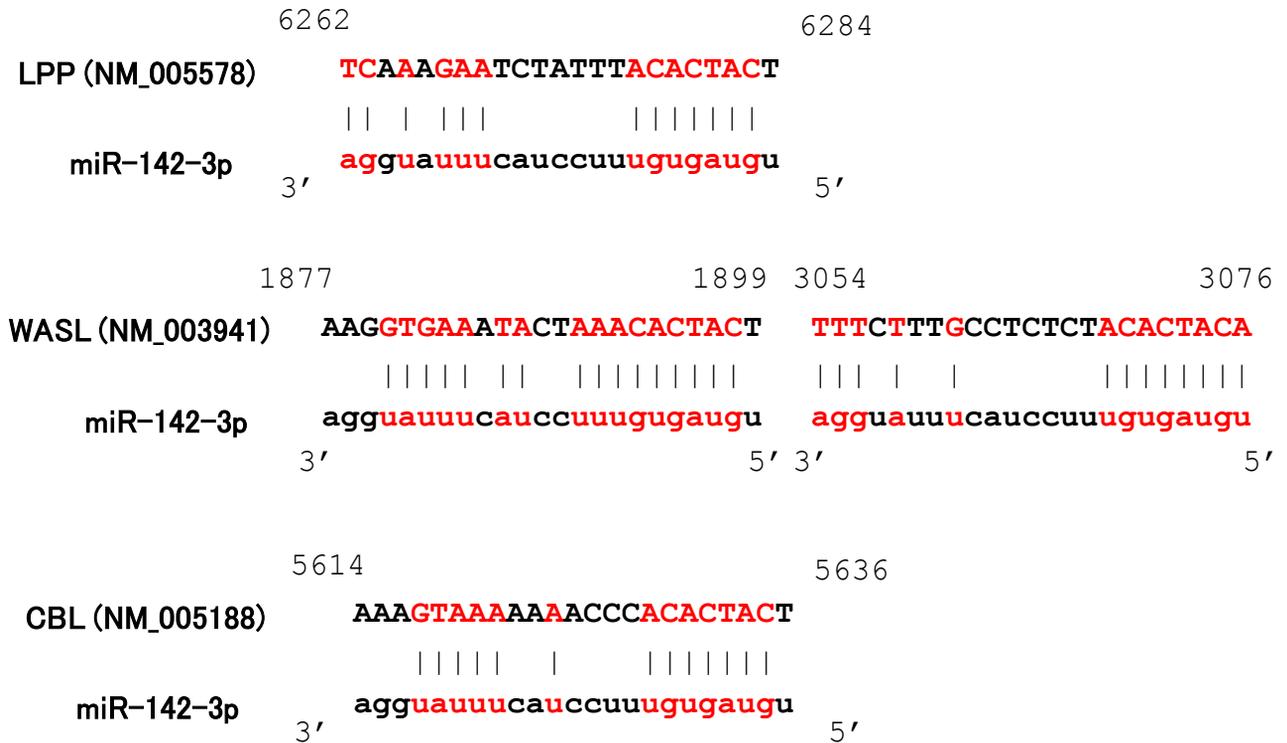
B**C**

Figure. 3-11 miR-142-3p標的遺伝子候補の脱顆粒反応

LAD2へ各miRNA mimicおよびsiRNA 30 nM導入3日後(B)および7日後(C)に、抗IgE抗体刺激により惹起させた脱顆粒活性を示す。測定は3回おこない、 β -hexosaminidase release活性の平均値 \pm SDで表した。

A



B

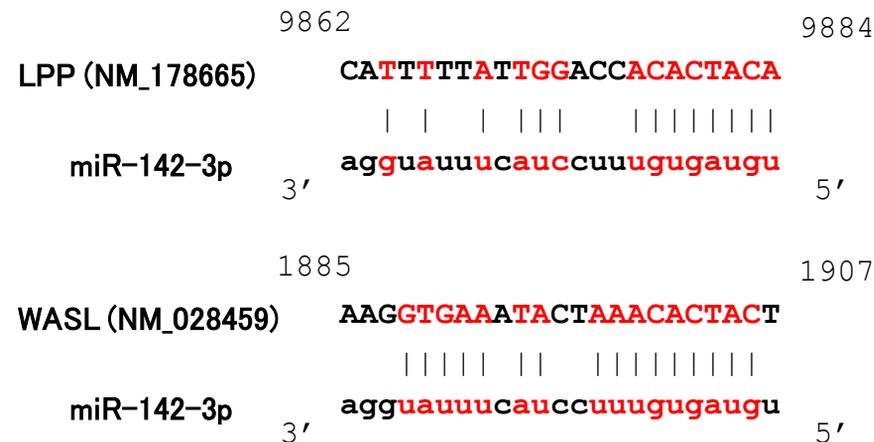
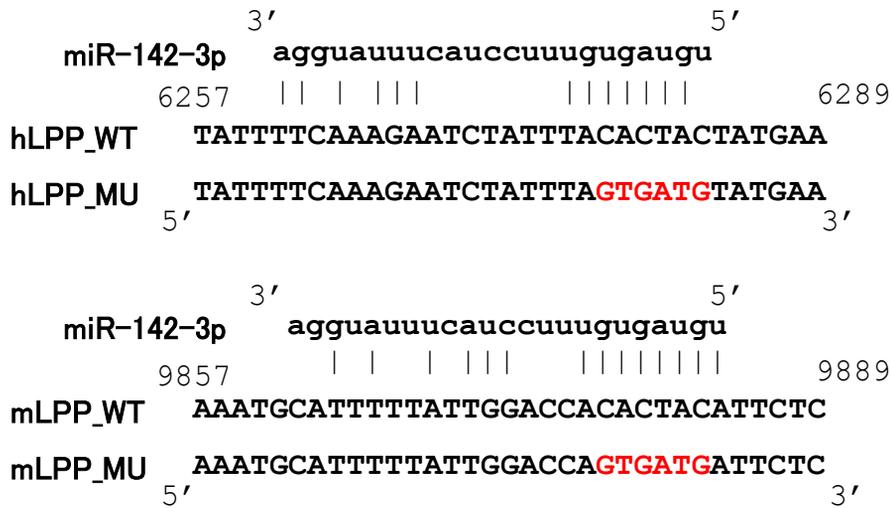


Figure. 3-12 miR-142-3p配列と標的候補遺伝子との関係

ヒト(A)およびマウス(B)においてmiR-142-3pが作用すると考えられる標的遺伝子候補の配列を示した。遺伝子上の数値はRefSeqの5'端からの塩基数を表し、赤字は相補塩基対を表した。

A



B

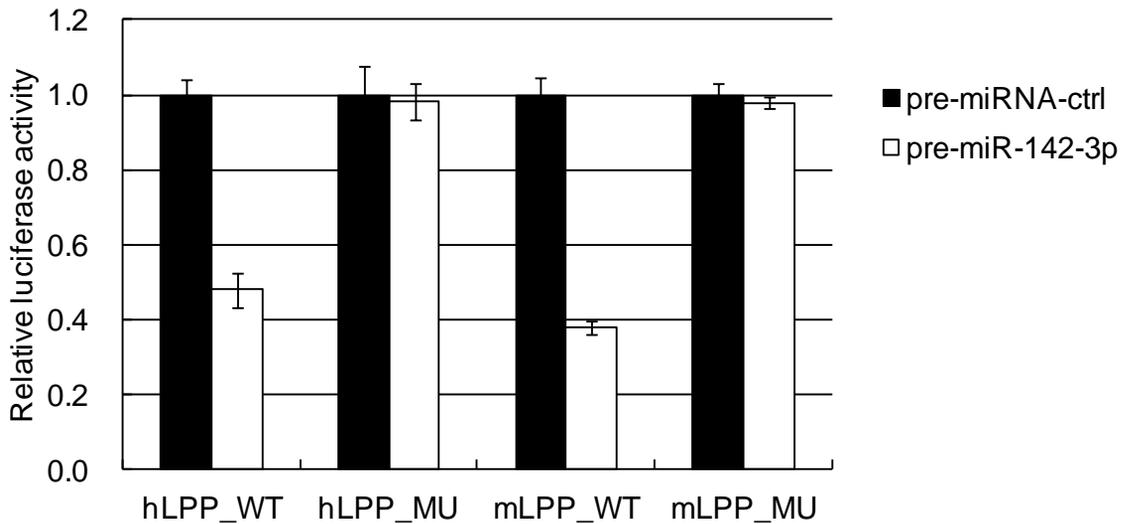


Figure. 3-13 LPP 3'UTR配列を用いたレポーターアッセイ

(A)レポーターベクターに挿入したヒトおよびマウスLPP mRNAの3'UTR配列とmiR-142-3p配列との関係を示した。赤字は変異塩基を示す。(B)pre-miR-142-3pあるいはコントロールmiRNAを、野生型(WT)あるいは変異型(MU)レポーターベクターと共にHepG2へ導入し24時間後のluciferase活性を示す。測定は3回おこない、コントロールmiRNA導入時の活性を1.0とした相対活性を平均値で±SDで表した。

A

hsa_miR_142_3p : UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
 mmu_miR_142_3p : UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA

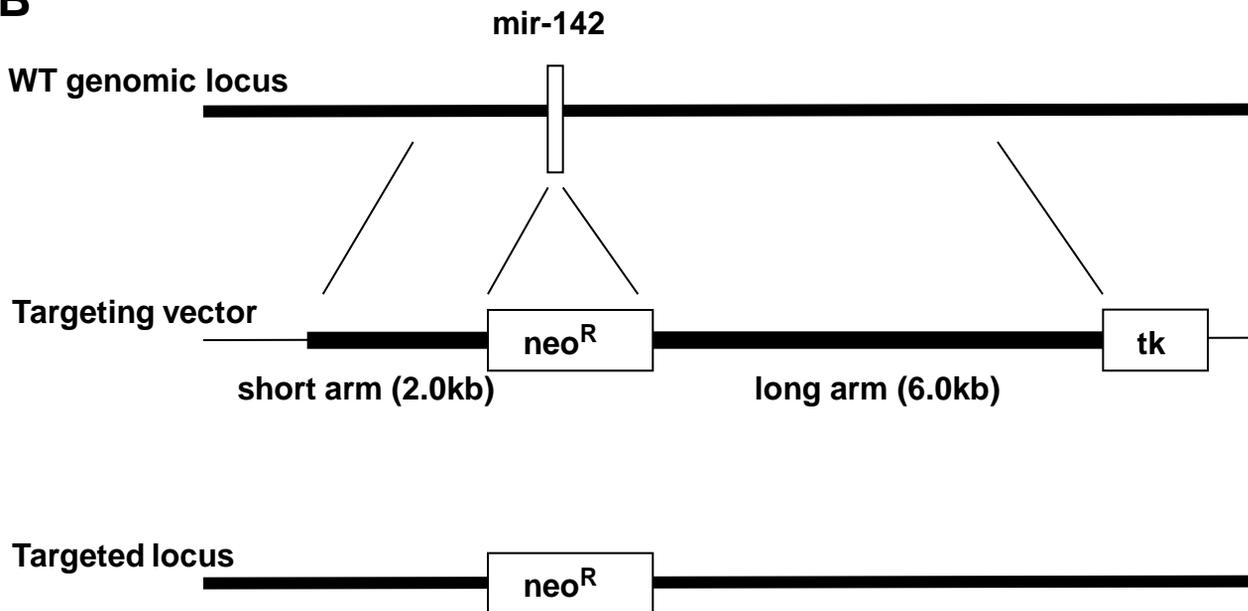
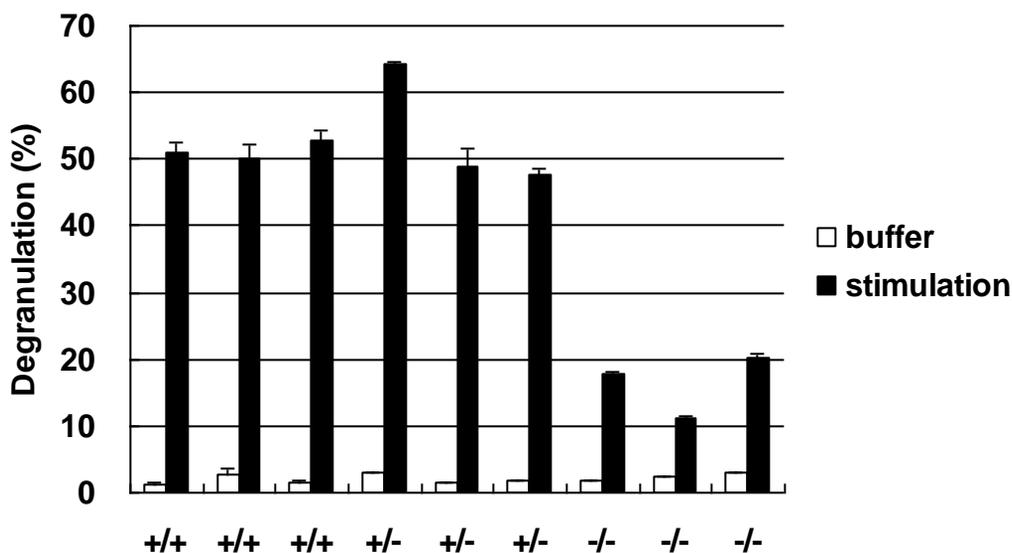
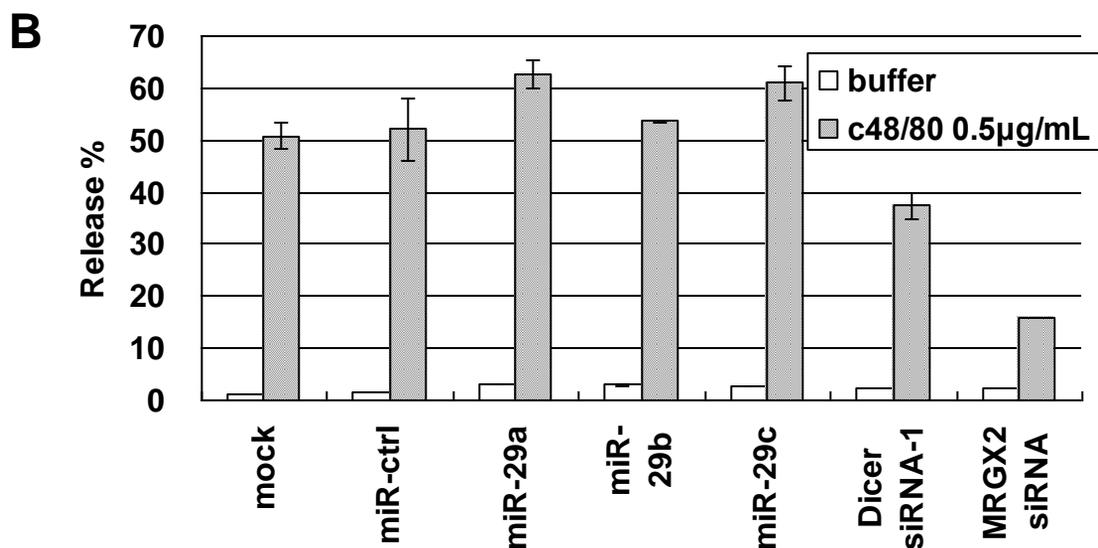
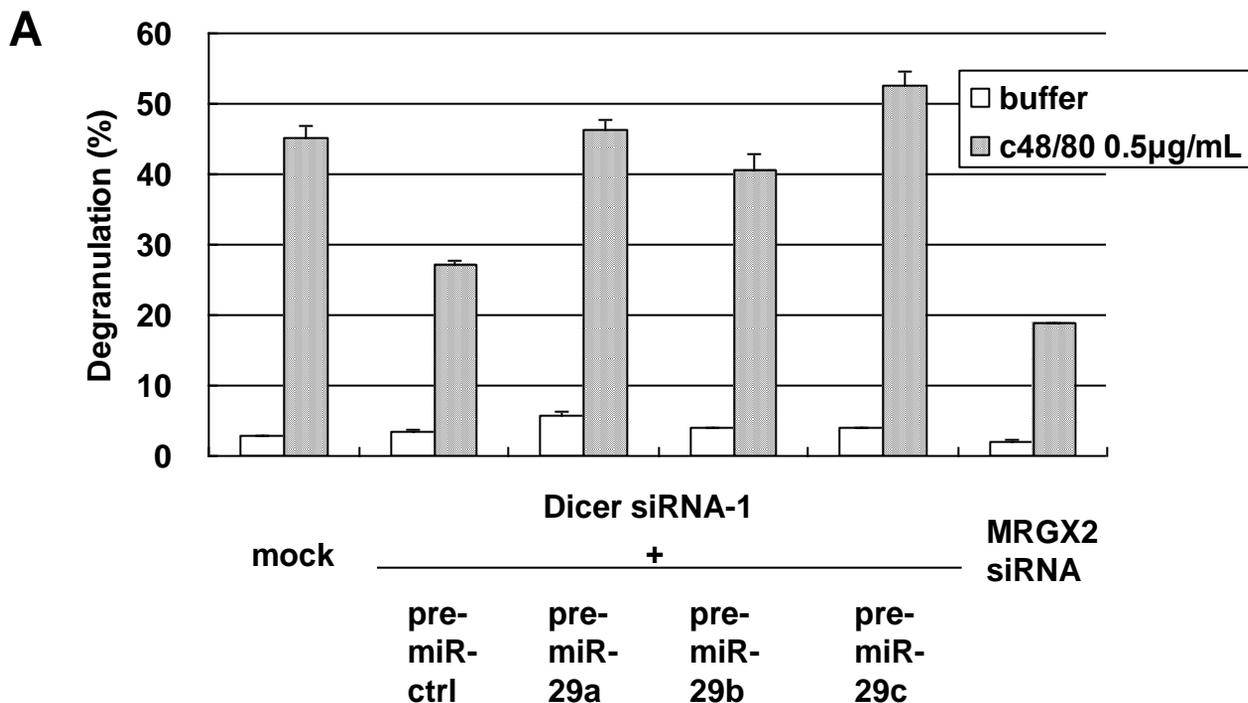
B**C**

Figure. 3-14 miR-142-3p KOマウスの作製・評価

(A) ヒトおよびマウスmiR-142-3p配列の比較 (B) mir-142 KO作製図

(C) miR-142 KOマウス骨髄由来マスト細胞の脱顆粒反応。+/+は野生型、+/-はヘテロ型、-/-はホモ型マウス由来のマスト細胞を表す。脱顆粒活性の測定は3回おこない、β-hexosaminidase release活性の平均値±SDで表した。



C

hsa-miR-29a UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA

hsa-miR-29b UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU

hsa-miR-29c UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA

Figure. 3-15 miR-29ファミリーの活性

(A,B)LAD2へ各種核酸25nM導入し3日後にcompound 48/80刺激にて惹起させたの脱顆粒反応を示した。測定は3回おこない、β-hexosaminidase release活性の平均値±SDで表した。(C)miRBase ver.13.0におけるmiR-29ファミリーの配列

EntrezGene	GeneSymbol	target	Fold change
7940	LST1	No	-3.78
6540	SLC6A13	No	-3.72
162137	MGC34800	No	-3.63
1413	CRYBA4	No	-3.40
54807	ZNF586	No	-3.05
195828	ZNF367	No	-2.62
23463	ICMT	No	-2.45
84289	ING5	No	-2.43
84969	TOX2	No	-2.42
9064	MAP3K6	No	-2.42
930	CD19	No	-2.40
6347	CCL2	No	-2.39
30000	TNPO2	No	-2.38
5433	POLR2D	No	-2.33
286410	ATP11C	No	-2.32
10714	POLD3	No	-2.31
84267	C9orf64	No	-2.31
9064	MAP3K6	No	-2.24
259307	IL411	No	-2.16
148741	ANKRD35	No	-2.16
3640	INSL3	No	-2.16
7490	WT1	No	-2.14
79363	C1orf89	No	-2.14
51199	NIN	No	-2.13
5134	PDCD2	No	-2.11
79963	ABCA11	No	-2.11
55635	DEPDC1	No	-2.11
653573	FAM72A	No	-2.11
10613	ERLIN1	No	-2.10
55676	SLC30A6	No	-2.09
64853	C1orf80	No	-2.08
55628	ZNF407	No	-2.07
151636	DTX3L	No	-2.06
1437	CSF2	No	-2.06
51427	ZNF588	No	-2.05
84623	KIRREL3	No	-2.04
51364	ZMYND10	No	-2.02
30000	TNPO2	No	-2.02
10098	TSPAN5	Yes	-1.97
29763	PACSIN3	No	-1.95
63932	CXorf56	No	-1.93
11328	FKBP9	No	-1.86
55432	YOD1	No	-1.82
83956	RACGAP1P	No	-1.82
64327	LMBR1	No	-1.71
7855	FZD5	Yes	-1.70
30812	SOX8	No	-1.68
5082	PDCL	No	-1.67
442006	LOC442006	No	-1.67
64710	NUCKS1	Yes	-1.61
23616	SH3BP1	No	-1.60

Table. 3-5 miR-29c導入細胞で発現低下した遺伝子群

Fold Changeはコントロール群に比べてその程度発現量が低下したかの比率を示す
Targetの欄でYesは標的予測アルゴリズムに含まれた遺伝子、Noは含まれない遺伝子を示す。