

炎症応答に関わる新規 lncRNA の解析

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

システム発生・再生医学分野

小林 和弘

要旨

Recent advances in transcriptome analyses revealed that thousands of non-coding RNAs, especially long non-coding (lnc) RNAs, are transcribed in mammalian genomes and are involved in various aspects of biological processes. In innate immune cells such as macrophages, lipopolysaccharide (LPS)—ligand for Toll-like receptor (TLR)-4—can strongly and rapidly induce lncRNA transcription as well as inflammatory cytokine transcription, such as tumor necrosis factor- α (TNF α) and interleukin (IL)-6. In this study, we identified a novel lncRNA, lncRNA activator for secondary response cytokine (LASC), which is essential for inflammatory cytokine expression. LASC is composed of 3 exons and is 1.8 kbp in length. Ligands for TLRs such as LPS, R848, and CpG, but not inflammatory cytokines such as TNF α and IL-1 β , can strongly induce LASC expression within 3 hours after stimulation by LPS in mouse macrophages. RNA fluorescence in situ hybridization revealed that LASC largely localizes in the cytoplasm. Silencing LASC by shRNA showed decreased expression of IL-6 and IL-1 β mRNAs and proteins upon LPS stimulation in the mouse macrophage cell lines RAW264.7 and J774.1. To elucidate global change in mRNA expression by LASC knockdown, we revealed that approximately 200 genes, including IL-6, GM-CSF, Lcn2, and MMP13, were reduced in LASC-knockdown cells, using a microarray analysis. TNF α and IFN β expression was also modestly decreased. C/EBP β and I κ B β , which are essential inducible co-activators for IL-6 and Lcn2, were normal in both control and LASC-knockdown cells after exposure to LPS. In addition, a restriction enzyme accessibility assay showed that LPS-induced chromatin remodeling was retained at the IL-6 locus in both control and LASC-knockdown cells. However, mobilization of RNA polymerase II at the transcriptional start sites of IL-6 and GM-CSF was severely impaired by LASC silencing. These results suggest that LASC regulates inflammatory cytokine expression at the transcriptional level. To investigate its *in vivo* function, we generated LASC-knockout mice harboring the SV40 late poly A signal sequence at the LASC locus, using CRISPR/Cas9, and confirmed that LASC expression is abrogated in antigen-presenting cells derived from LASC-knockout mice. Furthermore, LASC-knockout mice showed significantly prolonged survival after administration of a lethal dose of LPS. In contrast, LASC KO mice showed highly

susceptibility to DSS-induced colitis. In conclusion, LASC, a cytoplasmic lncRNA induced by TLR ligands, plays a crucial role in inflammatory cytokine expression and involves systemic and local inflammation in vivo.

目次

1.序論	3
目的	4
材料と方法	5
結果	8
考察	15
参考文献	17
謝辞	18
図表一覧	19

序論

2003 年に米欧日を中心としたヒトゲノムプロジェクトの成果としてヒトの全ゲノム DNA 配列が明らかになって以来、マウスを始めとした多くの生物種のゲノム DNA 配が解読されてきた。これらの成果により、タンパク質をコードする遺伝子数はヒトやマウスに代表される哺乳類においては約 20,000 遺伝子であり、ゲノム DNA に占める領域としては 2 % 以下にすぎないことが明らかになった。理化学研究所を中心とした FANTOM プロジェクトや国際共同プロジェクト GENCODE などの大規模なトランスクリプトーム解析により、タンパク質をコードしない RNA、ノンコーディング RNA(ncRNA)がゲノム上の様々な領域から転写されていることが明らかになり、数万種類の ncRNA が存在することが明らかになった。ncRNA はそのサイズにより二つに大別され、200 塩基よりも短い ncRNA をスモールノンコーディング RNA(sncRNA)、200 塩基以上の ncRNA はロングノンコーディング RNA(lncRNA)と定義されている。

sncRNA として古くから翻訳においてアミノ酸を運搬する transfer RNA (tRNA; 約 70 塩基)が知られていたが、2000 年代に入り、20-30 塩基からなる miRNA や piRNA が同定され、mRNA の翻訳抑制やトランスポゾンのエピジェネティックな発現抑制に寄与することが明らかになった(1)。一方で、lncRNA はリボソームの構成因子である ribosomal RNA (rRNA) やメスにおける X 染色体の不活性化に関わる Xist(2)の作用機序について、機能解析が進んできたが、ゲノム DNA にコードされる数万種類の lncRNA (ヒト ; 20,000 種類、マウス ; 15,000 種類)についてはその機能や生体内における役割について不明な点が多く、注目が集まっている。

炎症応答は外敵（免疫学的非自己）に対する自己防衛反応であり、炎症性サイトカインが中心的役割を担う。細菌やウイルスに特有の成分は細胞表面に発現する一連のパターン認識分子により補足され、とりわけ Toll-like receptor (TLR) はリポ多糖 (LPS) やリポペプチド、非メチル化 CpG を TLR4、TLR2/6、TLR9 でそれぞれ認識し、炎症性サイトカインの発現を誘導する。TLR からのシグナルは I κ B キナーゼ (IKK) の活性化を誘導し、IKK は I κ B α をリン酸化し、分解することで転写因子 NF- κ B の活性化を誘導する。NF- κ B は炎症性サイトカインのプロモーター配列に存在する κ B 配列に結合し、炎症性サイトカインの発現を強く誘導する(3)。この発現機構において miRNA-146 や miR-9 に代表される miRNA がネガティブフィードバック機構の一端を担っていることが明らかになっているが、lncRNA の寄与については明らかではない。近年、linc-Cox2(4)や lincRNA-EPS(5)、

PACER(6)などが、NF- κ B の核移行や転写調節を介して炎症性サイトカインの発現を制御することが報告された。しかし、lncRNA による炎症性疾患や自己免疫疾患、炎症性発がんの病態形成についてはいまだ明らかではない。

目的

本研究室では LPS で誘導される新規 lncRNA として LASC を同定した。そこで本研究においては LASC の lncRNA としての基本的な性質および、炎症性サイトカインの発現制御機構について明らかにし、LASC の炎症応答および炎症疾患への寄与を検討することを目的とした。

材料と方法

細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞、HEK293T 細胞は 10%非働化ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で培養した。骨髄由来マクロファージはマウス骨髄細胞を 20ng/ml M-CSF、10%非働化ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地で 7 日間培養し、分化誘導した。骨髄由来樹状細胞はマウス骨髄細胞を 20ng/ml GM-CSF、10%非働化ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地で 10 日間培養し、分化誘導した。

ノーザンブロッティング

RAW264.7 細胞を 100ng/ml LPS で 1,3,5 時間刺激した後に RNA を ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて精製した。熱変性した RNA をホルムアルデヒド変性アガロースゲル(1%)で電気泳動した後にナイロン膜へ転写した。紫外線による RNA の架橋を行った後に、LASC または GAPDH 特異的な DIG ラベルした RNA プロブを 68°C で 1 晩、ハイブリダイゼーションした。SSC 緩衝液で洗浄し、ナイロン膜を Blocking Reagent（Roche）でブロッキングした。10,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識した抗 DIG 抗体を反応させた後に CDP-Star(Roche)により検出した。

定量 PCR

RNA は ReliaPrep RNA mini kit（Promega）を用いて精製し、オリゴ dT プライマーを用いて RverTra Ace（Toyobo）により逆転写を行い、cDNA とした。GAPDH、LASC、IL-6、TNF の発現を THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix を用いて定量 PCR により解析した。相対的な発現量は ΔCt 法により計算した。

マイクロアレイ

LASC-KD およびコントロール KD shRNA を発現する RAW264.7 細胞を 100ng/ml LPS で 5 時間刺激した後に RNA を ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて精製した。マイクロアレイは GeneChip 3' IVT Expression Kit および GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array（Affymetrix）を用いて行った。コントロール KD 細胞と比較して 2 倍以上または半分以下に低下した遺伝子を発現変化した遺伝子とした。

ウェスタンブロッティング

LASC-KD およびコントロール KD shRNA を発現する RAW264.7 細胞を 100ng/ml LPS で 20 から 300 分刺激した。細胞を PBS で洗浄した後に、遠心により沈殿させ、細胞溶解液 (50mM Tris-HCl, pH7.3, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 1xComplete mini protease inhibitor cocktail) に懸濁し、氷上にて 15 分間インキュベートした。20,000xg で 5 分間遠心し、上清を Total cell lysate とした。核画分は以下の方法で調整した。細胞の沈殿を低張液 (20mM HEPES, pH,7.5, 1mM MgCl₂, 10mM KCl, 1xComplete mini protease inhibitor cocktail) に懸濁し、0.2% Triton X-100 を含む低張液を加え、よく混合し、氷上にて 15 分間インキュベートした。2,300xg で 5 分間遠心し、上清を細胞質画分とした。沈殿を低張液で懸濁し、0.2% Triton X-100 を含む低張液を加え、よく混合し、2,300xg で 5 分間遠心した後、上清を除去した。この操作を 5 回行った。沈殿を高張液 (20mM HEPES, pH,7.5, 300mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1xComplete mini protease inhibitor cocktail) に懸濁し、よくボルテックスした後に氷上にて 15 分間インキュベートした。2,300xg で 5 分間遠心し、上清を核画分とした。タンパク質濃度は Dc protein assay (Bio-Rad) を用いて行った。20μg のタンパク質を 10%または 7.5%のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後に、PVDF 膜へ転写した。Blocking One (ナカライテスク) により室温にて 1 時間ブロッキングを行った後に、抗 β-アクチン抗体 (SIGMA; AC-74)、抗 IκBα 抗体 (Santa Cruz; sc-371)、抗 RelA 抗体 (Santa Cruz; sc-372)、抗 p50 抗体 (Abcam; ab7971)、抗 Sp1 抗体 (Santa Cruz; sc-59) を 4℃で 1 晩反応させた。HRP 標識した抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare; NA931V) または抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare; NA9340V) を室温にて 1 時間反応させた後に、ECL 試薬 (Pierce; ECL Western Blotting Substrate) により検出した。

クロマチン免疫沈降

LASC-KD およびコントロール KD shRNA を発現する RAW264.7 細胞を 100ng/ml LPS で 1 時間から 5 時間刺激した後に、ホルムアルデヒド（最終濃度 1%）を添加し、細胞を固定した。細胞を PBS で洗浄した後に、遠心により沈殿させ、細胞溶解液（50mM Tris-HCl, pH8.0, 3.5mM EDTA, 3.5% Sodium deoxycholate, 3.5% SDS, 1xComplete mini protease inhibitor cocktail）に懸濁し、氷上にて 15 分間インキュベートした。Covaris を用いて DNA を断片化した後に、遠心した上清に希釈液（25mM Tris-HCl, pH8.0, 196mM NaCl, 2.8mM EDTA, 1.4% Triton X-100）を加え 5 倍希釈した。5 μ g の抗 RelA 抗体（Santa Cruz; sc-372）、抗 RNA ポリメラーゼ II 抗体（Abcam; ab817）、Normal mouse IgG（Santa Cruz; sc-2025）、または Normal Rabbit IgG（Santa Cruz; sc-2027）を加え 4°C で 1 晩、攪拌しながら反応させた。Dynabeads Protein A により抗原抗体複合体を回収し、ビーズを low salt buffer、high salt buffer、LiCl buffer でそれぞれ 1 回洗浄し、続いて TE で 2 回洗浄した。ビーズに溶出液を加え 65°C で一晩反応させた。プロテイナーゼ K によるタンパク質分解後に、シリカメンブレンカラムを用いて DNA を精製した。IL-6、GM-CSF、TNF 遺伝子のプロモーター領域、転写開始点、エクソン領域特異的なプライマーを用いて定量 PCR により解析した。免疫沈降前の input に対する濃縮を DNA への結合量とした。

Restriction enzyme accessibility assay

LASC-KD およびコントロール KD shRNA を発現する RAW264.7 細胞を 100ng/ml LPS で 1 時間から 5 時間刺激した。細胞を PBS で洗浄した後に、遠心により沈殿させ、細胞溶解液に懸濁し、氷上にて 5 分間インキュベートした。沈殿を high salt buffer で 2 回洗浄した後に、high salt buffer に懸濁した。制限酵素 EcoNI を 10unit 加え、37°C で 30 分間反応させ、DNA を精製した。DNA はアガロースゲルで電気泳動した後にナイロン膜へ転写、紫外線による架橋の後に TNF または IL-6 プロモーター領域特異的な DIG ラベルした DNA プローブをハイブリダイゼーションした。SSC 緩衝液で洗浄し、ナイロン膜を Blocking Reagent（Roche）でブロッキングした。10,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識した抗 DIG 抗体を反応させた後に CDP-star により検出した。

エンドトキシンショック

LASC ノックアウト (KO) マウスまたは野生型 (WT) マウスに 20mg/kg の LPS を腹腔内投与した。その後、生存率を測定した。

硫酸デキストランナトリウム (DSS) 誘導性腸炎

LASC KO マウスまたは WT マウスに 3%DSS を含む飲料水を 7 日間摂取させた。その後 5 日間通常水を摂取させた。体重変化および生存率を毎日測定した。

結果

1. LASC は抗原提示細胞において TLR リガンドにより誘導される

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を 100ng/ml LPS で 1 時間、3 時間、5 時間刺激した。Total RNA を精製した後に、ノーザンブロットイングにより LASC の発現を検討した。その結果、LASC は LPS 刺激後 3 時間および 5 時間で強く発現した (Fig. 1A)。LASC は RAW264.7 細胞において LPS、Pam3CSK4、非メチル化 CpG により発現が誘導され、炎症性サイトカイン自身や PolyI:C や Curdlan などでは発現が誘導されない (Fig. 1B)。LASC は骨髄由来マクロファージ (BMDM) や骨髄由来樹状細胞 (BMDC) において LPS 刺激により誘導された (Fig. 1C)。一方、マウス脾臓由来 B 細胞や T 細胞においては発現は見られなかった。以上のことから、LASC は抗原提示細胞において LPS を始めとする TLR リガンドにより誘導される lncRNA であることが明らかになった。

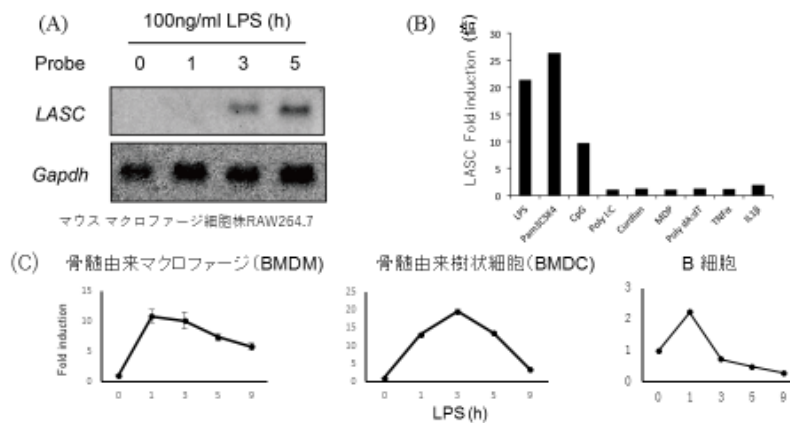


Fig.1 LASCは抗原提示細胞に存在するToll用受容体(TLR)へリガンド刺激を加えることにより誘導される。
 (A)マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞を100ng/ml LPSの条件で図示した時間刺激し、発現量をノーザンブロットイングで解析した。
 (B)マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞を100ng/ml 各リガンドの条件で3時間刺激し、LASC発現量をqPCRで解析した。
 (C)各細胞を100ng/ml LPSの条件で図示した時間刺激し、LASC発現量をqPCRで解析した。

2. LASC は炎症性サイトカインの発現を正に制御する。

続いて、LASC の炎症性サイトカインの発現における役割を検討した。RAW264.7 細胞に LASC に対する shRNA、またはコントロール shRNA を発現するレトロウイルスを感染させ、LASC ノックダウン(KD)おコントロール RAW264.7 細胞を樹立した。LASC-KD およびコントロール KD 細胞を 100ng/ml LPS で 1 時間、3 時間、5 時間刺激した。Total RNA を精製した後に、逆転写を行い cDNA を得た。この cDNA を鋳型として定量 PCR により炎症性サイトカインの発現を解析した。LASC KD 細胞において TNF α や IL-6 の顕著な発現低下が見られた (Fig. 2A)。さらに、マイクロアレイを用いて、LASC により制御される遺伝子の網羅的解析を行ったところ G-CSF や GM-CSF、IL1 α といった様々な炎症性サイトカインの発現が顕著に低下していることが分かった。以上のことから、LASC は様々な炎症性サイトカインの発現を正に制御していることが示された。

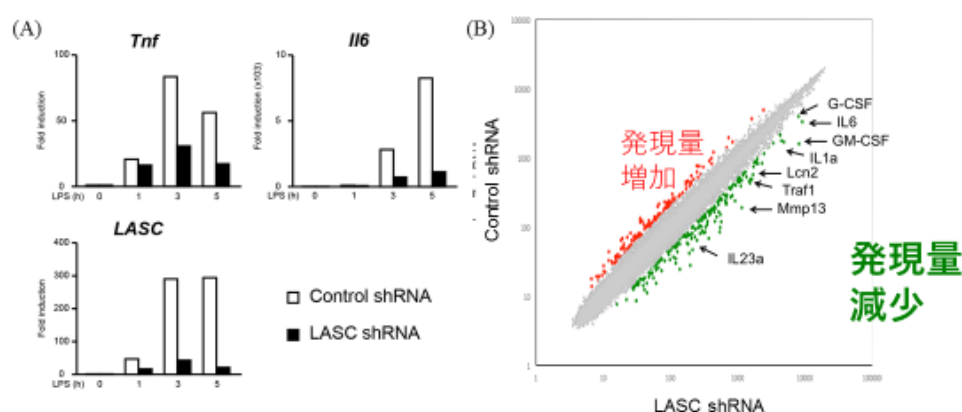


Fig.2 LASCのノックダウンで炎症性サイトカインの発現量が低下する
LASCに対するshRNA、又はコントロールとしてLacZに対するshRNAを搭載したレトロウイルスを用いて、shRNAを恒常発現する細胞株を樹立した。(A)100ng/ml LPS の条件で図示の期間刺激後、各炎症性サイトカインの発現量をqPCRで解析した。
(B)100ng/ml LPS の条件で5時間刺激後、マイクロアレイで解析した。

3. LASC ノックダウンによる NF- κ B の核内移行は正常に起こる

炎症性サイトカインの発現誘導において転写因子 NF- κ B の活性化が重要である。LASC による炎症性サイトカインの発現制御機構を明らかにするために NF- κ B の LPS 刺激依存的な核内移行を検討した。LASC-KD およびコントロール-KD 細胞を 100ng/ml LPS で 20 分から 300 分（5 時間）刺激し、I κ B α の LPS 刺激依存的な分解をウェスタンブロッティングで検討した。その結果、I κ B α の分解は LPS 刺激後、20 分で分解され、その後、新たに合成された I κ B α の発現が見られた。しかし、LASC-KD およびコントロール-KD 細胞間で違いは見られなかった (Fig. 3A)。さらに、NF- κ B の構成因子である RelA および p50 の核内移行も正常に起こっていた (Fig. 3B) これらの結果から、LASC は NF- κ B の核内移行には関与しないことが示唆された。

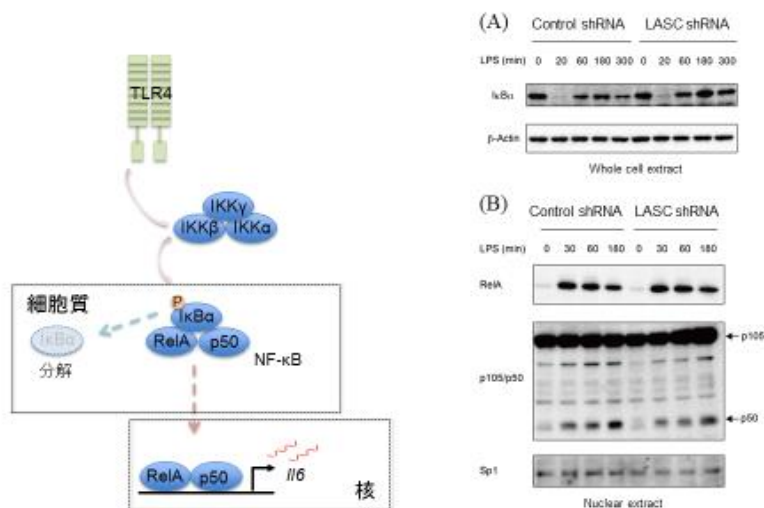


Fig.3 NF- κ Bは正常に活性化している
コントロール細胞。LASC KD細胞を00ng/mlのLPSにより刺激し、細胞からRNAを抽出、qPCRを用いて解析を行った。
(A)刺激0,20,60,180,300分後の各細胞をライゼートにし、ウェスタンブロッティングによりI κ B α の発現を確認した。
(B)刺激0,30,60,180分後の各細胞から核分画のライゼートを抽出し、ウェスタンブロッティングによりp50やRelAの発現を確認した。

4. LASC ノックダウンにより RelA のプロモーターへの動員が低下する

次に LPS 刺激依存的な RelA の炎症性サイトカイン遺伝子のプロモーターへの動員をクロマチン免疫沈降法により検討した。LASC-KD およびコントロール-KD 細胞を 100ng/ml LPS で 1 時間または 3 時間刺激した後に抗 RelA 抗体を用いて、ChIP アッセイを行った。得られた DNA を定量 PCR で解析した。LPS 刺激により RelA は IL-6 や GM-CSF、TNF 遺伝子のプロモーター領域へ 1 時間以内に結合するが、LASC-KD 細胞ではこれらのプロモーター領域への RelA の結合が見られなかった (Fig. 4)。以上の結果から LASC は RelA のプロモーター領域への動員に寄与することが示唆された。

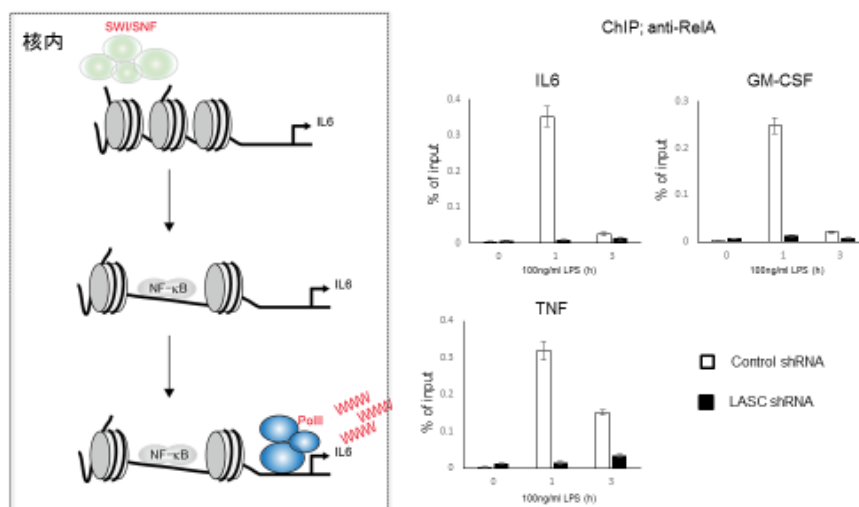


Fig.4 LASC KDによりRelAのプロモーター領域への結合が阻害される
コントロール細胞、LASC KD細胞に対して100ng/mlのLPSを加え、刺激した。刺激0,1,3時間後の各細胞からDNAを抽出し、anti-RelA抗体を用いてChIPを行う事でRelAの結合しているDNA領域を濃縮、qPCRにて解析を行った。

5. LASC ノックダウンにより RNA polymerase II の動員が低下する

続いて、転写レベルにおける炎症性サイトカインの発現低下を検証するために、RNA ポリメラーゼ II の転写開始点およびエクソン領域への動員を検証した。LASC-KD およびコントロール-KD 細胞を 100ng/ml LPS で 3 時間または 5 時間刺激した後に抗 RNA ポリメラーゼ II 抗体を用いて、ChIP アッセイを行った。得られた DNA を定量 PCR で解析した。LPS 刺激により IL-6 および GM-CSF 遺伝子の転写開始点およびエクソン領域へ RNA ポリメラーゼ II が動員されたが、LASC-KD 細胞においては RNA ポリメラーゼ II の動員が顕著に低下した。TNF 遺伝子は LPS 刺激の前からすでに転写開始点およびエクソン領域へ RNA ポリメラーゼ II の動員が見られるが、LPS 刺激により亢進する。LASC-KD 細胞においては LPS 刺激により動員される RNA ポリメラーゼ II の顕著な低下が見られた (Fig. 5)。以上の結果から、LASC ノックダウンによる炎症性サイトカインの発現低下は LPS 刺激依存的な RNA ポリメラーゼ II の転写開始点への動員の低下であり。転写レベルにおける発現抑制であることが強く示唆される。

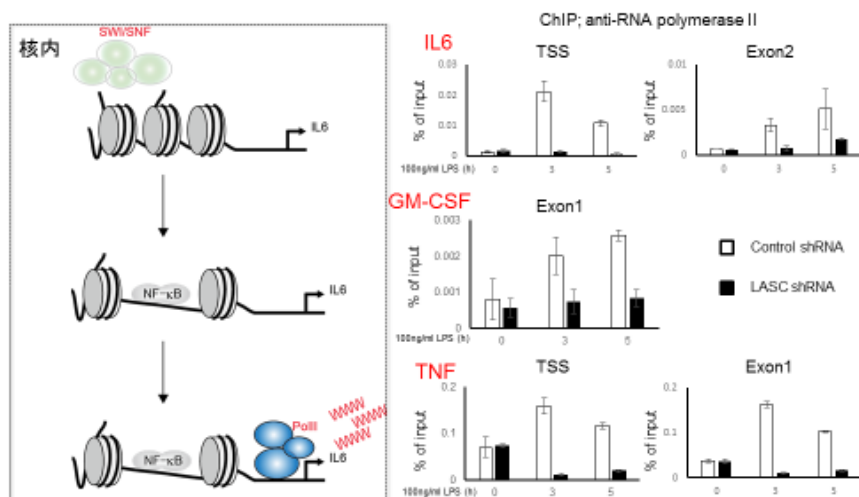


Fig.5 LASC KDによりRNAポリメラーゼ II の動員が低下する
コントロール細胞、LASC KD細胞に対して100ng/mlのLPSを加え、刺激した。刺激0,1,3時間後の各細胞からDNAを抽出し、anti-RNA polymerase II抗体を用いてChIPを行う事でRelAの結合しているDNA領域を濃縮、qPCRにて解析を行った。

6. IL-6 遺伝子座のクロマチンリモデリングは正常に起こる

IL-6 などの転写活性化は ATP 依存的なクロマチンリモデリングが重要であることが明らかになっている。(7)そこで、LASC ノックダウンによる IL-6 遺伝子座の LPS 刺激依存的なクロマチンリモデリングを Restriction enzyme accessibility assay を用いて検証した。LASC-KD およびコントロール細胞を 100ng/ml LPS で 1 時間から 5 時間刺激し、各抽出物を制限酵素 EcoNI で処理した後、IL-6 および TNF プロモーター特異的プローブを用いてサザンブロッティングを行った。クロマチンリモデリングを必要としない TNF プロモーターは LPS 刺激非依存的なオープンクロマチン状態であることが示された。一方で、IL-6 プロモーターは LPS 刺激依存的にクロマチンリモデリングが起こる。しかし、両者の間で差は見られなかった。以上のことから、LASC はプロモーター領域および転写開始点への NF- κ B や RNA ポリメラーゼ II の動員を促進することで炎症性サイトカインの発現を制御することが示唆された。

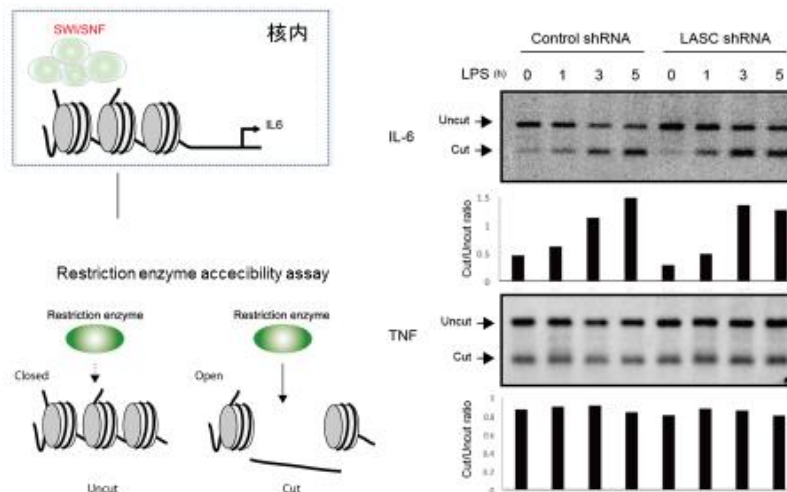


Fig.6 LASC KDはクロマチン再構成には影響を与えない
コントロール細胞、LASC KD細胞に対して100ng/mlのLPSを加え、刺激した。刺激0,1,3,5時間後の各細胞からDNAを抽出し、プロモーター領域を切断する制限酵素を1時間作用させ、サザンブロッティングにより解析を行った。

7. LASC ノックアウトマウス (KO) は LPS ショックに対して抵抗性を示す

LASC は炎症性サイトカインの発現を転写レベルで制御することが明らかになった。そこで LASC の炎症疾患における役割を明らかにするために LASC KO マウスを作製した。ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を用いて LASC の第 2 エクソンに SV40 ウィルス由来のポリ A 鎖付加配列 (222 塩基) をノックインすることで LASC の転写を終結させ、機能的な LASC の発現が欠失する。C57BL/6J マウス受精卵に Cas9 タンパク質をコードする mRNA、LASC 第 2 エクソンを標的とするガイド RNA およびポリ A 鎖付加配列を含む 1 本鎖 DNA をマイクロインジェクションし、2 細胞期まで培養した後に、偽妊娠マウスに移植し、LASC KO を得た。LASC KO マウスおよび野生型 (WT) マウスの腹腔に 20mg/ml の LPS を投与し、生存率を観察した。その結果、WT マウスが 24 時間以内にすべて死亡するのに対して、LASC KO マウスは半数以上が生存した。以上の結果から、LASC は全身性の炎症応答の惹起に重要であることが明らかになった。

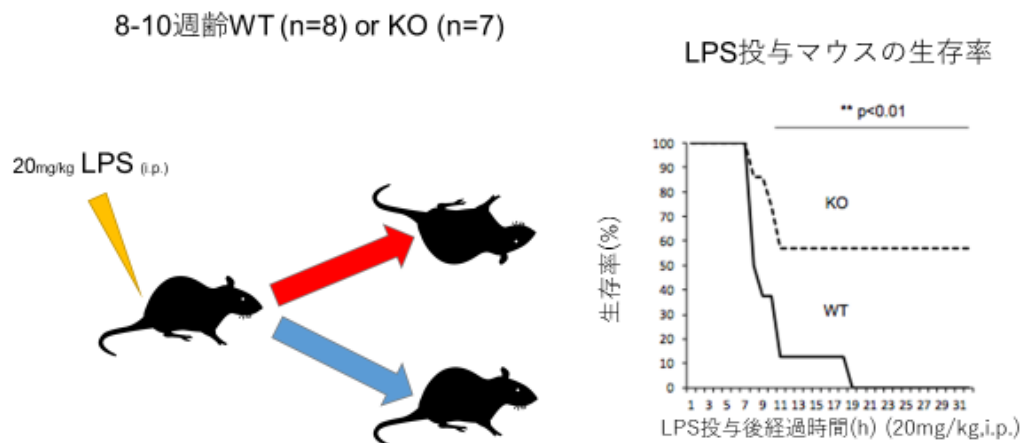


Fig.7 LASC KOマウスはLPSショックへの抵抗性を示す
WT, KO 両群に対し20mg/kgのLPSを腹腔内に投与し32時間にわたりマウスの状態を観察した。投与後20時間以内にWTマウス群は全個体が死亡したが、LASC KOマウス群では、WT群と比較して劇的な致死率の改善が見られた。

8. LASC KO マウスは硫酸デキストランナトリウム誘導性腸炎に対し高い感受性を示す

次に急性炎症モデルである硫酸デキストランナトリウム（DSS）誘導性腸炎モデルを用いて LASC の役割を検討した。DSS は多糖類の一種グルコースの重合体であるデキストランを硫酸化したもので、腸管上皮組織を損傷させることが知られている。これにより腸内細菌によりと基底膜周辺のマクロファージが活性化され、大腸炎を引き起こす。LASC KO マウスおよび WT マウスに 3 % DSS を含む飲料水を 7 日間摂取させ、その後通常飲料水で 5 日間飼育した。この間の体重変化および生存率を測定した。その結果、DSS 摂取による体重減少において LASC KO マウスおよび WT マウス間で変化は見られなかった。しかし、LASC KO マウスは 12 日目までにすべて死亡した。以上の結果から、LASC は DSS 誘導性腸炎においては抑制的に機能することが示唆された。

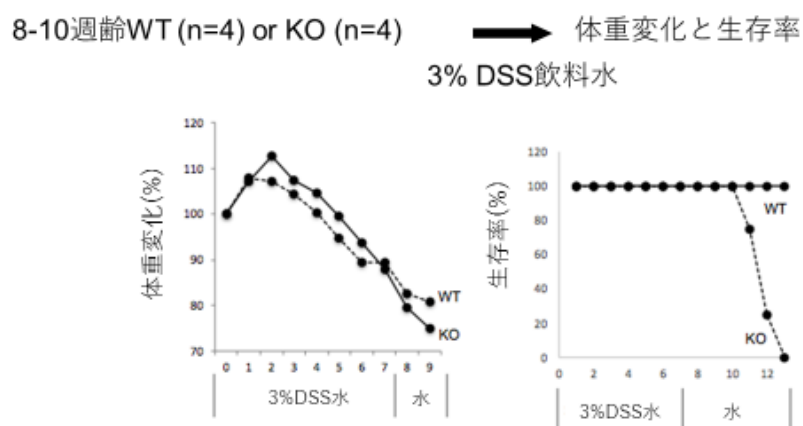


Fig.8 LASC KOマウスはDSS誘導性大腸炎に高い感受性を示す
WT, KO両群に3%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)飲料水を摂取させ大腸炎を誘導した。その後12日間にわたり体重変化及び生存率を比較したところ、3%DSS飲料水摂取開始後12日までに全KOマウスが死亡した。
体重変化(%)は各日に測定した値の平均/0日に測定した値の平均で算出している。

考察

本研究において我々が同定した lncRNA である LASC は炎症性サイトカインの発現を転写レベルで正に制御し、LASC は炎症病態の形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。マクロファージをはじめとした抗原提示細胞は TLR を介して様々な炎症性サイトカインの発現を誘導する。しかし、これらの炎症性サイトカインの過度な活性化は炎症性疾患原因となると考えられている。そのため、炎症応答の活性化とそれに伴う抑制のバランスが厳密に制御されている。炎症応答における ncRNA の役割は sncRNA である miRNA を中心に理解が進んできた。miR-146a は NF- κ B へのシグナル伝達経路において重要な TRAF6 や IRAK1 を翻訳レベルで抑制することで炎症応答を抑制する(8)。実際に miR-146a ノックアウトマウスは種々の炎症モデルや自己免疫疾患モデルに対して高い感受性を示し、加齢に伴うリンパ腫を自然発症する。一方で、lncRNA の炎症応答における役割はほとんどわかっていない。近年、linc-COX2(4)や lincRNA-EPS(5)が TLR リガンドにより誘導される lncRNA として同定され、核内において hnRNP-A/B や hnRNPL と相互作用することで炎症性サイトカインや 1 型インターフェロンの発現を制御することが報告された。しかし、これらの lncRNA の炎症疾患や自己免疫疾患における役割は明らかにされていない。我々はポリ A 鎖付加配列をノックインすることで LASC KO マウスの作製に成功した。LASC KO マウスは *in vitro* での知見と一致して、LPS の投与によるエンドトキシンショックに対して抵抗性を示した (Fig. 7)。一方で、DSS 誘導性大腸炎においては高い感受性を示した (Fig. 8)。これらの結果は LASC が炎症病態の形成において異なる役割を担うことを示唆する。

これまでの報告により、DSS 誘導性大腸炎において、TLR2 または TLR4 を欠損したマウスでは DSS 誘導性大腸炎への感受性が高まることが示された。さらに、MyD88 欠損マウスではさらに感受性が高まることが明らかになった。加えて、抗生物質の持続的な摂取により腸内細菌を消失させると DSS 誘導性大腸炎の病態が悪化する (9)。以上のことから、腸内細菌または腸内細菌由来成分と TLR を介した持続的なシグナルが腸管の恒常性の維持および腸炎の発症抑制に重要であることが強く示唆される。細菌由来の非メチル化 CpG DNA をリガンドとする TLR9 は 1 型インターフェロンの産生を介して DSS 誘導性腸炎の発症において保護的に働くことが示されている(10)。さらに 1 型インターフェロンにより転写因子 IRF3 を介して誘導される IL-33 や TSLP は同様に DSS 誘導性腸炎の抑制に重要である(11)。これらのサイトカインは LASC をノックダウンした RAW264.7 細胞

において、同じく IRF3 を活性化する細菌成分である LPS で刺激した際に発現が低下していることを見出している。また、IL-6 は腸管上皮細胞の増殖に重要なサイトカインであることはよく知られている。以上のことから、炎症性サイトカインの発現を正に制御する LASC は大腸においては IL-33 や TSPL、IL-6 の発現を亢進することで腸管上皮細胞の恒常性の維持に寄与し、腸炎の発症を抑制することが示唆される。

本研究により、LASC による TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインの発現制御は転写レベルにおける制御であることが示された。LASC-KD 細胞は LPS で誘導される RelA の TNF、IL-6 および GM-CSF プロモーター領域に存在する κ B エレメントへの動員が低下する (Fig. 4) さらに、RNA polymerase II の LPS 依存的な転写開始点およびエクソン領域への動員も顕著に低下する (Fig. 5)。しかし、LASC-KD 細胞は LPS 刺激に伴う NF- κ B の核移行や IL-6 遺伝子座のクロマチンリモデリングは正常であった (Fig. 3 および Fig. 6)。すなわち、LASC の発現低下により、NF- κ B の構成因子である RelA および RNA ポリメラーゼ II の動員低下を介して転写レベルで炎症性サイトカインの発現が減少すると考えられる。

興味深いことに、LASC は主に細胞質に局在することを RNA-FISH (RNA-Fluorescence in situ hybridization) および細胞分画における発現の定量 PCR による解析から確認している。しかし、LASC のノックダウンにより炎症性サイトカインの発現は RelA や RNA ポリメラーゼ II の動員低下に伴う転写レベルに原因があると考えられる。すなわち、LASC を介したメカニズムをして2つの可能性が考えられる。1つ目として LASC は細胞質に局在する分子の機能を活性化または阻害することで間接的に転写レベルにおける発現を制御することが挙げられる。2つ目は核内に存在する一部の LASC 分子が転写レベルにおける制御に関わることが考えられる。これらの可能性を検証する上で、ビオチン化 RNA やプロモウリジン標識した RNA によるプルダウン(12)や近年開発された ChIRP-MS 法(13-14)を用いた LASC 結合分子を同定することで LASC による炎症性サイトカインの発現制御機構の詳細を明らかにできることが期待される。

LASC はヒトにおいてそのオーソログが存在することが示唆されており、本研究で明らかにしたマウス LASC 遺伝子の役割がヒトにおいても同様な機能を持ち、腸炎をはじめとする炎症性疾患や自己免疫疾患の病態形成への寄与は大変興味深い。

参考文献

1. Stefan Rüegger, Helge Großhans.(2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Cell*. 37, 436–446
2. Carolyn J. Brown, Andrea Ballabio, James L. Rupert, Ronald G. Lafreniere, Markus Grompe, Rossana Tonlorenzi & Huntington F. Willard.(1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*. 349, 38–44
3. Matthew S. Hayden and Sankar Ghosh.(2012). NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & Dev*. 26, 203-234
4. Susan Carpenter, Daniel Aiello, Maninjay K. Atianand, Emiliano P. Ricci, Pallavi Gandhi, Lisa L. Hall, Meg Byron⁴, Brian Monks, Meabh Henry-Bezy, Jeanne B. Lawrence, Luke A. J. O'Neill, Melissa J. Moore, Daniel R. Caffrey, Katherine A. Fitzgerald.(2013). A Long Noncoding RNA Mediates Both Activation and Repression of Immune Response Genes. *Science* . 341, 789-792
5. Maninjay K. Atianand , Wenqian Hu , Ansuman T. Satpathy, Ying Shen, Emiliano P. Ricci, Juan R. Alvarez-Dominguez, Ankit Bhatta, Stefan A. Schattgen, Jason D. McGowan, Juliana Blin, Joerg E. Braun, Pallavi Gandhi, Melissa J. Moore, Howard Y. Chang, Harvey F. Lodish, Daniel R. Caffrey, Katherine A. Fitzgerald.(2016). A Long Noncoding RNA lincRNA-EPS Acts as a Transcriptional Brake to Restrain Inflammation. *cell* . 165, 1672-1685
6. Michal Krawczyk and Beverly M Emerson.(2014). p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates COX-2 gene expression by occluding repressive NF- κ B complexes. *eLIFE*
7. Simmie L. Foster, Diana C. Hargreaves & Ruslan Medzhitov.(2007). Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 447, 972–978
8. Reuben Saba, Debra L. Sorensen and Stephanie A. Booth.(2014). MicroRNA-146a: a dominant, negative regulator of the innate immune response. *Frontiers in Immunology*.

9. Seth Rakoff-Nahoum, Justin Paglino, Fatima Eslami-Varzaneh, Stephen Edberg, Ruslan Medzhitov.(2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell*. 118, 229-241
10. Kyoko Katakura, Jongdae Lee, Daniel Rachmilewitz, Gloria Li, Lars Eckmann, and Eyal Raz.(2005). *The Journal of Clinical Investigation*. 115, 695–702
11. Hideo Negishi, Shoji Miki, Hana Sarashina, Naoko Taguchi-Atarashi, Akira Nakajima, Kosuke Matsuki, Nobuyasu Endo, Hideyuki Yanai, Junko Nishio, Kenya Honda, and Tadatsugu Taniguchi.(2012). Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 21016-21021
12. Hidekazu Iioka, David Loiselle, Timothy A. Haystead, Ian G. Macara. Efficient detection of RNA–protein interactions using tethered RNAs. *Nucleic Acids Research*. 39, 53
13. Ci Chu, Qiangfeng Cliff Zhang, Simão Teixeira da Rocha, Ryan A. Flynn, Maheetha Bharadwaj, J. Mauro Calabrese, Terry Magnuson, Edith Heard, Howard Y. Chang. Systematic Discovery of Xist RNA Binding Proteins. *Cell* . 161, 404-416
14. Yongfang Yang, Liwei Wen, and Hongliang Zhu. Unveiling the hidden function of long non-coding RNA by identifying its major partner-protein. *Cell & Bioscience*

謝 辞

本研究を行うにあたり丁寧なご指導をいただいた東京医科歯科大学 大学院 システム発生・再生医学分野の千葉 朋希助教、浅原 弘嗣教授に厚く御礼申し上げます。

図表一覧

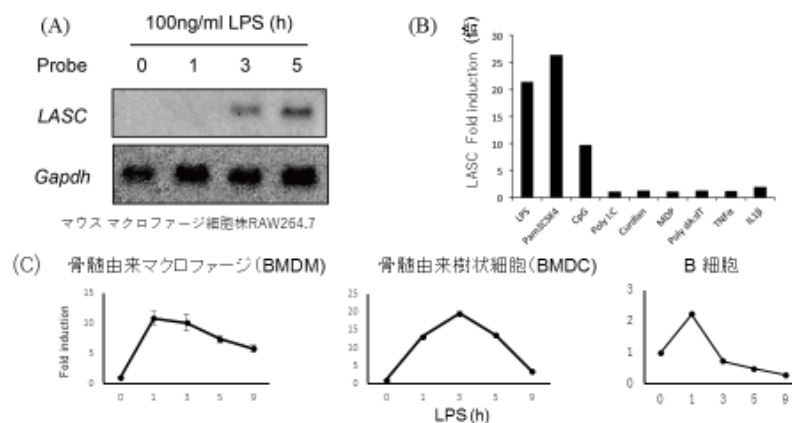


Fig.1 LASCは抗原提示細胞に存在するToll用受容体(TLR)ヘリガンド刺激を加えることにより誘導される。
 (A)マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞を100ng/ml LPSの条件で図示した時間刺激し、発現量をノーザンブロッティングで解析した。
 (B)マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞を100ng/ml 各リガンドの条件で3時間刺激し、LASC発現量をqPCRで解析した。
 (C)各細胞を100ng/ml LPSの条件で図示した時間刺激し、LASC発現量をqPCRで解析した。

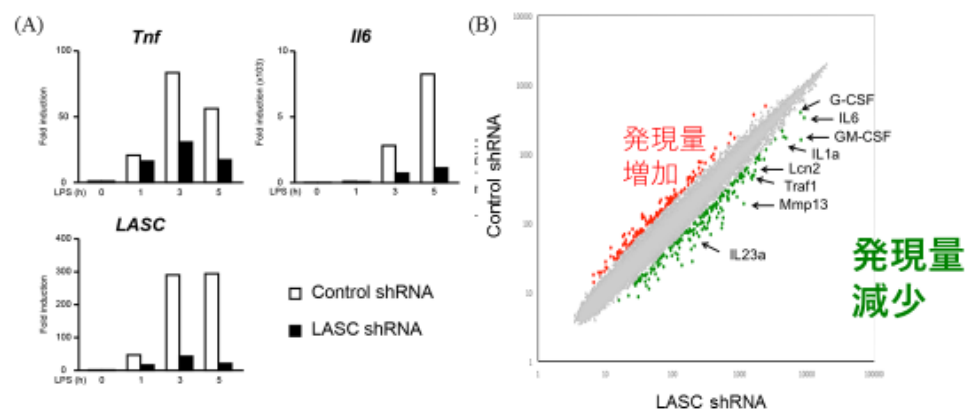


Fig.2 LASCのノックダウンで炎症性サイトカインの発現量が低下する
 LASCに対するshRNA、又はコントロールとしてLacZに対するshRNAを搭載したレトロウィルスを用いて、shRNAを恒常発現する細胞株を樹立した。(A)100ng/ml LPS の条件で図示の期間刺激後、各炎症性サイトカインの発現量をqPCRで解析した。
 (B)100ng/ml LPS の条件で5時間刺激後、マイクロアレイで解析した。

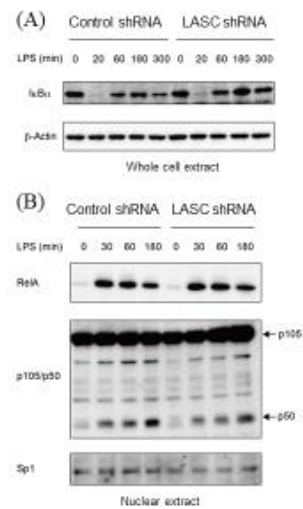
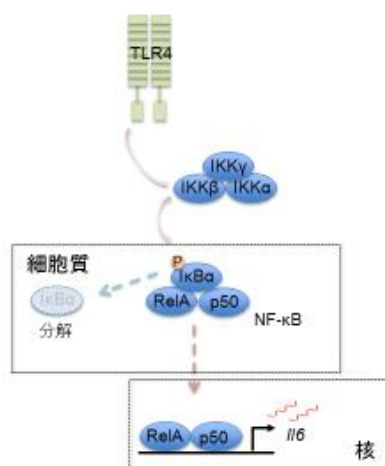


Fig.3 NF-κBは正常に活性化している
コントロール細胞。LASC KD細胞を00ng/mlのLPSにより刺激し、細胞からRNAを抽出、qPCRを用いて解析を行った。
(A)刺激0,20,60,180,300分後の各細胞をライゼートにし、ウェスタンブロッティングによりIκBαの発現を確認した。
(B)刺激0,30,60,180分後の各細胞から核分画のライゼートを抽出し、ウェスタンブロッティングによりp50やRelAの発現を確認した。

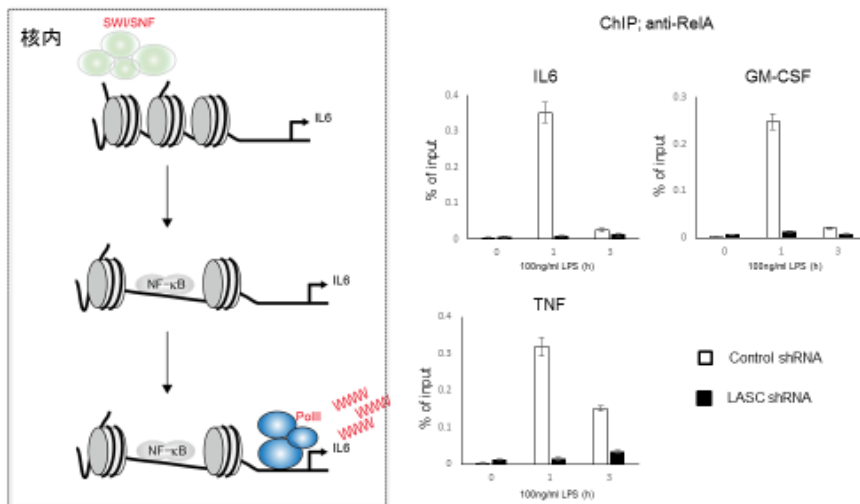


Fig.4 LASC KDによりRelAのプロモーター領域への結合が阻害される
コントロール細胞。LASC KD細胞に対して100ng/mlのLPSを加え、刺激した。刺激0,1,3時間後の各細胞からDNAを抽出し、anti-RelA抗体を用いてChIPを行う事でRelAの結合しているDNA領域を濃縮、qPCRにて解析を行った。

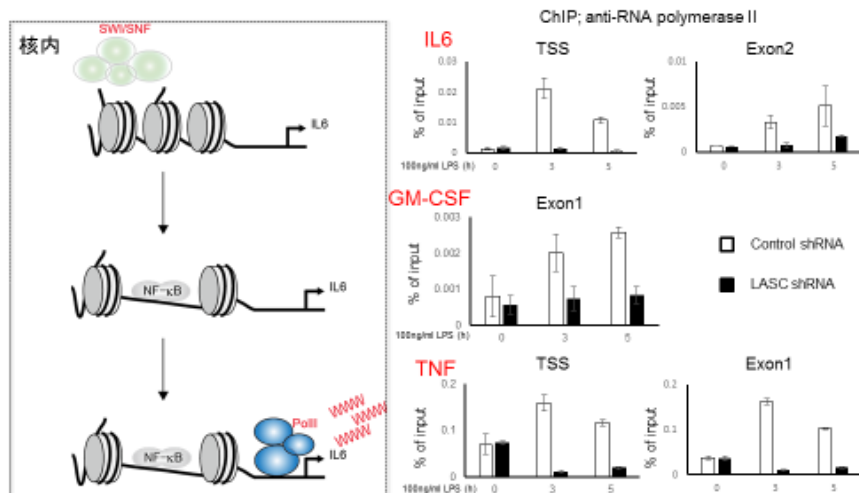


Fig.5 LASC KDによりRNAポリメラーゼIIの動員が低下する
コントロール細胞、LASC KD細胞に対して100ng/mlのLPSを加え、刺激した。刺激0,1,3時間後の各細胞からDNAを抽出し、anti-RNA polymerase II抗体を用いてChIPを行う事でRelAの結合しているDNA領域を濃縮、qPCRにて解析を行った。

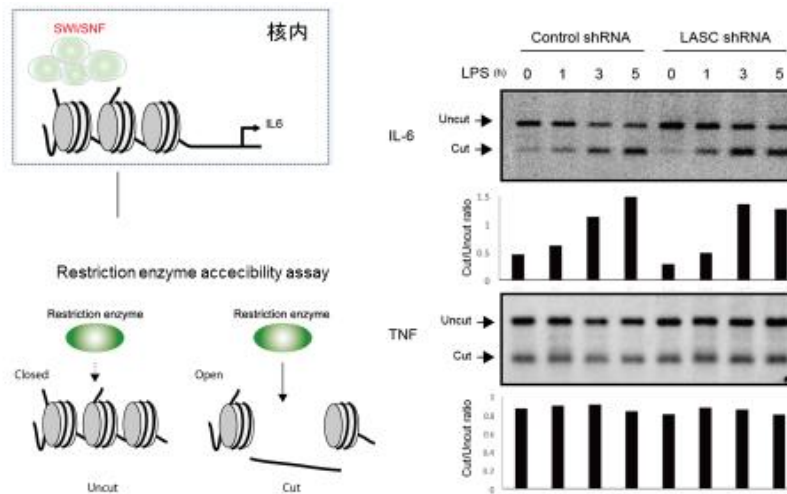


Fig.6 LASC KDはクロマチン再構成には影響を与えない
 コントロール細胞、LASC KD細胞に対して100ng/mlのLPSを加え、刺激した。刺激0,1,3,5時間後の各細胞からDNAを抽出し、プロモーター領域を切断する制限酵素を1時間作用させ、サザンブロッティングにより解析を行った。

8-10週齢WT (n=8) or KO (n=7)

LPS投与マウスの生存率

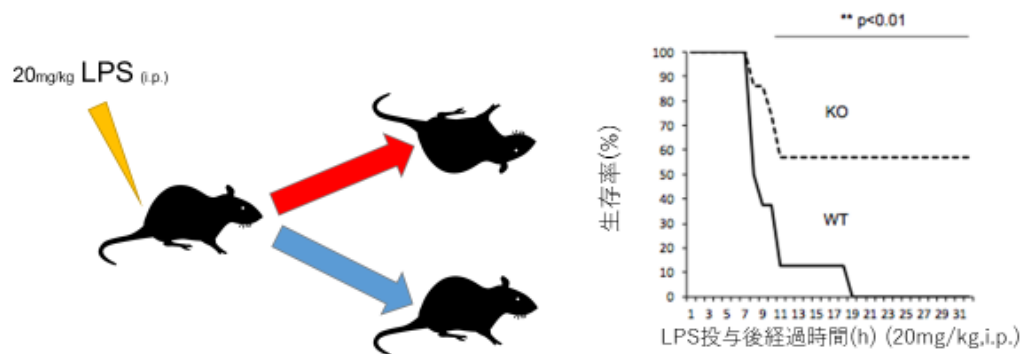


Fig.7 LASC KOマウスはLPSショックへの抵抗性を示す
WT, KO 両群に対し20mg/kgのLPSを腹腔内に投与し32時間にわたりマウスの状態を観察した。投与後20時間以内にWTマウス群は全個体が死亡したが、LASC KOマウス群では、WT群と比較して劇的な致死率の改善が見られた。

8-10週齢WT (n=4) or KO (n=4) **→** 体重変化と生存率
3% DSS飲料水

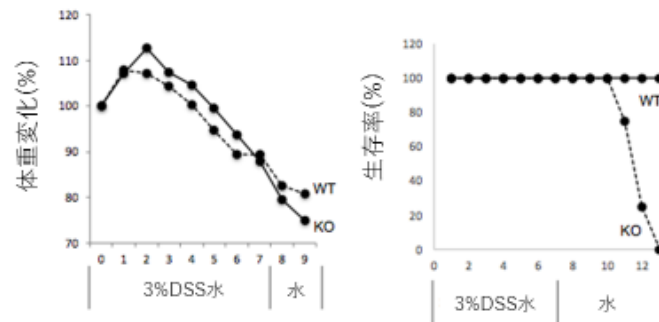


Fig.8 LASC KOマウスはDSS誘導性大腸炎に高い感受性を示す
WT, KO両群に3%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)飲料水を摂取させ大腸炎を誘導した。その後12日間にわたり体重変化及び生存率を比較したところ、3%DSS飲料水摂取開始後12日までに全KOマウスが死亡した。
体重変化(%)は各日に測定した値の平均/0日に測定した値の平均で算出している。