全身性エリテマトーデス（SLE）の病態に関与する
２つのマイクロ RNA が働く仕組みを解明
～ヒトとシーラカンスの共通点が物語るマイクロ RNA の作用機構の進化的変遷～

名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科学の北井啓己 大学院生・客員研究員（筆頭著者、現在 米国デューク大学 博士研究員）、加藤規利 講師（責任著者）、丸山彰一 教授、分子生物学の門松健治教授、分子腫瘍学の鈴木洋 教授（責任著者）らの研究グループは、全身性エリテマトーデス（SLE）※1 の病態において２つのマイクロ RNA※2 の異常が重要であることを見出し、さらに、統合的バイオインフォマティクス※3 を通じて、２つのマイクロ RNA の働く仕組みの多様性と、進化的変遷の特徴を明らかにしました。

マイクロ RNA は、長さ約 22 塩基の小さな RNA で、さまざまな標的 mRNA に結合することで標的 mRNA を抑制し、その調節異常は多くの疾患に関与しています。

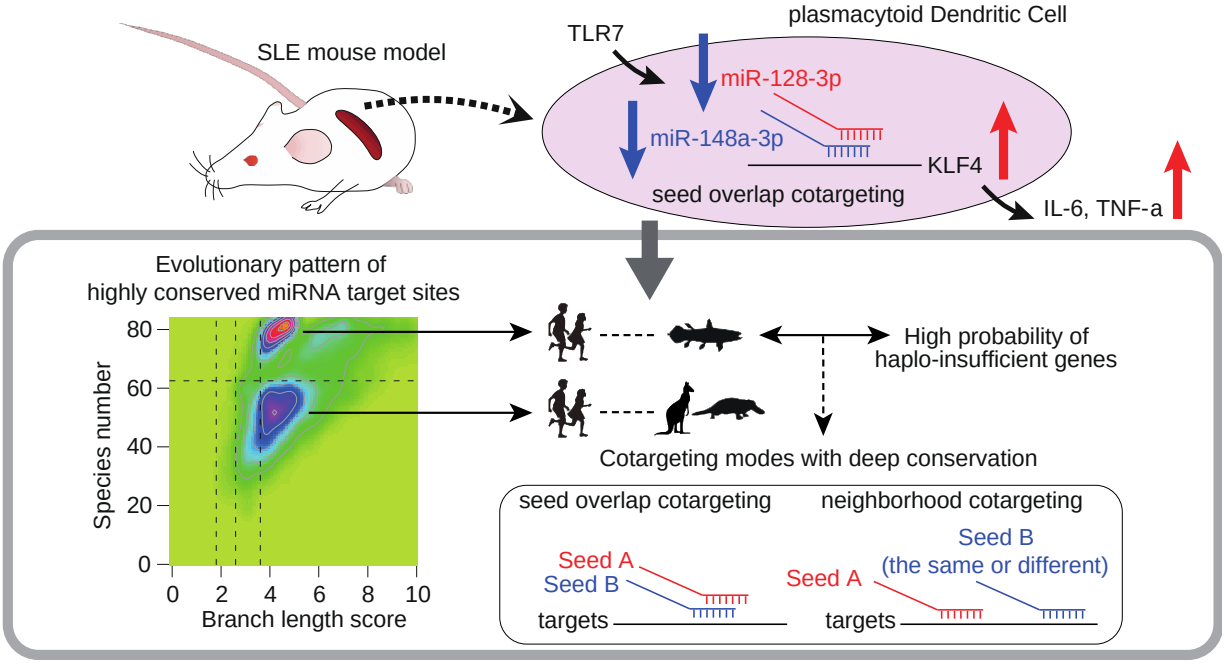
本研究では、難治性の自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）に注目し、SLE の病態に関係するマイクロ RNA を同定しました。SLE マウスモデルの解析から、マイクロ RNA-128・マイクロ RNA-148a という 2 つのマイクロ RNA の発現低下が、この２つのマイクロ RNA 両方の標的遺伝子である KLF4 の発現上昇につながり、SLE の病態に関係する炎症性サイトカイン※4 の産生を引き起こす可能性を見出しました。

従来、１つのマイクロ RNA が標的遺伝子を抑制する効果は小さく、２つ以上のマイクロ RNA が同じ標的遺伝子の「違う配列」に結合することで協調的に遺伝子を抑制することが注目されてきました。一方で、本研究で同定されたマイクロ RNA-128 とマイクロ RNA-148a は、配列が似ており、同じ標的遺伝子の「重複した配列」に付加的に作用することで遺伝子抑制の可能性を高めることを明らかにしました。本研究グループは、マイクロ RNA-128・マイクロ RNA-148a と KLF4 の関係性がヒトでもシーラカンスでも同じようにみられることに着目し、２つのマイクロ RNA の働く仕組みの多様性と、進化的変遷の特徴を詳細に解析しました。この結果、興味深いことに、マイクロ RNA が制御する標的 mRNA の標的配列には、ヒトからシーラカンスまで幅広く保存されたものと、ヒトから有袋類までの哺乳類に保存されたものの大きな２つのグループがあり、より保存されたものほど「違う配列」と「重複した配列」両方の様式を通じて、複数（２つ以上）のマイクロ RNA による制御を受けやすいことが明らかになりました。

SLE はいまだに 10-30%の患者さんが末期腎不全にいたる難治性自己免疫疾患であり、本研究結果はその病態のより詳細な理解につながることが期待されます。さらに、こうした複数のマイクロ RNA による遺伝子制御の理解は、SLE のみならず、他疾患の病態の詳細な解明や、マイクロ RNA を応用した核酸医薬の精密な制御につながることも期待されます。

本研究成果は「BMC Biology」（2022 年 11 月 11 日付電子版）に掲載されました。

●全身性エリテマトーデス（SLE）の病態に関与する２つのマイクロRNAが働く仕組みを解明



●ヒトとシーラカンスの共通点が物語るマイクロRNAの作用機構の進化的変遷

ポイント

○難治性自己免疫性疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）は、効果の高い治療の開発に難渋しており、その病態の詳細を明らかにすることは非常に重要です。

○SLE マウスモデルにおいて、２つのマイクロ RNA（マイクロ RNA-128・マイクロ RNA-148a）の低下が炎症応答を促進することを見出しました。

○２つのマイクロ RNA が標的遺伝子を調節する仕組みの新しい様式について、その詳細な特徴を明らかにしました。

○マイクロ RNA が制御する標的 mRNA の標的サイトには、ヒトからシーラカンスまで幅広く保存されたものと、ヒトから有袋類までの哺乳類に保存されたものの大きな２つのグループがあり、より保存されたものほど２つ以上のマイクロ RNA による制御を受けやすいことが明らかになりました。

○複数のマイクロ RNA による遺伝子制御の理解は、SLE のみならず、他疾患の病態の詳細な解明や、マイクロ RNA を応用した核酸医薬の精密な制御につながることも期待されます。

１．背景

マイクロ RNA は、長さ約 22 塩基の小さな RNA で、さまざまな標的 mRNA に結合することで標的 mRNA を抑制する重要な遺伝子調節のプレーヤーです（図１左）。その調節異常は多くの疾患に関与していることが報告されてきました。従来、1つのマイクロ RNA が標的遺伝子を抑制する効果は小さく、2つ以上のマイクロ RNA が同じ標的遺伝子の「違う配列」に結合することで協調的に遺伝子を抑制することが注目されてきました（図1右）。一方で、多様な疾患で複数のマイクロ RNA の発現異常が報告されていますが、複数のマイクロ RNA の発現異常の組み合わせがどのように疾患の病態に関与しているかについては詳細な検討はされていませんでした。

全身性エリテマトーデス（SLE）は、自己抗体の産生が起きることで、全身臓器に免疫複合体が沈着す

る疾患であり、免疫抑制薬による治療にも関わらず 10-30%の患者が末期腎不全に至る難治性の自己免疫疾患です。SLE の病態には形質細胞様樹状細胞（プラズマサイトイド樹状細胞，pDC）※5 が大きく関わっており、pDC に関わる病態をターゲットとした新規治療薬の開発が試みられていますが、その開発は難渋しており、より詳細に SLE における pDC の役割を検討する必要性があります。SLE では、さまざまな免疫細胞においてマイクロ RNA の発現異常が報告されていますが、pDC におけるマイクロ RNA の変化についてはこれまで深く検討されていませんでした。研究グループは、SLE マウスモデルの pDC におけるマイクロ RNA の発現異常に注目し、さらに統合的バイオインフォマティクスを通じて、2つのマイクロ RNA の働く仕組みの多様性と、進化的変遷の特徴を解析しました。

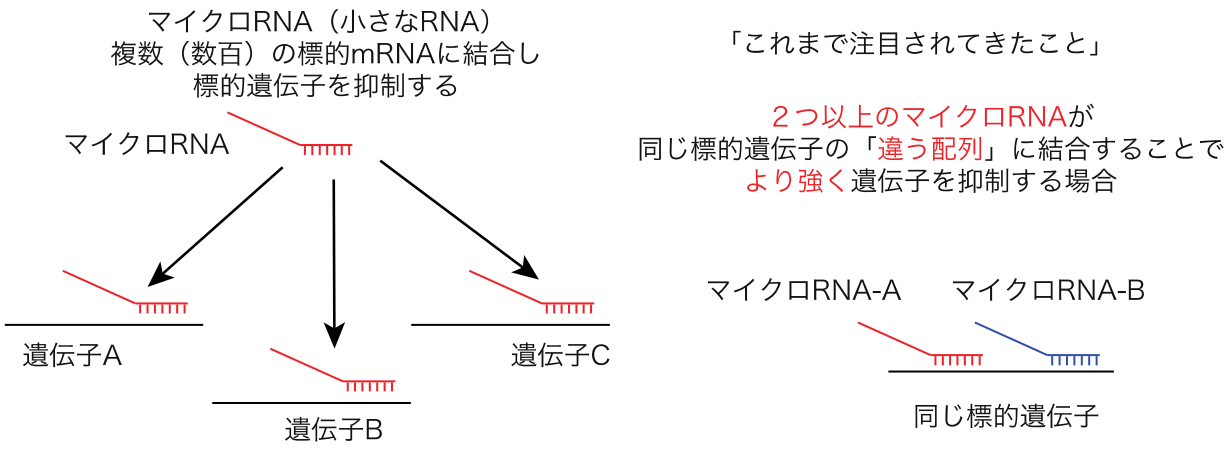


図１：マイクロ RNA による遺伝子の制御

２．研究成果

(1) SLE マウスモデルにおいて低下する２つのマイクロ RNA の同定

研究グループは、Toll 様受容体※6TLR7 のアゴニスト（作用薬）であるイミキモド（IMQ）をマウスの耳に塗ることで pDC が刺激され全身において SLE 症状が出現する SLE マウスモデルから、pDC を分離し、網羅的にマイクロ RNA の発現変動を解析しました。この結果、コントロールマウスと比較して SLE モデルマウスの pDC において、２つのマイクロ RNA（マイクロ RNA-128・マイクロ RNA-148a）が低下していることを見出しました（図２左）。

ヒト形質細胞様樹状細胞株でこの２つのマイクロ RNA が炎症応答を調節している可能性を検討したところ、TNFα、IL-6 といった炎症性サイトカインの産生が、２つのマイクロ RNA を導入した場合に、１つのマイクロ DNA だけを導入した場合よりも強く抑制されることが明らかになりました。この現象のメカニズムを明らかにするため、この２つのマイクロ RNA の標的遺伝子を探索した結果、２つのマイクロ RNA が KLF4 と呼ばれる標的遺伝子の「重複した配列」に付加的に作用することでより強く KLF4 を抑制することを見出しました。より詳細な検討の結果、２つのマイクロ RNA の低下と、これに呼応する KLF4 の上昇が炎症応答を促進し SLE の病態に関与する可能性が示唆されました（図２右）。

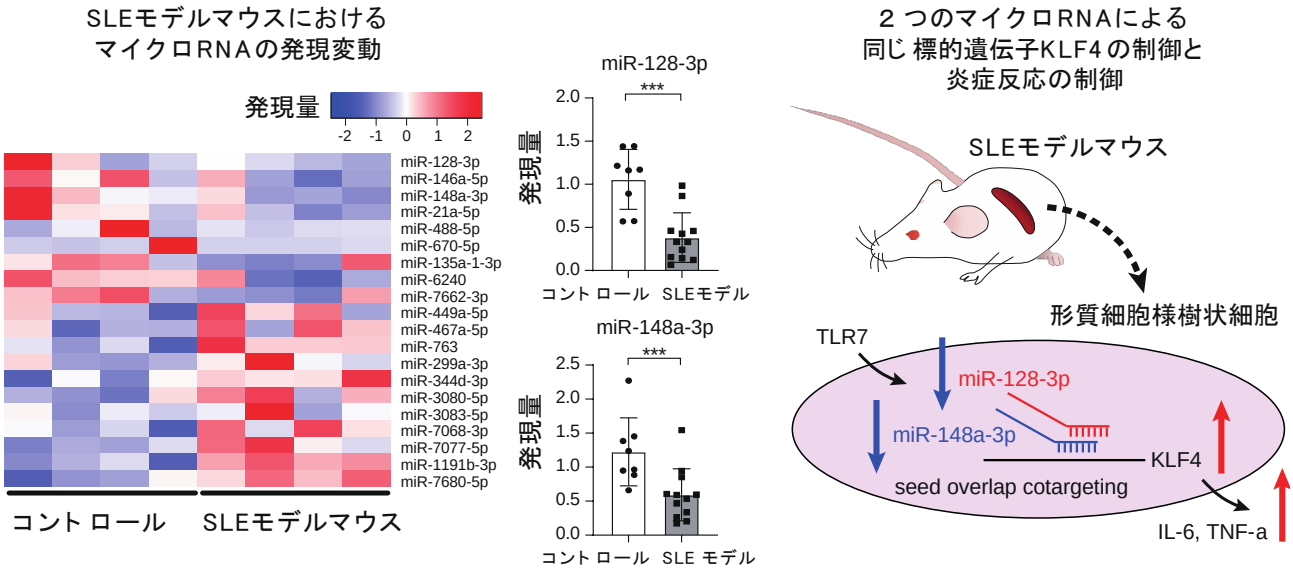


図２:SLE マウスモデルにおける２つのマイクロ RNA(マイクロ RNA-128･マイクロ RNA-148a)の低下

⑵ ２つのマイクロ RNA が働く仕組みの解明

～「重複した配列」を介した複数のマイクロ RNA による遺伝子制御の特徴を明らかに～

２つのマイクロ RNA は厳密には配列が違うため、必ず同じ遺伝子に結合し抑制するわけではありません。では、２つのマイクロ RNA はどのようにして、どのような条件で同じ遺伝子を制御するのでしょうか。そして、２つのマイクロ RNA によって調節されることにはどのような意義があるのでしょうか。

マイクロ RNA-128・マイクロ RNA-148a は、違う配列ではありますが、標的遺伝子と結合する配列が類似しているため、それぞれの標的遺伝子の約 15~20%程度が２つのマイクロ RNA によって結合される可能性があります。このような標的遺伝子は炎症の制御に深く関係していることが分かり、さらに、２つのマイクロ RNA がこのような「重複した標的配列」を持つ遺伝子にどのような影響を及ぼすかを網羅的遺伝子発現解析で検討したところ、「重複した配列」を持つ場合に遺伝子抑制の可能性が高まることが分かりました（図３）。

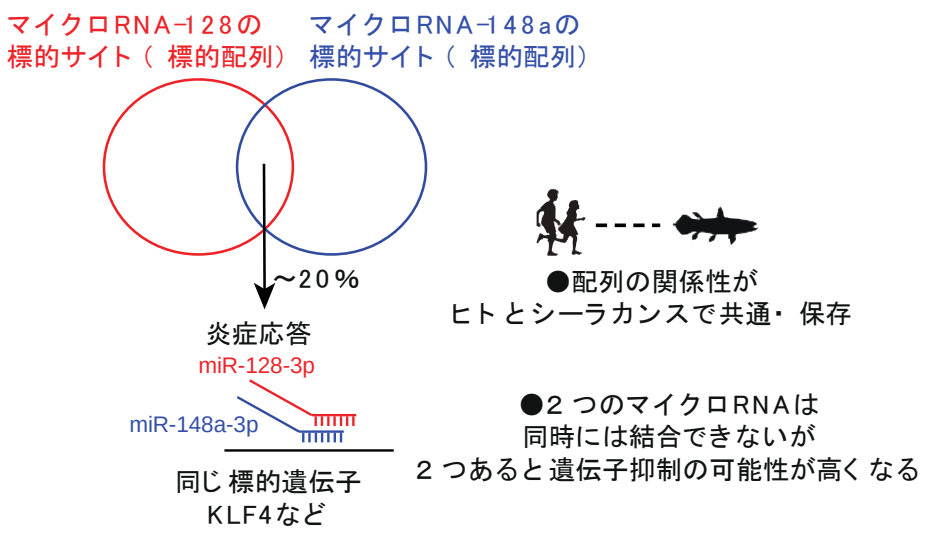


図３ ： ２つのマイクロ RNA が働く仕組み

興味深いことに、マイクロ RNA-128・マイクロ RNA-148a と KLF4 の配列の関係性はヒトとシーラカンスで共通していました（図３）。この知見をもとに、研究グループは、２つのマイクロ RNA が同じ標的遺伝子を制御するということと、マイクロ RNA と標的遺伝子の配列の関係性が進化の過程で保存されるということに何らかのつながりがあるのではないかという仮説をたて、統合的バイオインフォマティクスを通じて、ヒトからシーラカンスまで 84 種類の生物種についてマイクロ RNA と標的遺伝子の関係性を詳細に検証しました。この結果、以下のさまざまな知見が見出されました。

(i) 「重複した配列」を通じて同じ標的遺伝子を制御しうる全てのマイクロ RNA のペアのカタログを作成。

(ii) これらのマイクロ RNA のペアは、炎症応答や細胞周期など特徴的な細胞の機能を制御している可能性がある。

(iii) 進化的によく保存されたマイクロ RNA は、他のマイクロ RNA と類似した配列を持つ可能性が高く、ゆえに、同じ標的遺伝子を制御する可能性が高くなる。

(iv) 類似した配列のマイクロ RNA は、ゲノム上に複数コードされたり、複数のマイクロ RNA を含んだ１つの RNA から作られたりする可能性が高い。つまり、これらのマイクロ RNA の発現量の厳密な調整が生物学的に重要である可能性がある。

(v) マイクロ RNA が制御する標的 mRNA の標的サイト（標的配列）は、ヒトからシーラカンスまで幅広く保存されたものと、ヒトから有袋類までの哺乳類に保存されたものの大きな２つのグループがある。

(vi) ヒトからシーラカンスまで幅広く保存された標的サイト（標的配列）ほど、「違う配列」と「重複した配列」両方の様式を通じて、複数（２つ以上）のマイクロ RNA による制御を受けやすい。

(vii) ヒトからシーラカンスまで幅広く保存された標的サイト（標的配列）を持つ遺伝子ほど、遺伝子の発現量の変化が細胞の機能の変化につながりやすい。つまり、これらの標的遺伝子の発現量の厳密な調整が生物学的に重要である。

これらの知見をまとめると、マイクロ RNA が制御する標的 mRNA の標的サイト（標的配列）には、ヒトからシーラカンスまで幅広く保存されたものと、ヒトから有袋類までの哺乳類に保存されたものの大きな２つのグループがあり、より保存されたものほど「違う配列」と「重複した配列」両方の様式を通じて、複数（２つ以上）のマイクロ RNA による制御を受けやすいことが明らかになりました（図４）。このような遺伝子は、複数のマイクロ RNA の発現と標的遺伝子の発現のバランスによる制御が非常に重要であり、そのためにマイクロ RNA と標的遺伝子の関係性がより強く進化の過程で保存されている可能性が考えられます。

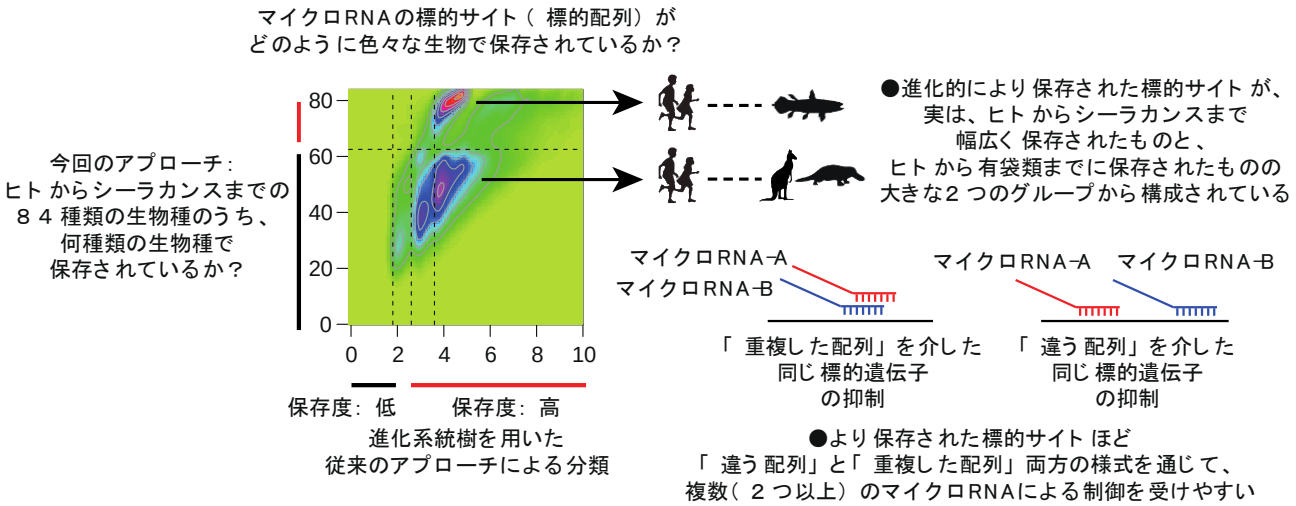


図４ ： ２つのマイクロ RNA の働く仕組みの多様性と進化的変遷の特徴

３． 今後の展開

本研究では、SLE の病態に関係する２つのマイクロ RNA の役割と、２つのマイクロ RNA の働く仕組みの多様性・進化的変遷の特徴を明らかにしました。こうした複数のマイクロ RNA による遺伝子制御の理解は、SLE のみならず、他疾患の病態の詳細な解明につながることが期待されます。

また、マイクロ RNA の研究分野では、マイクロ RNA の標的配列を、進化系統樹を用いて、進化的により保存されたものと、そうでないものの大きく２つに分けるアプローチが広く使用されてきました。本研究では、非常に興味深いことに、進化的により保存された標的配列が、実は、ヒトからシーラカンスまで幅広く保存されたものと、ヒトから有袋類までの哺乳類に保存されたものの大きな２つのグループから構成されていることが浮き彫りになってきました（図４）。今回の発見を、従来の進化系統樹を用いたアプローチと組み合わせることで、マイクロ RNA の機能をより正確に理解し、マイクロ RNA を応用した核酸医薬のより精密な制御ができるようになることが期待されます。

４． 用語説明

※1　全身性エリテマトーデス（SLE）

この病気は、英語で systemic lupus erythematosus といい、SLE と略して呼ばれます。lupus erythematosus とは、狼に噛まれた痕のような赤い紅斑が出現することから名付けられました

（lupus、ループス：ラテン語で狼の意味）。皮膚症状の他にも、全身のさまざまな臓器（特に、腎臓、関節、神経）に、多彩な症状を引き起こします。 病気の原因は不明ですが、20-40 歳台の女性に発症しやすいことが知られています。治療にも関わらず、腎不全が進行し、維持透析や腎移植を必要とする場合もある、国の指定難病の一つです。

※2　マイクロ RNA（microRNA, miRNA）
マイクロ RNA は 21-25 塩基長の１本鎖 RNA 分子であり遺伝子の転写後発現調節に関与します。ヒトゲノムには 1000 以上のマイクロ RNA がコードされていると考えられています。一般に標的遺伝子の 3'非翻訳領域に結合して、標的 mRNA を抑制します。

※3　バイオインフォマティクス
バイオインフォマティクスとは、DNA や RNA、タンパク質といった生命が持つ様々な「情報」を対象に、情報科学や統計学などを駆使し、またそれらを用いた分析から生命現象を解き明かしていくことを目的とした学問分野です。

※4　サイトカイン
細胞から分泌されるタンパク質であり、細胞同士のやりとりに関係する生理活性物質のことです。標的細胞にシグナルを伝達することで、細胞の増殖、分化、細胞死など様々な細胞応答を引き起こします。特に免疫や炎症に関係したものが多く知られています。

※5　形質細胞様樹状細胞（プラズマサイトイド樹状細胞, pDC）
樹状細胞のサブセットの 1 種で，ウイルス感染時に多量の IFNα・β を産生する細胞集団として同定されました。Toll 様受容体 TLR7，TLR9 を高発現しています。近年、自己免疫疾患に関与していることが分かってきました。

※6　Toll 様受容体
Toll 様受容体（Toll Like Receptor、TLR）は、細菌やウイルスといった病原体の特徴的な構造を見分けるセンサーのようなもので、主に感染症などの際に最初に対応する細胞が持っています。感染症だけではなく、体内にダメージを起こすような物質ができた際にも反応し防御反応に役に立ちます。

５．発表雑誌
掲雑誌名：BMC Biology
論文タイトル：Systematic characterization of seed overlap microRNA cotargeting associated with lupus pathogenesis
著者：
Yoshino[2], Eri Koshi[1,2], Shoma Tsubota[3], Yoshio Funahashi[1], Takahiro Maeda[4], Kazuhiro Furuhashi[1], Takuji Ishimoto[1], Tomoki Kosugi[1], Shoichi Maruyama[1], Kenji Kadomatsu[3,5], and

Hiroshi I. Suzuki[2,5*]　(*責任著者)
所属：
[1] Department of Nephrology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan.
[2] Division of Molecular Oncology, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan.
[3] Department of Biochemistry, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan.
[4] Department of General Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, Nagasaki 852-8501, Japan
[5] Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, AIchi 464-8601, Japan.

DOI：10.1186/s12915-022-01447-4

English ver.
https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/BMC_221111en.pdf