

氏 名 おかべ まこ
岡部 真子

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 318 号

学位授与年月日 令和 2 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目

GOS2 regulates innate immunity of Kawasaki disease
via lncRNA RP1-280 10.1

（GOS2はlncRNA RP1-280 10.1を介して川崎病における
自然免疫を制御する）

論文審査委員

（主査）	教 授	絹川 弘一郎
（副査）	教 授	森 寿
（副査）	教 授	山本 善裕
（副査）	教 授	佐藤 勉
（指導教員）	教 授	足立 雄一

論 文 要 旨

論 文 題 目

**G0S2 regulates innate immunity of Kawasaki disease
via lncRNA RP1-28O 10.1**

(G0S2はlncRNA RP1-28O 10.1を介して川崎病における自然免疫を制御する)

氏 名 岡部 真子

備考 ① 論文要旨は，2,000 字程度とする。

② A4 判とする。

〔目的〕

川崎病は、小児に好発する全身の血管の炎症性疾患であり、1967年に日本人の川崎富作博士によって初めて報告された。日本での罹患率は188(10万人あたり)と稀な疾患ではなく、さらに年々増加傾向にある。川崎病全体としての予後は良好である一方、治療しても冠動脈拡張をきたすのは罹患者全体の8%程度であり、瘤形成を来す患者は1-2%程度である。症例や診断・治療が遅れた症例や難治例では、冠動脈の炎症から冠動脈瘤を形成し、破裂に至ると致死的な経過となる。治療法の進歩により、川崎病における冠動脈瘤の発症は減少傾向となっているが、依然として冠動脈瘤形成・死亡に至る症例が存在する。これまでに、川崎病の病因、病態について多くの研究がされてきたが、その全容はいまだに明らかでない。

基礎科学の分野では、以前からタンパク質に翻訳されないRNAであるノンコーディングRNAの存在が知られていた。近年、長鎖ノンコーディングRNA(long non-coding RNA; lncRNA)が、遺伝子発現調節に重要な役割を担っていることが知られるようになった。lncRNAは、肺癌などの腫瘍をはじめ、心筋梗塞や心筋症など多くの疾患の病態生理に関与することが分かってきた。しかし、川崎病の炎症におけるlncRNAの役割研究した報告は殆ど無い。そこで、川崎病におけるlncRNAの役割を明らかにし、診断マーカーや治療ターゲットを創立することを目的として本研究を行った。

〔方法並びに成績〕

富山大学附属病院および関連する複数の病院で倫理委員会の承認を得て、また、川崎病患者から同意を得た上で、免疫グロブリン初回治療前、治療後に血液検体を採取した。初回治療後に寛解した症例を治療反応群、寛解が得られなかった症例を非治療反応群とした。また、アレルギー検査などの健常人、川崎病以外の発熱患者からも同様に同意を得て、血液検体を採取した。得られた血液検体から、直ちにCD14抗体とマグネティック・セルソーティング(MACs)で単球を分離し、フローサイトメーター(FACS)で確認後、RNA抽出を行った。川崎病患者50例、コントロール群50例を集め、Cap analysis gene expression sequencing(CAGE-seq)を行い、川崎病急性期の発現変動遺伝子を同定した。得られた発現変動遺伝子について、他の患者検体でもリアルタイムPCRを行い発現検証した。

lncRNA:RP1-280 10.1は川崎病急性期に上昇し、免疫グロブリン治療後に速やかに低下した。単球の培養モデル細胞であるTHP1monocyteを用いたin vitroの実験において、RP1-280 10.1は自然免疫経路の受容体であるToll Like Receptor1/2, 4のリガンドであるPam3CSK4とLPSの刺激で発現が上昇した。RP1-280 10.1と相関して発現変動するmRNAを解析したところ、GOS2はRP1-28010.1と相関係数が高く、ゲノム上でRP1-28010.1の相補鎖に位置することが明らかになった。GOS2は、川崎病急性期で有意な発現上昇

を認めることが確認できた。THP1monocyteでの解析では、RP1-28010.1と同様にPam3CSK4とLPSの刺激で発現上昇を認めた。また、この際にsiRNAを用いてG0S2をノックダウンすると、Pam3CSK4・LPSで刺激をおこなってもRP1-28010.1の発現は上昇せず、さらに炎症性サイトカインTNFaの発現上昇も抑制された。





RP1-280 10.1については既知の報告はなく、antisense lncRNAであること、G0S2の相補鎖に位置していることのみが分かっている。mRNAであるG0S2は、培養単核球においてG0からG1へのスイッチに関わる遺伝子として発見され、また、血管炎患者から単離した末梢血単核球でG0S2の発現増加が報告されている。G0S2とRP1-280 10.1の関連性について既報はないが、今回の実験結果よりG0S2がRP1-28010.1と相互作用しながら自然免疫経路であるTLRのシグナル伝達に参与し、自然免疫経路を介する川崎病の炎症に直接または間接的に関わっている可能性が示唆された。

〔総括〕

・CAGE-seqを用いて、川崎病急性期の単球におけるlncRNAを含む網羅的遺伝子発現解析を行った。単球でのTLRを介する炎症に関連するものとしてlncRNA: RP1-28010.1およびcoding gene: G0S2を同定した。これらは互いにゲノム上の相補鎖に位置し、協調して単球の炎症に関与することが示唆された。これらは川崎病の新規診断マーカー、治療標的となる可能性がある。

様式 8

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	岡部 真子
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授	氏 名 絹川弘一郎 森 寿 山本 善裕 佐藤 勉	   
指 導 教 員	教授	足立 雄一	
(論文題目) G0S2 regulates innate immunity of Kawasaki disease via lncRNA RP1-28O 10.1 (G0S2はlncRNA RP1-28O 10.1を介して川崎病における自然免疫を制御する) (論文審査の要旨)			(判定) 合格
<p>【研究目的】 川崎病は、小児に好発する全身の血管の炎症性疾患であり、1967 年に日本人の川崎富作博士によって初めて報告された。日本での罹患率は188 (10 万人あたり) と稀な疾患ではなく、さらに年々増加傾向にある。川崎病全体としての予後は良好である一方、治療しても冠動脈拡張をきたすのは罹患者全体の 8%程度であり、瘤形成を来す患者は 1-2%程度である。症例や診断・治療が遅れた症例や難治例では、冠動脈の炎症から冠動脈瘤を形成し、破裂に至ると致死的な経過となる。治療法の進歩により、川崎病における冠動脈瘤の発症は減少傾向となっているが、依然として冠動脈瘤形成・死亡に至る症例が存在する。これまでに、川崎病の病因、病態について多くの研究がされてきたが、その全容はいまだに明らかでない。</p> <p>基礎科学の分野では、以前からタンパク質に翻訳されない RNA であるノンコーディング RNA の存在が知られていた。近年、長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA; lncRNA) が遺伝子発現調節に重要な役割を担っていることが知られるようになった。lncRNA は、肺癌などの腫瘍をはじめ、心筋梗塞や心筋症など多くの疾患の病態生理に関与することが分かってきた。しかし、川崎病の炎症における lncRNA の役割研究した報告は殆ど無い。そこで、川崎病における lncRNA の役割を明らかにし、診断マーカーや治療ターゲットを創立することを目的として本研究を行った。</p> <p>【方法並びに成績】</p> <p>方法：富山大学附属病院および関連する複数の病院で倫理委員会の承認を得て、川崎病患者から同意を得た上で、免疫グロブリン初回治療前後に血液検体を採取した。免疫グロブリン初回治療後に寛解した症例を治療反応群、寛解が得られなかった症例を非治療反応群とした。また、アレルギー検査などの健常人、川崎病以外の発熱患者からも同様に同意を得て、血液検体を採取した。得られた血液検体から、直ちにCD14抗体とマグネティック・セルソーティング(MACs)で単球を分離し、フローサイトメーター(FACs)で確認後、RNA抽出を行った。川崎病患者50例、コントロール群50例を集め、Cap analysis gene expression sequencing (CAGE-seq)を行い、川崎病急性期の発現変動遺伝子を同定した。得られた発現変動遺伝子について、他の患者検体でもリアルタイムPCRを行い発現を検証した。</p>			

成績: lncRNA:RP1-28O 10.1は川崎病急性期に上昇し、免疫グロブリン治療後に速やかに低下した。単球の培養モデル細胞であるTHP1 monocyteを用いたin vitroの実験において、RP1-28O 10.1は自然免疫経路の受容体であるToll Like Receptor1/2,4のリガンドであるPam3CSK4とLPSの刺激で発現が上昇した。RP1-28O 10.1と相関して発現変動するmRNAを解析したところ、G0S2はRP1-28O10.1と相関係数が高く、ゲノム上でRP1-28O10.1の相補鎖に位置することが明らかになった。G0S2は、川崎病急性期で有意な発現上昇を認めることが確認できた。THP1 monocyteでの解析では、RP1-28O10.1と同様にPam3CSK4とLPSの刺激で発現上昇を認めた。また、この際siRNAを用いてG0S2をノックダウンすると、Pam3CSK4・LPSで刺激をおこなってもRP1-28O10.1の発現は上昇せず、さらに炎症性サイトカインTNF α の発現上昇も抑制された。

RP1-28O 10.1については既知の報告はなく、antisense lncRNAであること、G0S2の相補鎖に位置していることのみが分かっている。mRNAであるG0S2は、培養単核球においてG0からG1へのスイッチに関わる遺伝子として発見され、また、血管炎患者から単離した末梢血単核球でG0S2の発現増加が報告されている。G0S2とRP1-28O 10.1の関連性について既報はないが、今回の実験結果よりG0S2がRP1-28O10.1と相互作用しながら自然免疫経路であるTLRのシグナル伝達に関与し、自然免疫経路を介する川崎病の炎症に直接または間接的に関わっている可能性が示唆された。

〔総括〕

本研究で岡部氏は川崎病患者急性期の単球分画においてlncRNA:RP1-28O 10.1の発現が増加すること、さらにこの RP1-28O 10.1はアンチセンス鎖に存在するmRNA G0S2と相互作用を有する可能性が示唆された。この RP1-28O 10.1については既報はなく新規性を有する。培養単球細胞において Toll Like Receptor1/2,4の刺激によりRP1-28O 10.1と G0S2の発現が増加することとG0S2のsiRNA導入によりRP1-28O 10.1の発現上昇を抑制できることを確認している。G0S2は血管炎患者において発現が増加することが既に知られているが、この研究において川崎病患者急性期に単球分画においても発現が増加していた。上記のことを合わせるとRP1-28O10.1とG0S2の相互作用が自然免疫経路を介する川崎病の炎症に関与している可能性が示唆されたことは医学研究において重要な意義を有する。今回免疫グロブリン治療反応群と非治療反応群においてRP1-28O 10.1の発現に差が認められなかったが、症例数が少ないことによる可能性もあり、免疫グロブリンに対する反応性を予測するマーカーとなれば臨床的応用へとつながる可能性がある。またRP1-28O 10.1のシグナリングを詳細に検討することにより特異的な阻害薬が開発されれば川崎病の治療に大きく貢献できる可能性もある。以上より本審査委員会は本論文を博士(医学)の学位に十分に値するものと判定した。