

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21631

研究課題名(和文) 遺伝子制御ネットワークを用いたアトピー性皮膚炎発症制御マイクロRNAの網羅的同定

研究課題名(英文) Comprehensive identification of microRNAs that control atopic dermatitis using a gene regulatory network

研究代表者

川上 英良 (Kawakami, Eiryo)

国立研究開発法人理化学研究所・科学技術ハブ推進本部・上級研究員

研究者番号：30725338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究における最大の成果としては、確率的な制御関係を考慮して遺伝子発現データから制御因子を網羅的に予測する手法であるwPGSA (weighted Parametric Gene Set Analysis) 法を開発したことである (Kawakami et al. Nucleic Acids Research 2016)。wPGSA法による転写制御因子予測はアトピー性皮膚炎に限らず、多くの生命現象・疾患において、今まで知られていなかった制御因子の関与を明らかにしており、代表者が共同研究を行っているものだけで20以上の実験グループで利用されている。

研究成果の概要(英文)：The greatest result of this research is the development of wPGSA (weighted Parametric Gene Set Analysis) method which comprehensively predicts control factors from gene expression data taking stochastic control relationship into account (Kawakami et al. Nucleic Acids Research 2016). Prediction of transcriptional regulators by the wPGSA method is not limited to atopic dermatitis, but it has revealed the involvement of regulatory factors that have not been known until now in many life phenomena / diseases, and we are conducting joint research with more than 20 experimental groups.

研究分野：システム生物学

キーワード：遺伝子制御ネットワーク 転写因子 マイクロRNA アトピー性皮膚炎 Gene set enrichment解析

1. 研究開始当初の背景

micro-RNA (miRNA) は 19-25 塩基からなる内在性の低分子 RNA であり、メッセンジャーRNA (mRNA) に配列特異的に結合し、mRNA の不安定化・翻訳抑制を介してタンパク質産生を抑制する。miRNA による mRNA の抑制は、発生・分化・免疫・代謝といった広範な細胞内プロセスにおいて重要な役割を持つことが分かっている。アトピー性皮膚炎においても、いくつかの miRNA が発症に関与することが示唆されている。さらに、miRNA の生成に必須な RNaseIII ファミリータンパク質 Dicer を欠損したマウスは薬剤誘導性アトピー性皮膚炎の症状が激化することが知られている。

ヒトゲノム上には 1000 種以上の miRNA がコードされており、また一つの miRNA が平均 100 以上の標的 mRNA を持つことを考慮すると、miRNA による遺伝子抑制ネットワークは解明されていない部分が非常に多い。

川上らのグループは、今までに網羅的細胞内分子相互作用ネットワークおよび転写制御ネットワークの構築を行ってきた。また、構築したネットワークに複雑ネットワーク解析の手法を適用することで、ネットワークの制御機構及び特徴的な部分構造を同定することに成功している。数値シミュレーションが困難な転写制御ネットワークのような大規模ネットワークにおいて、このようなネットワークに基づいた解析は非常に有効な手法であり、複雑な生命現象及び疾患を理解する手段として世界的に活発に研究が行われている。

2. 研究の目的

遺伝子の発現制御において、micro-RNA(miRNA)によるメッセンジャーRNAの分解が重要な役割を果たしている。本研究では miRNA による網羅的遺伝子抑制ネットワークを構築し、メッセンジャーRNAの発現変動から重要な miRNA を推定する手法を確立する。さらに、その手法を応用することで、アトピー性皮膚炎の発症に関与する miRNA を同定し、その機能を調べる。アトピー性皮膚炎は、複数の素因を持つ多因子疾患であり、その発症機序は十分に解明されておらず、予防法・治療法も確立されていない。アトピー性皮膚炎の発症に関与する miRNA を同定することは、特異的 miRNA 阻害薬による予防・治療への応用が期待できると共に、多因子疾患の発症機序解明のモデルケースになると考えられる。

本研究計画では、ネットワーク解析の手法と、次世代シーケンサーを用いて得られる網羅的遺伝子発現データを組み合わせることで、アトピー性皮膚炎発症に関与する miRNA およびその制御ネットワークを網羅的に同定し、アトピー性皮膚炎治療に繋げるための基盤研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 統合的遺伝子制御ネットワークの構築

複数の miRNA 予測標的遺伝子データベース、統合的 miRNA 遺伝子制御ネットワークを構築する。miRNA の標的は不完全な相補性を持つ mRNA であるため、予測は容易ではない。そこで、複数のデータベースの予測結果を統合して、miRNA-mRNA 制御関係のスコアリングを行い、重み付きネットワークを構築する。

(2) mRNA 発現変動データからの制御因子予測

次世代シーケンサーによる RNA-seq から得られた網羅的 mRNA 発現変動データから制御に重要な miRNA を予測する手法を確立し、実際のデータから予測を行う。

① 予測手法の確立

重み付きネットワークと Parametric Gene Set Enrichment Analysis を組み合わせることで、mRNA 発現変動データから制御に重要な因子を予測する手法を開発する。従来の Enrichment 解析においては、標的 mRNA が発現上昇しているか低下しているかという二値データを用いて、発現上昇(低下)している標的を多く持つ制御因子を抽出するが、この方法だと RNA-seq によって得られる mRNA 発現変動の数値情報が失われてしまう。標的 mRNA 発現変動の数値データを用いて比較することで、数値情報も活用して制御因子の予測を行うことができる。本研究においては、mRNA 発現変動データと遺伝子制御ネットワークの重みを掛け合わせることで、制御の重みも加味した重み付き Enrichment 解析手法を確立する。

② 実際の mRNA 発現変動データからの予測

皮膚炎を誘導することが知られている MC903, イミキモド, poly(I:C)によってヒト正常皮膚角化細胞(NHEK細胞)を処理し、mRNA 発現変動と miRNA 発現変動を RNA-seq によって計測する。mRNA 発現変動から上述の重み付き Enrichment 解析によって炎症応答の誘導・抑制に重要な miRNA および転写因子を絞り込む。また、皮膚炎モデルマウスにおいても同様に、皮膚組織の mRNA 発現変動と miRNA 発現変動を RNA-seq によって計測し、皮膚炎の発症・治癒に関連する制御因子を網羅的に同定する。

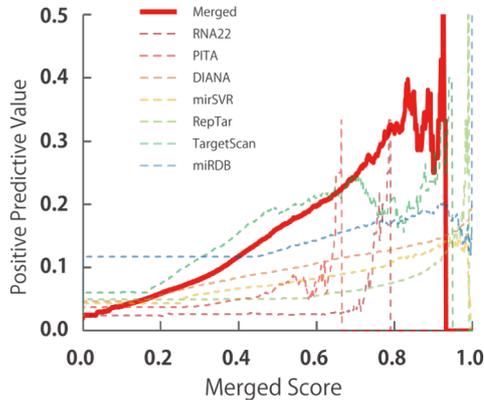
4. 研究成果

(1) 統合的遺伝子制御ネットワークの構築

世界中の ChIP-seq データを再解析することにより、マウスの転写因子による転写制御ネットワークを構築した(Kawakami et al. 2016 Nucleic Acids Research)。この転写制御ネットワークは、450 種類以上の転写因子の結合情報に加えて、従来の転写因子の結合モチーフ配列に基づく遺伝子制御ネットワークでは考慮されない『それぞれの転写因子が、実際にどのくらいの頻度で各遺伝子の制御領域に結合しているか』という情報を含む。さ

らに、複数の miRNA ターゲット予測データベースを機械学習を用いて組み合わせることで、統合的 miRNA 遺伝子制御ネットワークを構築した。これを実験的に検証されている miRNA-mRNA の結合を miRBase から取得し、検証を行ったところ、個別のデータベースより高精度

図1 統合的 miRNA ネットワークと実験的 miRNA 結合データの相関



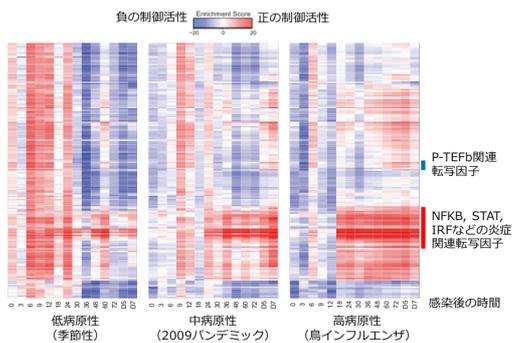
で予測ができていることが示された (Kawakami et al. Unpublished)。

(2) mRNA 発現変動データからの制御因子予測

① 予測手法の確立

(1)で構築した重み付き制御ネットワークの情報を活用するために、従来の Gene Set Enrichment 解析に重み付き t 検定の枠組みを導入した wPGSA (weighted Parametric Gene Set Analysis) 法を考案した (Kawakami et al. 2016 Nucleic Acids Research)。wPGSA 法は従来の重みを考慮しない手法に比べて、450 種類以上の転写因子の影響を極めて高い精度で予測できることが示された。wPGSA による遺伝子発現制御因子予測は、アトピー性皮膚炎に限らず、多くの生命現象・疾患において、今まで知られていなかった制御因子の関与を明らかにしており、研究代表者が共同研究を行っているものだけで 20 以上の実験グループの遺伝子発現変動解析に利用されている。

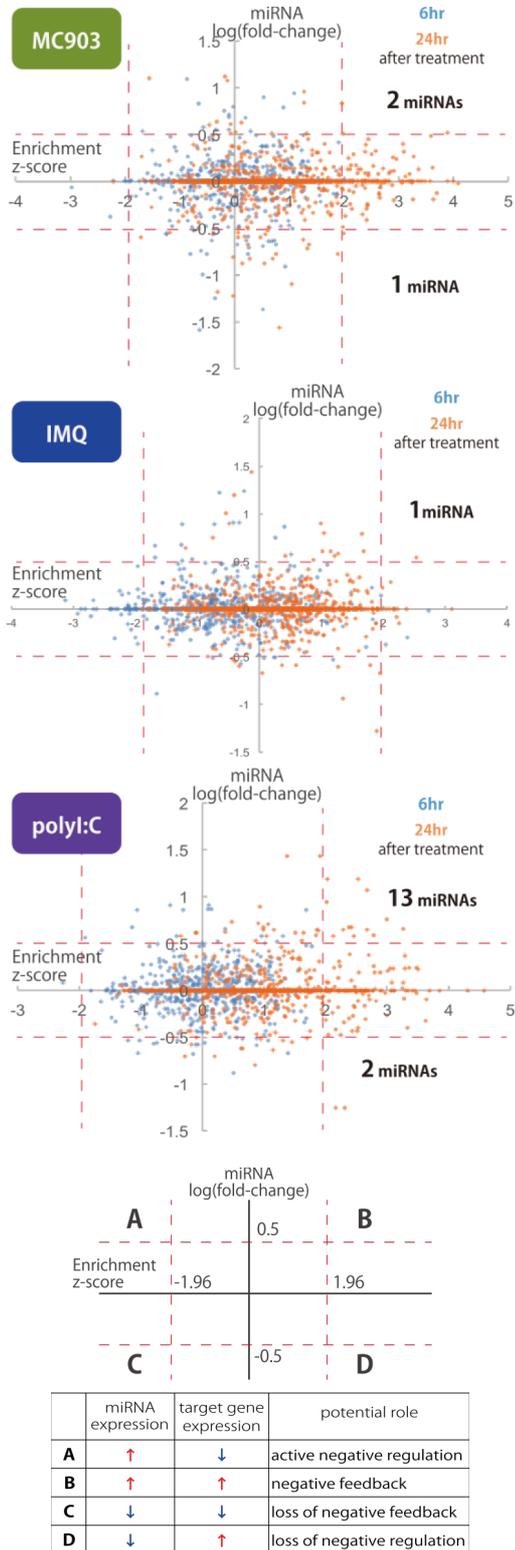
図2 インフルエンザウイルス感染マウスにおける経時的転写因子制御活性変化



① 実際の mRNA 発現変動データからの予測

皮膚炎を誘導することが知られている MC903, イミキモド, poly(I:C)によってヒト正常皮膚角化細胞 (NHEK 細胞) を処理し、mRNA 発現変動と miRNA 発現変動を RNA-seq によって計測した。mRNA 発現変動から上述の重み付き Enrichment 解析によって炎症応答の誘導・抑制に重要な miRNA およ

図3 薬剤処理 NHEK 細胞における miRNA のターゲット mRNA 発現量への影響と miRNA 自体の発現の関連



び転写因子をしたところ、MC903 で 3 種、イミキモドで 1 種、poly(I:C)で 15 種の miRNA が広範な mRNA 発現変動に寄与していることが示唆された。

また、実際の皮膚炎発症・治癒過程の遺伝子制御メカニズムに迫るために皮膚バリア因子であるフィラグリンを欠損したマウスモデルを用いて、時系列 RNA-seq を行った。フィラグリン欠損マウスモデルは皮膚バリアの脆弱性を示し、乾燥環境下において発達段階で一時的に皮膚炎症状を示すが、成長とともに症状が軽快する特徴をもつ。得られた mRNA および miRNA の発現変動データを wPGSA 法によって解析することで、皮膚炎症状の発症と軽快に関連する転写因子および miRNA が複数予測された(論文準備中)。今後、ヒト正常皮膚角化細胞で予測された制御因子と併せて、皮膚炎との関連を実験的に実証していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 川上英良, 大田達郎 公共ハイスループット ChIP データを用いた遺伝子制御ネットワークの構築とその活用法 **実験医学増刊** (査読なし) 2017 Mar Vol. 35 No. 5
- ② Kawakami E, Nakaoka S, Ohta T and Kitano H, Weighted enrichment method for prediction of transcription regulators from transcriptome and global chromatin immunoprecipitation data, **Nucleic Acids Research** (査読あり) 2016 Jun; 20:44(11):5010-21
DOI: 10.1093/nar/gkw355
- ③ Okada Y, Muramatsu T, Suita N, Kanai M, Kawakami E, Iotchkova V, Soranzo N, Inazawa J, Tanaka T. Significant impact of miRNA-target gene networks on genetics of human complex traits. **Sci Rep.** (査読あり) 2016 Mar 1;6:22223.
DOI: 10.1038/srep22223
- ④ Kawakami E, Singh VK, Matsubara K, Ishii T, Matsuoka Y, Hase T, Kulkarni P, Siddiqui K, Kodilkar J, Danve N, Subramanian I, Katoh M, Shimizu-Yoshida Y, Ghosh S, Jere A, and Kitano H, Network analyses based on comprehensive molecular interaction maps reveal robust control structures in yeast stress response pathways, **npj Systems Biology and Applications** (査読あり) 2016 Jan; 2:15018
DOI: 10.1038/npjbsa.2015.18

[学会発表] (計 5 件)

- ① 川上英良 ウイルス・細菌感染における宿主転写制御 第 90 回 日本細菌学会総会 (招待講演) 2017/03/21 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ② 川上英良 公共 ChIP データを活用した遺伝子制御ネットワーク構築と転写因子予測 トーゴの日シンポジウム 2016 (招待講演) 2016/10/06 東京大学 (東京都・文京区)
- ③ 川上英良 生物ネットワークにひそむ情報を探る: タンパク質相互作用ネットワークに基づくシグナル伝達パスウェイ網羅的再構成 第 89 回 日本生化学会大会 (招待講演) 2016/09/25 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ④ 川上英良, 中岡慎治, 北野宏明 遺伝子発現から転写制御因子を予測する確率的 Gene Set Enrichment 解析 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) (招待講演) (国際学会) 2015/12/04 神戸ポートアイランド (兵庫・神戸市)
- ⑤ Eiryō Kawakami, Hisahiro Yoshida, Takuwa Yasuda, Shinji Nakaoka, Hiroaki Kitano, Haruhiko Koseki Impaired balance between antagonistic transcriptional modules during the progression of inflammatory skin disease. **Functional Genomics and Systems Biology: From Model Organisms to Human Health** (国際学会) 2015/10/29 Cambridge (United Kingdom)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

遺伝子発現から転写因子を予測—ChIP ビッグ
データを活用して遺伝子制御ネットワーク構
築—

[http://www.riken.jp/pr/press/2016/201605
10_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160510_1/)

wPGSA

<http://wpgsa.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 英良 (Kawakami, Eiryo)

国立研究開発法人理化学研究所・科学技術
ハブ推進本部・上級研究員

研究者番号：3 0 7 2 5 3 3 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()