

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590266

研究課題名（和文） Non-coding RNAによる組織形成の制御機構の解析

研究課題名（英文） The regulation of tissue morphogenesis by non-coding RNAs

研究代表者

内島 泰信 (UCHIJIMA YASUNOBU)

東京大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号：90272426

研究成果の概要（和文）：

申請者らは ncRNA の形態形成への関与を明らかにするために ncRNA である miR-199a、miR-214 をコードする Dnm3os 遺伝子をノックアウトしたマウスを作製した。本マウスは体躯が小さく、骨格の形成不全や筋肉組織の低形成が認められた。そこで、ノックアウトした遺伝子座に RMCE 法を用いて miR-199a、miR-214 を単独または同時にノックインした動物を作製した。ノックインにより各 miRNA の発現が確認されたが、両者をノックインした場合にのみ骨格の形成不全等の異常な表現型の回復が確認された。しかし、単独のノックインでは明確な変化が見られなかった。よって、組織形成にそれぞれの ncRNA が重要な役割を果たすこと、特に骨組織の形成に寄与することが明確となった。これらの ncRNA の標的遺伝子を同定するために DNA チップによるトランスクリプトーム解析や薬剤二重選択マーカーを利用した遺伝子ライブラリの P19 細胞での発現による検索を行ったが、顕著な変化を示す遺伝子は特定できなかった。この結果は miR の作用が多数の遺伝子を標的として弱い程度に発現抑制することで発揮されるという知見に一致するものと考えられた。ところで、miR-199a と miR-214 は心臓疾患との関連が示唆されている。筆者らの研究グループでは心臓と血管系で ETAR 遺伝子が発現し、これらの組織の発生に ETAR 陽性細胞が寄与していることを明らかにしている。そこでこれらの ncRNA の遺伝子を ETAR 遺伝子座にノックインし、心毒性が知られるドキシソルビシンの投与による心筋傷害モデルにおいて表現型を解析した。その結果、両者のノックインにより心筋の線維化抑制等の組織保護作用が確認された。よって、ncRNA が病態形成に関与する可能性が示唆された。そして、本研究で用いた遺伝子ノックインを利用した研究の方法論が発生研究のみならず病態解析を推進するための基盤として有用であることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

Our research group previously established the Dnm3os gene knockout mice. This gene encodes noncoding RNAs (ncRNAs) including miR-199a and miR-214. Since the mice displayed small body size with hypoplasia of bones and muscular tissues, the author assumed that these noncoding RNAs might regulate tissue morphogenesis. In order to clarify our hypothesis, the author knocked in miR-199a and/or miR-214 in the Dnm3os locus using the recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) method. The author

confirmed that the recovery of the expression of each miRNA among knocked in animals, but the recovery of abnormal phenotypes was observed only when both miRNAs were knocked in. Thus, it became clear that each noncoding RNA contributed to the tissue formation. The author tried to identify the target genes of these ncRNAs in P19 cells by using a unique dual drug selection system, but there seemed no gene displaying remarkable changes in expression. This could reflect the well-known feature of miRNAs that generally suppress the expression level of many genes with a small extent. As miR-199a and miR-214 were reported to change the expression levels in some heart problems, we suspected these genes could be involved in the pathogenesis of heart dysfunctions. Since our research group previously demonstrated that ETAR-positive cells contributed to the formation of heart and vessel systems, the author knocked in these ncRNAs to the ETAR locus using the RMCE method, and compared the histology of hearts with the control animals. Heart injury was induced by the administration of doxorubicin, which was known to cause severe heart injury in high dose in human. As a result, doxorubicin induced myocardial fibrosis in the control animals, but the fibrosis was considerably suppressed in the heart of miR-knocked in animals. These results suggested that miR-199a/214 might contribute to the maintenance of the normal heart function. Additionally, the results obtained here clearly demonstrated that this knock in system was an effective tool to investigate not only the mechanisms of tissue development but also the involvement of genes in disease.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：noncoding RNA、miR-199a、miR-214、形態形成、骨形成、心筋傷害

1. 研究開始当初の背景

多数の生物種でゲノム情報が明らかになった結果、多種多様のnoncoding RNA (ncRNA)の存在が明らかになり、現在、その生物学的重要性が示されつつある。しかし、ncRNAの標的となる遺伝子等を予測することは未だに困難であり、特に生体における機能と作用機序を明確に

することが急務であった。申請者の研究グループはncRNAであるmiR-199a、miR-199a*、miR-214、miR-214*をコードするDnm3os遺伝子をノックアウトしたマウスを作製した。本マウスは体躯が小さく、骨格の形成不全や筋肉組織の低形成が認められた。すなわち、組織形成の調節にncRNAが関与する結果が得られた。本マウ

スにノックアウトによって欠失したmiRNAや変異miRNAないし予想される下流遺伝子をノックインすることで当該のmiRNAの組織形成や代謝調節等の生体における役割を明確に示すことが可能と考えられ、本研究課題として申請することとした。

2. 研究の目的

そこで本研究では本マウスに遺伝子ノックインシステムを活用した表現型解析および細胞生物学的解析を行い、Dnm3os 遺伝子にコードされる ncRNA の生理的機能を明らかにし、ncRNA によって調節される組織の形成と機能分化の仕組みと病態との関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では以下の3つのステップ、すなわち

(1) Dnm3os KO マウスで得られた表現型の責任 miRNA を KO マウスへの遺伝子ノックインにより同定すること、(2) miRNA の標的遺伝子のスクリーニング、(3) miRNA をノックインし病態への関与を証明することとした。

(1) Dnm3os KO マウスで得られた表現型の責任 miRNA の同定

Dnm3os 遺伝子座へのノックイン

ノックアウトした Dnm3os 遺伝子は Cre-変異 lox 系を用いたリコンビナーゼ依存性遺伝子交換であり、KO の際、組み込んだ lacZ 遺伝子を目的の miRNA の cDNA を組み込んだベクターを使って再度組み換えを行った後、Flp リコンビナーゼにより耐性マーカを取り除いて遺伝子座の置き換えを完了した。この allele のマウスの表現型の解析を行い、KO マウスで確認された表現型のレスキューが見られる責任 miRNA を同定した。

(2) Dnm3os 由来 miRNA の標的遺伝子の検索
miRNA は標的遺伝子の 3'-UTR に結合して作用を発現する機序が主要と考えられている。ま

た、miRNA の 5' 末端から 2-7 番目の塩基配列 (seed 配列) とその周辺 mismatches により標的遺伝子の予測が有効とされる。そこで、DNA チップを用いたトランスクリプトーム解析を元に各 miRNA の標的を検索した。この際、哺乳類 mRNA の 3'-UTR 平均長が約 1kbp であることに注意し、この範囲を大きく超えない領域で seed 配列を有するものを選抜することとした。また、Dnm3os KO マウスにおいて胎生期で骨低形成が認められたことから、Dnm3os 陽性の E13.5 のマウス軟骨 cDNA ライブラリを調製し、Ganciclovir と Neomycin 耐性を組み合わせたスクリーニング用ベクターに組み込んだ。miR が作用してタンパク質量が減少したものが生存する系にて、標的遺伝子の探索を行った。

(3) Dnm3os 由来 miRNA の心筋傷害との関連性
miR-199a/214 は心肥大や虚血傷害などで発現レベルが増加することが知られている。そこで endothelin-A 受容体遺伝子座にノックインを行い、病態への関与を解析した。ETAR 遺伝子座への miR-199a/214 のノックインは Dnm3os 遺伝子座への導入と同様に ETAR 遺伝子座を改変した動物への RMCE 法の適用により行った。心筋傷害モデルについてはノックインマウス雄に ICR 系の雌を交配させ、2 から 4 か月齢のものをそれぞれ同腹同性で選定し、ドキシソルビシン 15 mg/kg の腹腔内投与により行った (対照群は生理食塩水の投与)。投与 7 日後に心筋組織の比較を行った。また、心筋傷害は酸化ストレスマーカの変現量の変化で確認し、パラフィン切片を HE 染色、マッソントリクローム染色、およびビクトリア染色して心筋の形態、間質や血管周囲の線維化等の変性について比較を行った。

4. 研究成果

(1) miRNA の Dnm3os 遺伝子座へのノックイン
Dnm3os の遺伝子座に miR-199a/214 をノック

インした場合、産仔を得たところ、両者をノックインした場合のみ、ノックアウトで見られた椎骨の開放が回復した。また、体重についてもノックアウトでは WT と比較して P30 において 70%程度に低下していたが、ノックインにより WT と同等まで回復した。

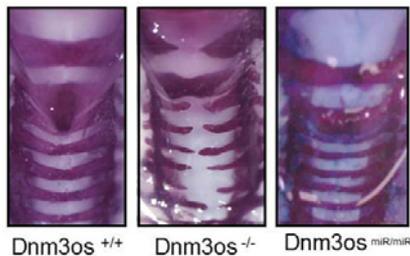


図. ノックインによる椎骨の開放の回復(中央のノックアウト動物でのみ椎骨の開放が認められる)

(2)miRNA の標的遺伝子のスクリーニング

DNA アレイを用いたトランスクリプトーム解析の結果、Dnm3os ノックアウトとヘテロで2倍以上発現量に差がある遺伝子は増加と減少を含めて極めて少なかった。体重の減少から脂質代謝関連遺伝子について調べてみたが一貫した変化が認められず、標的遺伝子の候補には至らなかった。

Ganciclovir と Neomycin の耐性による二段階選択法による標的遺伝子探索も試みたが、明確に生存する細胞の選抜には至らなかった。DNA チップのデータと考え合わせると発現量の変化が穏やかでも差が検出できる実験系、特に用いる細胞の種類を選択に再検討が必要と考えられた。

(3)Dnm3os 由来 miRNA と心筋傷害との関連

ドキシソルビシン投与により非投与の個体に比べて酸化ストレスマーカである PDK4、TXNIP の発現量が増加していた。一方、miRNA ノックインマウスでは PDK4 と TXNIP の増加が抑制されていた。組織学的な分析について

は、マッソントリクローム染色の結果から野生型へのドキシソルビシン投与により左室心筋束周囲の間質に強い線維化が認められたが、miRNA をノックインしたマウスでは線維化の程度はドキシソルビシン非投与群と同程度まで回復した。ビクトリア染色による血管周囲の線維化についてもドキシソルビシン投与群で線維化が強かったが、miR のノックインにより軽い程度の抑制が認められた。

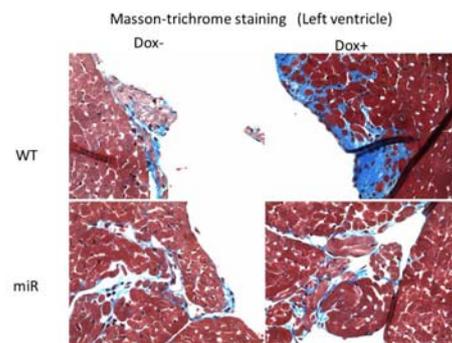


図. 心筋束間質のマッソントリクローム染色像 (Dox 投与により青染された線維化部が miR ノックインにより顕著に減少した。)

(4)結果のまとめ

本研究により Dnm3os のノックアウトで見られた体躯の小型化や骨の低形成には miR-199a と miR-214 の両者発現量の低下が寄与していることが明らかとなった。特に両 miRNA の骨形成への寄与が強く示唆された。また、これらの miRNA の発現上昇によりドキシソルビシン誘導性の心筋傷害が抑制された。よって miR-199a/214 の組織形成への寄与と病態への関与が示唆された。本研究で用いた RMCE による遺伝子ノックインの手法は遺伝子の形態形成のみならず病態への関与を証明するためにも有効な系であることが明確になった。

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 7 件)

1. Kawamura Y, Uchijima Y, Horike N, Tonami K, Nishiyama K, Amano T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest, *Journal of Clinical Investigation*, 査読有、120 巻、2010、2817-2828
2. Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Endothelin receptor type-A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field, with a later implication of this signaling pathway in chamber myocardium formation, *Development*, 査読有、137 巻、2010、3823-3833
3. Fujimoto C, Ozeki H, Uchijima Y, Suzukawa K, Mitani A, Fukuhara S, Nishiyama K, Kurihara Y, Kondo K, Aburatani H, Kaga K, Yamasoba T, Kurihara H. Establishment of mice expressing EGFP in the placode-derived inner ear sensory cell lineage and FACS-array analysis focused on the regional specificity of the otocyst, *Journal of Comparative Neurology*, 査読有、18 巻、2010、4702-4722
4. Arima S, Nishiyama K, Ko T, Arima Y, Hakozaiki Y, Sugihara, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement, *Development*, 査読有、138 巻、2011、4763-4776
5. Kitazawa T, Sato T, Nishiyama K, Asai R, Arima Y, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. Identification and developmental analysis of endothelin receptor type-A expressing cells in the mouse kidney, *Gene Expression Patterns*, 査読有、11 巻、2011、371-377

6. Tonami K, Kurihara Y, Arima S, Nishiyama K, Uchijima Y, Asano T, Sorimachi H, Kurihara H, Calpain 6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1, *Journal of Cell Sciences*, 査読有、124 巻、2011、1214-1223
7. Arima Y, Miyagawa-Tomita S, Maeda K, Asai R, Seya D, Minoux m, Rijli FM, 西山 K, Kim KS, Uchijima Y, Ogawa H, Kurihara Y, Kurihara H. Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling, *Nature Communications*, 査読有、3 巻、2013 年、1267-1277

[学会発表] (計 11 件)

1. Uchijima Y, Kurihara Y, Sato T, Fujisawa K, Kushiya S, Kurihara H. Transcriptional regulation of non-coding RNA Evf-2 in the Endothelin-1/Dlx5/Dlx6 pathway, 第 33 回 日本分子生物学会・第 83 回 日本生化学会 合同年会 2010 年 12 月 8 日、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
2. Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium, 第 33 回 日本分子生物学会・第 83 回 日本生化学会 合同年会、平成 22 年 12 月 10 日 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
3. Kawamura Y, Uchijima Y, Horike N, Tonami K, Nishiyama K, Asano T, Amano T, Kurihara Y, Kurihara H. Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest, 第 33 回 日本分子生物学会・第 83 回 日本生化学会 合同年会、2010 年 12 月 9 日、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
4. Kim KS, Arima Y, Asai R, Sato T, Uchijima Y, Nishiyama K, Kurihara Y, Igarashi T, Kurihara H.

- Endothelin-1/Endothelin type-A receptor signaling regulates pharyngeal arch artery development through Dlx5/6-independent pathway. 211 Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Jont Meeting, 2011年5月1日、Denver Convention Center (米国)
5. 河村悠美子, 内島泰信, 藤澤興, 西山功一, 栗原由紀子, 栗原裕基, Sirt3 による参加ストレス防御機構の初期胚発生における役割, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月24日、国立京都国際会館(京都府京都市)
 6. Arima Y, Miyagawa-Tomita S, Nishiyama K, Asai R, Kim KS, Uchijima Y, Ogawa H, Kurihara Y, Kurihara H. Coronary artery anomalies in Endothelin-1 and Endothelin A receptor knockout mice. American Heart Association Scientific Session, 2011年11月15日、オーランドコンベンションセンター(米国)
 7. 栗原由紀子, 内島泰信, 榎山櫻, 濱崎真夏, 西山功一, 栗原裕基, 下顎形成におけるエンドセリンシグナルにおける non-coding RNA とパラスペックル蛋白の作用, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 8. Arima Y, Miyagawa-Tomita S, Nishiyama K, Asai R, Kim KS, Uchijima Y, Ogawa H, Kurihara Y, Kurihara H. novel roles of the neural crest in coronary artery formation through the Endothelin-1/Endothelin A receptor signaling, 第76回日本循環器学会学術集会, 2012年3月18日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
 9. Kurihara, Y, Uchijima Y, Kushiya S, Kurihara H, Involvement of non-coding RNA: Evf2 in the Endothelin signaling in branchial arch development, Keystone Symposia Conference Noncoding RNAs, 2012年4月2日、スノーバード・クリフロッジ(米国)
 10. Uchijima Y, Kurihara Y, Kushiya S, Kurihara H. Endothelin-1 regulates branchial arch morphogenesis by regulating intergenic enhancer

activity of Dlx5 and Dlx6 in mouse embryo、第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

11. Kawamura Y, Uchijima Y, Nishiyama K, Kurihara Y, Kita K, Kurihara H. MicroRNA 199/214 cluster is required for normal growth and skeletal development in mice, Cell Symposia Functional RNAs, 2012年12月4日、Hotel Melia (スペイン)

[その他]

ホームページ等

<http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

内島 泰信 (UCHIJIMA YASUNOBU)

東京大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号：90272426