

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860139

研究課題名(和文) 腱・靭帯形成におけるmicroRNAの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of microRNA in tendon/ligament formation

## 研究代表者

伊藤 義晃 (Ito, Yoshiaki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50511044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腱に発現する転写因子であるMkxのVenusノックインマウスを用いて、E14.5組織からVenus陽性細胞をソーティングにより分離した細胞のtaqman array解析を行った。この中から骨格筋と比較してアキレス腱で発現の高い3つのmiRNAを同定した。約5000遺伝子の全長cDNA配列をルシフェラーゼ遺伝子の3' UTRに挿入したレポーターライブラリーを用いてmiRNAの標的遺伝子のスクリーニングを行い、3つの標的遺伝子を同定した。ゲノム編集技術を用いたノックアウトマウス作製法を開発し、腱で発現が高かったmiRNAのノックアウトマウスを作製・解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We performed taqman array analysis of the cells expressing Mxk, a tendon/ligament specific transcription factor, using E14.5 Mxk-Venus knock-in embryos. Then, miRNAs expressed in Mxk positive cells were analyzed the expression in Achilles tendon and skeletal muscle, and we identified 3 miRNAs which showed high expression in Achilles tendon. We developed a miRNA targets screening system using a reporter library, which inserted a whole cDNA sequence in the 3' UTR of a luciferase gene. Using this screening system, we identified 3 miRNA targets. We developed the generation of knockout mice using genome-engineering technique and generated and analyzed the knockout mice in which miRNA is highly expressed in tendon.

研究分野：分子生物学

キーワード：microRNA 腱・靭帯

### 1. 研究開始当初の背景

腱・靭帯は、それぞれ骨と筋肉、骨と骨を繋ぎ、運動機能に必須の結合組織である。外傷や過度の酷使、加齢による腱・靭帯の損傷・変性は、栄養血管が乏しい組織であることから、治癒力が非常に弱く、完治が極めて難しい組織である。そのため、腱・靭帯の損傷・変性の治療は、医学分野において大きな問題の1つとなっている。しかしながら、腱・靭帯の形成機構は未だ不明な点が多く、その他の運動器構成組織と比べて研究が遅れた組織であり、再生医療などの新たな治療法の確立には至っていない。

我々は、約 1500 個の転写因子・転写コファクターについて、E9.5-11.5 のマウス胚を用いた Whole-mount in situ hybridization による発現パターン解析を行い、腱・靭帯に高い特異性発現を示す転写因子として Mohawk homeobox (Mkx) を同定し、ノックアウトマウス解析により腱形成に重要な転写因子であることを明らかにした (Ito et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 2009)。しかしながら、腱形成に関わるその他の転写因子として知られているものは Scx くらいであり、また、我々の網羅的な発現パターン解析においても Mkx 以外に腱・靭帯特異性を示す転写因子は存在しなかったことから、腱・靭帯形成に関わるその他の発現制御因子の存在が考えられる。我々は、主に mRNA の 3' UTR に結合し、転写後レベルで遺伝子発現を制御する小さなノンコーディング RNA である microRNA (miRNA) に着目し、腱・靭帯の形成・維持に関与する miRNA の探索を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、腱・靭帯の形成に関わる新たな因子として、miRNA に着目し、腱・靭帯特異的な miRNA の同定、miRNA のターゲット遺伝子の同定法の確立とターゲット遺伝子の同定、腱・靭帯形成における腱・靭帯特異的な miRNA の個体レベルでの機能解析を行い、腱・靭帯の形成メカニズムにおける miRNA の機能を解明し、腱・靭帯に関する疾患の病因解明や治療法確立の基盤となる形成機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腱・靭帯特異的な miRNA の同定

腱・靭帯で特異性高く発現する Mkx 遺伝子座に蛍光タンパク質をコードする Venus をノックインしたマウスを用いて、その E14.5 のマウス胚から Venus 陽性の細胞を FACS によりソーティングして RNA を抽出し、Taqman array により miRNA の網羅的な発現解析を行った。

#### (2) 腱組織を用いた発現解析

マウスのアキレス腱および骨格筋などから RNA を抽出し、taqman probe を用いて miRNA の発現解析をリアルタイム PCR により行った。

#### (3) ハイスループットスクリーニングによる miRNA 標的遺伝子のスクリーニング

我々が所有するルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に約 5000 遺伝子の全長 cDNA を挿入したレポーターライブラリーを用いたスクリーニング法を開発し、それを用いて miRNA の標的遺伝子のスクリーニングを行った。得られた候補については、96-well スケールでの 2 次スクリーニングを行った後、miRNA 過剰発現による内在性発現の変動の調査と、miRNA 標的候補配列の点変異レポーターベクターを作製し、直接のターゲットであるかについて検討した。

#### (4) ノックアウトマウスの作製・解析

当初は通常法での作製を予定していたが、TALEN や CRISPR などのゲノム編集技術により、ES 細胞を介さずに短期間でノックアウトマウスを作製できる可能性が出てきたため、ゲノム編集によるノックアウトマウス作製法の開発を試み、その技術を用いて腱・靭帯での発現が見られる miRNA ノックアウトマウスの作製を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 腱・靭帯特異的な miRNA

腱特異的な miRNA を同定する為に、腱・靭帯に強く発現する転写因子である Mkx の Venus ノックインマウスを用いて、E14.5 マウス胚の頭部、内臓を取り除いた組織から Venus 陽性および陰性細胞を、FACS を用いてソーティングして細胞を分離した。この細胞から RNA を抽出し、taqman array 解析により Mkx 陽性細胞特異的に発現する miRNA のスクリーニングを行った。これにより同定した miRNA について、骨格筋及びアキレス腱から抽出した RNA を用いて taqman probe によるリアルタイム PCR 解析を行った。

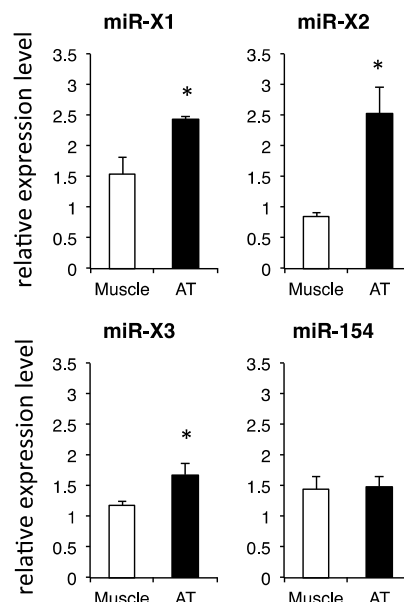


図1 リアルタイムPCRによるmiRNAの発現解析

その結果、3つのmiRNAがアキレス腱において高い発現を示すmiRNAであることが明らかになった(図1)。

## (2) miRNA 標的遺伝子のスクリーニング

miRNAの標的遺伝子スクリーニング法として、ルシフェラーゼ遺伝子の3'UTRに約5000遺伝子の全長cDNAを導入したレポーターライブラリーを用いたスクリーニング法の開発を行った(図2)。

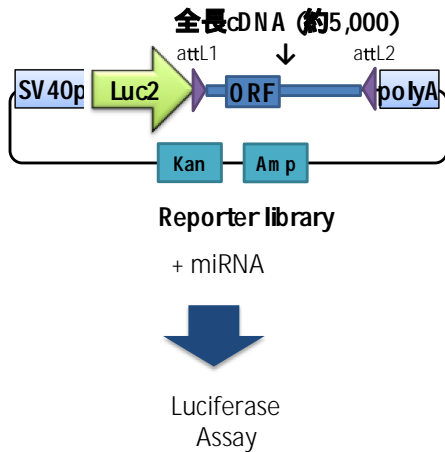


図2 レポーターライブラリーを用いた標的遺伝子スクリーニング

まず、その標的遺伝子がよく分かっているmiR-34aを用いてスクリーニングを実施し、本法の有有用性について検討したところ、既知の標的であるSIRT1およびBCL2を同定し、さらに未知の標的候補3遺伝子を同定した(図3)。次に、miR-34aを過剰発現した細胞において、これら3つの標的遺伝子候補の発現をリアルタイムPCRにより発現を調査したところ、これら遺伝子は、miRNA過剰発現によりmRNAレベルで発現が低下した(図4)。また、miR-34aが認識する可能性のある配列の点変異レポーターを作製し、これを用いたレポーターアッセイによる解析を行った。その結果、miRNA標的候補配列に変異を導入することにより、miRNA過剰発現によるレポーター活性の低下が見られなくなり、その配列がmiRNAの標的配列であることを明らかにした。以上の結果から、これらの遺伝子がmiRNAの直接のターゲット遺伝子であることが明らかになった。興味深いことに、この内の1つは、3'UTRではなくcoding regionを介して制御されていることが分かり、本スクリーニングシステムはmiRNAのターゲットスクリーニングに有効であり、TargetScanなどのmiRNAターゲット遺伝子予測ツールでは同定不可能な、3'UTRを介した通常の様式とは異なるmiRNAのターゲットの同定にも有効であることが示された。

## (3) ゲノム編集技術を応用したノックアウトマウスの作製・解析

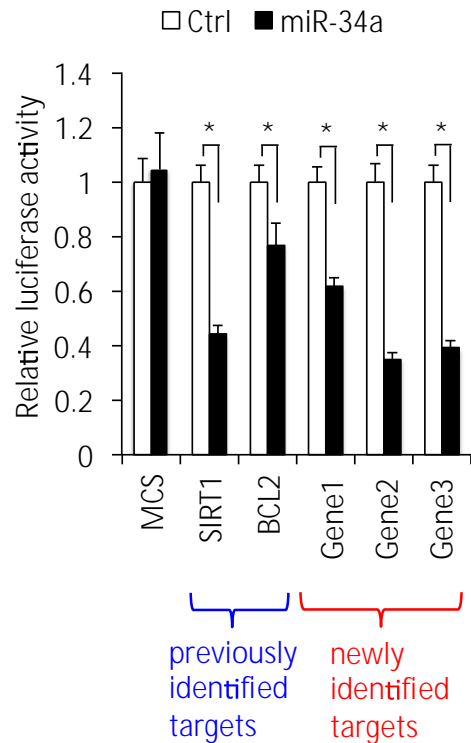


図3 miRNAターゲット遺伝子の同定

### M DA-M B-231 cells

Transfection (RNAiMAX Invitrogen) → RNA isolation, qPCR  
miRNA mimic  
negative control (nega) or  
human miR-34a mimic (miR-34a)

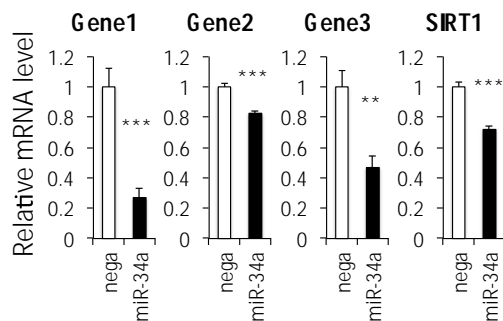


図4 miRNA過剰発現による標的候補遺伝子の発現解析

ノックアウトマウスの作製は、その遺伝子の個体レベルの機能解析を行うにあたり必須の方法であるが、従来の方法は、ES細胞での相同組換えを行う必要があり、作製までに長期間かかってしまうことが難点であった。しかしながら、2013年以降、TALENやCRISPRなどの特定のゲノム領域を簡便に操作するゲノム編集技術を用いた作製が次々と報告され、受精卵への核酸のインジェクションのみで遺伝子改変マウスの取得が可能になった。我々もいち早くこの技術をノックアウトマウス作製に応用し、TALENを用いたmiRNAのノックアウトマウスの作製に成功した

(PLOS ONE 2013)。Taqman array およびリアルタイム PCR による発現解析により、骨格筋と比較してアキレス腱で発現が高かった3つの miRNA のうち、1 つの miRNA について(miR-X1)、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトマウスを作製した。この miRNA は腱の他に軟骨でも高い発現が認められた。本ノックアウトマウスは、正常に繁殖可能で、また、発生においても見かけ上正常で、体重差も野生型と変化はなかった。2 ヶ月齢のノックアウトマウスの腱における表現型は、大きな変化は見られなかった。今後は老齡マウスについても詳細に調査する予定である。

#### 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 2 件)

S. Takada, T. Sato, Y. Ito, S. Yamashita, T. Kato, M. Kawasumi, M. Kanai-Azuma, A. Igarashi, T. Kato, M. Tamano, H. Asahara. Targeted Gene Deletion of miRNAs in Mice by TALEN System. *PLoS ONE*. 8(10): e76004, 2013. 査読あり  
伊藤義晃. Mohawk homeobox 遺伝子による腱発生の制御. *Pharma Medica*. 2013, 31(4): p47-50.

〔学会発表〕(計 1 件)

伊藤義晃. The Reporter Library System to Screen the Targets of RNA Binding Proteins and MicroRNAs. 日本分子生物学会, ポスター, 2014 年 11 月 27 日, 横浜.

〔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 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

学会以外での研究発表

伊藤義晃. Analysis of The Post-Transcriptional Regulation in Inflammation. テニユアトラックシンポジウム, 口頭発表, 2014 年 2 月.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 義晃 (ITO, Yoshiaki)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・テニユアトラック助教  
研究者番号: 50511044

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし