

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860621

研究課題名(和文)心筋分化における長鎖 non-coding RNAの制御機構の解明

研究課題名(英文) Long non coding RNAs regulate the cardiac lineage during embryonic stem cell differentiation

研究代表者

西山 崇比古(Nishiyama, Takahiko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20464844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、non coding RNAでもまだ機能が十分に解明されていないlinc RNAに着目した。心臓発生と心筋分化誘導下において必要なlinc RNAを同定するためにマウス胎児、出生後、成獣からRNAを抽出した。また、ES細胞から心筋分化誘導し作成した心筋細胞と未分化状態のES細胞からRNAを抽出した。これらの、サンプルをnon coding RNA arrayを行い、発生段階に発現量の変化を認めた心臓発生に必要なと考えられるlinc RNAを特定することができた。また、RT-PCRにより同lincRNAの発現量がarrayと一致することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Long non coding RNAs (lncRNAs) are RNA transcripts longer than 200 nucleotides, but they do not code proteins. LncRNAs constitute a heterogenic class of RNAs that includes intergenic RNAs, antisense transcripts, and enhancer RNAs. In recent, several studies have been reported that lncRNAs required for cardiac development and disease. It is obvious that many lncRNAs are expressed in cardiac development and are necessary for cardiovascular lineage. However, it has not been investigated in detail how lncRNAs are regulated in cardiac development and heart failure. Using embryonic stem cell (ESC) differentiation strategies, lncRNAs which restricted to cardiac cell were analyzed. In this study, to establish a map of lncRNAs expression and potential target gene networks during ESC differentiation. We identified the potential target genes of these lncRNAs through a bioinformatic correlation network that clusters lncRNAs into specific functional pathway.

研究分野：循環器内科

キーワード：long non coding RNA

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA は、核内でクロマチン構造を形成しているが遺伝子を発現する際にその構造をダイナミックに変換する必要がある。従って、このクロマチン再構築に関わるヒストン修飾が遺伝子発現の重要な役割を果たしており、その制御にもノンコーディング RNA が深く関わることが明らかにされた。

蛋白質をコードしない RNA (ノンコーディング) が発生過程や癌疾患をはじめとした多くの病態で遺伝子発現制御に大きく関わる。更に、近年の知見として新たに長鎖ノンコーディング RNA (long intergenic non-coding RNA : linc RNA) と呼ばれる 200 塩基以上の塩基配列をもつ遺伝子間 RNA が同定された。しかし、多くの linc RNA の疾患機序、発生過程における重要な役割は未だ十分には解明されておらず、循環器領域においても linc RNA の疾患発症、病態生理に関する報告は非常に少ない。

2. 研究の目的

現在知られている長鎖ノンコーディング RNA の機能はその相互作用する蛋白質や細胞内局在を指標に分類すると、クロマチン修飾酵素複合体と相互作用する、核内で構造体を形成する、その他特定の蛋白質複合体の活性制御の 3 種類が挙げられる。特に、クロマチン修飾因子のリクルートメントを介したエピジェネティックな転写制御機構は疾患発症や発生過程においても重要な役割を果たしていることが推測される。心臓発生過程、心筋分化誘導では転写因子の発現制御がエピジェネティック作用により複雑に制御されていることが判明しており、linc RNA による制御機構が存在する可能性は非常に高いことが示唆されている。実際、成体心臓におけるミオシン重鎖遺伝子座からの lincRNA 転写産物のクラスターが明らかとなり、新たな lincRNA-クロマチン機構が確認された。

心臓発生においては正確な遺伝子発現の制御が必要であり、その機構の破綻は先天性心疾患の発症につながると考えられる。実際に先天性心疾患を引き起こす Nkx2.5 や Tbx5 などはヒストン制御に関わる因子に作用することがわかっている。また、H3K27 メチル基転移酵素である Ezh2 は心臓関連遺伝子の発現制御に関わることも報告されている。

そこで、特に心臓に高発現する心筋特異的 lincRNA に注目し、マイクロアレイを用いて心臓発生、心筋分化誘導に重要な機能を果たす linc RNA を解析する。本研究では、non coding RNA の中でもまだ機能が十分に解明されていない linc RNA に着目している。かつては意味のない配列と考えられていた non coding RNA であるが、今では転写制御に関する重要な機能を持つことがわかってきている。今までも、心臓発生では心筋特異的 microRNA の解析が進んでおり、心臓で高発現する

miR-1, miR-133 の欠損マウスでは心臓発生異常が確認されている。また、miR-1 過剰発現 ES 細胞は心筋分化効率が向上することが知られており、ノンコーディング RNA が心筋分化に必須であり、更に分化促進作用があることが判明している。ヒストン修飾に関わる脱アセチル化も欠損することで、心臓発生異常を示すことがわかっておりエピジェネティックな転写制御機構も正確な心臓発生には欠かせない生物学的機構と考えられる。これらの心筋特異的 lincRNA のエピジェネティックによる転写制御を介した心臓発生、心筋分化の機能解明を行うとともに循環器疾患、心筋再生医療への応用を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 心臓発生と心筋分化誘導下において必要な linc RNA を同定するために、マウス胎児 10.5 日、出生後 1 日、成獣から心臓を摘出し RNA を抽出する。また、ES 細胞から心筋分化誘導し作製した心筋細胞と未分化状態の ES 細胞からそれぞれ RNA を抽出する。コントロールとしてマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用い発現量を比較する。現在までに報告されている lincRNA の発現量を網羅的に解析するために、マイクロアレイを用いて心筋分化に必要な lincRNA を同定する。

(2) 同定した lincRNA に対して siRNA を利用し発現量を抑制し、未分化 ES 細胞からの心筋分化誘導過程における機能を解析する。評価方法としては、FACS を用いた心筋トロポニン陽性細胞数のカウント、hanging drop を用いた拍動胚様体数のカウント、心臓関連遺伝子発現、免疫染色による心筋サルコメア構造の分析を行う。同時に、心筋特異的 lincRNA を発現したベクターよりレンチウィルスを作製し、未分化 ES 細胞に感染させ心筋特異的 lincRNA を過剰発現させた ES 細胞を作製する。そして、同様に心筋分化効率を評価する。特に、FACS において心筋トロポニン陽性細胞数は、成熟した心筋細胞の割合を示すために今後の発展につなげる大きな意味を持つ。そのため、複数の lincRNA が同定された場合はそれぞれの組み合わせにより単独よりも相互作用による向上を詮索する。

(3) 同定した心筋特異的 linc RNA に対する特異的抗体を用いて、転写因子や結合タンパク質の同定、DNA との相互作用やヒストン修飾のゲノム上での局在を同定する。心臓発生における作用を調べるために、マウス胎児 E10.5, 出生後 1 日、成獣の心臓からサンプルを解析する。ここでは、クロマチン修飾に関わる因子との結合に着目する予定である。ヒストンの翻訳後修飾は様々な細胞機能制御に重要な役割を果たすと考えられるが、遺伝子の発現やクロマチン構造の制御には特定のリジン残基のアセチル化、メチル化、ユビキチン化が深く関わっている。特にヒスト

ン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) のメチル化は、遺伝子の発現抑制やゲノムの安定性に関わるヘテロクロマチンの維持に重要であると考えられているためメチル化酵素、脱メチル化酵素、複合タンパク質との相互作用に重点をおいて解析する。

4. 研究成果

(1) マウス胎児心筋および成獣心筋における lincRNA 発現量の比較

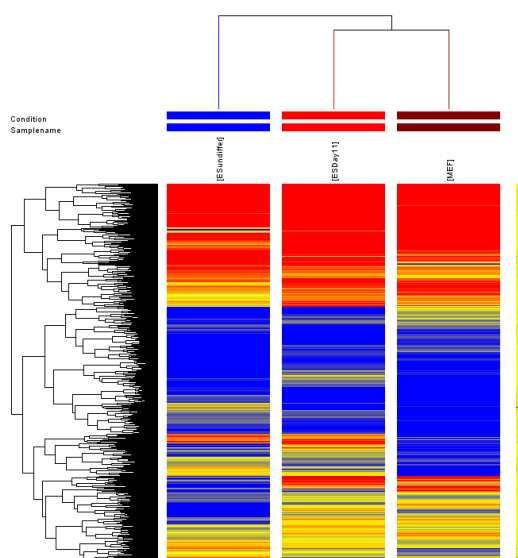
心臓特異的に発現する lincRNA の存在は、心臓発生における重要性を示唆するものである。

マウス胎児 10.5 日、出生後 1 日、成獣から心臓を摘出し RNA を抽出し、また ES 細胞から心筋分化誘導し作製した心筋細胞と未分化状態の ES 細胞からそれぞれ RNA を抽出した。コントロールとしてマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用い発現量を比較したところ、網羅的に解析するために、マイクロアレイを用いて解析を行ったところ多くの長鎖ノンコーディング RNA の発現量が変化していることが判明した (図 1)。

約 200 個の lincRNA が成獣に比べ胎児期に多く発現していた。そして、約 100 個の lincRNA が成獣において発現量が高いことが判明した。

そこで、更にその中でも ES 細胞を用いた心筋分化系においても発現量に大きな変化を認める約 30 個の lincRNA に着目して、siRNA による心筋分化への影響を観察した。

図 1



(2) siRNA を用いた発現量変化

同定した lincRNA のうち発現量の高いもの、そして心筋分化系にかかわりの高い遺伝子座の近傍に位置すると考えられた lincRNA に対して siRNA を作成し、その発現量を低下させ ES 細胞の心筋分化における影響を調べた。まず、siRNA を未分化 ES 細胞に導入し、発量が低下することを確認し、約 60-70% の発現量の低下を得ることができた。

その siRNA-ES 細胞を心筋に分化誘導し心筋トロポニン陽性細胞数のカウント、hanging drop を用いた拍動胚様体数のカウント、心臓関連遺伝子発現比較を行ったところ、通常 ES 細胞よりも拍動胚様体数の低下を認めた。また、心筋トロポニン陽性細胞数も低下し、心臓関連遺伝子の発現量の低下を認めた。以上より lincRNA が ES 細胞の心筋分化系において、重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(3) lincRNA-mRNA の相互作用の同定

lincRNA の作用機序において、遺伝子上の位置は非常に重要である。近傍の mRNA に対して作用を示し、その発現量に変化を起こすためである。そこで、心臓関連遺伝子の発現への lincRNA の作用を検討するために、マウス遺伝子上で同定した lincRNA の 10Kb 内に存在する mRNA をマッピングした。我々は約 20 の lincRNA-mRNA のペアが胎児心筋で制御されていることを同定した。特に、lincRNA n416897/mRNA(hnRNPU) のペアは、lincRNA の発現が胎児期から成獣なるに従って上昇することに対して、逆に hnRNPU の発現量が減少することが明らかとなった。つまり、lincRNA が mRNA を制御している可能性が示唆された。

(4) hnRNPU の心臓発生における役割

hnRNPU の心臓特異的欠損マウスでは、pre-mRNA の段階で重要なスプライシングの課程が阻害され、拡張型心筋症の病態を示すことが報告されている。そこで、ES 細胞の心筋分化の系における hnRNPU の結合蛋白を同定した。その中には、ES 細胞で重要な sal11, sal14, Nanog, HDAC1, Whsc1 などが含まれており、複合体の一部としてクロマチン制御に関わっていることが明らかとなった。さらにヒストン 3 リジン 36 (H3K36) のトリメチル化を介して、過剰な転写制御を抑制していることが判明した。

(5) 今後の展望

lincRNA は ES 細胞において転写因子や様々なクロマチン制御因子と共に転写量の調節を行っていることが推測された。今後、発生期の心臓を用いてゲノムワイドな転写ネットワークの解析をすることで、心臓発生の理解が深められ先天性心疾患発症メカニズム、さらには循環器疾患の発症のメカニズムの解明につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 崇比古 (TAKAHIKO NISHIYAMA)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20464844

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし