

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2017
課題番号：26860578
研究課題名(和文) 心筋分化誘導に関連する lncRNA の探索と解析

研究課題名(英文) Analysis of Cardiac specific lncRNAs

研究代表者

上 大介 (KAMI, DAISUKE)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80415588

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)：Long non-coding RNA (lncRNA)は細胞内で様々な制御を行っており、マウス心臓の発生にも関与して。一方でヒトの心臓発生にlncRNAの関与は不明な点が多い。そこで我々はヒトiPS細胞を用いて心筋細胞への分化誘導を行い、経時的に回収したRNAを用いてRNA-seq解析を行った。この結果、lncRNA EVX1ASを同定した。EVX1ASはiPS細胞に過剰発現させると、心筋関連遺伝子の発現量が増加することから、何らかの機能を持って心筋分化誘導効率を増加させていると予想される。しかしながら、その機能は未だ不明な点が多く、今後も解析を続けていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNA (lncRNA) performs the regulation in the cell, and it is also involved in the mouse heart development. On the other hand, the involvement of lncRNA in human heart development remain unclear. Therefore, we induced differentiation into cardiomyocytes using human iPS cells and RNA-seq analysis was performed in a time dependent. As a result, lncRNA EVX1 AS was identified. Over expression of EVX1AS in iPS cells increased the expression level of cardiomyocyte-related genes such as GATA4, MEF2C, and TBX5. However, its functions are still unknown and it is necessary to continue the analysis in the future.

研究分野：再生医療

キーワード：Long non-coding RNA 心筋細胞 iPS細胞 心筋分化誘導

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (iPSC) や癌細胞は特異的な non-coding RNA (ncRNA) が発現しており、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしていることは知られている (Prensner JR., et al., *Cancer Discov.* 2011.)。また iPSC の発生にも miR-302, miR-372 や RoR といった多くの ncRNA の関与が報告されている (Subramanyam D., *Nat Biotechnol.* 2011, Loewer S. et al., *Nat Genet.* 2010)。この ncRNA はその塩基配列長によって small ncRNA と long ncRNA (lncRNA) に大別されている。miR-302 や miR-372 に代表される miRNA は RISC 体を形成することで複数の遺伝子をノックダウンできる。これらの miRNA は iPSC の発生において TGF β -Receptor をターゲットとし、発現を抑制することで iPSC 化を促進することが知られている (Subramanyam D., *Nat Biotechnol.* 2011)。一方で lncRNA は複数の効果を持つ因子であることが報告されており (Wang KC et al. *Mol Cell.* 2011)、シグナル伝達 (遺伝子発現促進)、デコイ (遺伝子発現抑制)、ガイド分子 (クロマチンへの修飾促進)、足場 (クロマチン構造への作用) など複数の役割を持っている。その際、Histon マーカーへのアプローチも報告されており、分化誘導における各ステージの特異的な遺伝子発現の変化はこれらの lncRNA に調整されている可能性がある (Wamstad JA., et al. *Cell.* 2012, Grote P et al., *Dev Cell.* 2013)。

しかしながら、これまでの癌の浸潤や幹細胞の恒常性維持、iPSC のリプログラミングに関与する ncRNA は miRNA についての解析が中心となって行われており、lncRNA の解析は未だ不十分である。このような背景の中で、iPSC のリプログラミングを成熟を促進する因子として、Regulator of Reprogramming (RoR) と呼ばれる lncRNA が報告され始めた (Loewer S et al., *Nat Genet.* 2011)。今後、発生生物学やリプログラミング、癌細胞の増殖・発生のエピジェネティクス制御に深く関わっている lncRNA に関する検討は新たな生物学のフィールドを形成すると考える。

心筋細胞への分化過程における lncRNA の報告は国内では報告されておらず、国外でも 4 グループのみである (Grote P et al., *Dev Cell.* 2013, Korostowski L. et al., *PLoS Genet.* 2012, Klattenhoff CA. et al., *Cell.* 2013, Wamstad JA., et al. *Cell.* 2012)。また Wamstad らによると心筋分化誘導過程における lncRNA の発現は mRNA や miRNA と同様に時期特異的に変化していることが明らかにされており、心筋分化誘導に関与する lncRNA の存在が示唆されている。我々はこの時期特異的な lncRNA の変化にも何らかの意味があると予想し、これらの lncRNA の詳細についてさらに詳細に解析したところ、心筋分化誘導過程における lncRNA が複数含まれていることが明らかとなった。マウス胚

性幹細胞からの心筋分化過程において報告されている lncRNA は中胚葉特異的であり、心筋細胞に特異的なものは報告されていない。さらに、これらの解析は全てマウスで行われており、ヒトでの解析はなされていない。そこで我々はヒト iPSC を用いた心筋分化誘導系の各分化ステージにおける lncRNA の解析を試み、その特定とその機能解析、さらには時期特異的な lncRNA 遺伝子導入による誘導効率の向上を目的とする。

これらの目的を達成するためには、ヒト iPSC の心筋分化誘導、統計学的な処理を用いた各分化誘導ステージに特異的な lncRNA の選択とその解析に分子生物学的アプローチによる遺伝子発現量を制御する技術が必要となる。我々のグループは統計学的な処理を用いた心筋分化や発生に関連する遺伝子を特定してきた (Kami D et al., *Plos One.* 2008)。また磁性ナノ粒子を用いた高効率な遺伝子導入の系 (Kami D et al., *J Artif Organs., Int J Mol Sci.* 2011) を確立している。また、我々は既に iPSC のリプログラミングに関与する RNY1 を特定しており、解析を進めている (16K15260)。この RNY1 はリプログラミング過程にて発現が上昇する ncRNA であり、この ncRNA の発現量を siRNA を用いて阻害すると、コロニー形成率が 1/34 まで減少することを明らかにした (投稿準備中)。このように我々は既に lncRNA の解析系とヒト iPSC を用いた心筋分化誘導系を構築しており、本研究を迅速に遂行することが可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は心筋分化に関与する lncRNA の特定とその機能解析、さらには時期特異的な lncRNA 遺伝子導入による誘導効率の向上である。既に我々は本解析の候補因子として各ステージ (多能性幹細胞、中胚葉性細胞、心筋前駆細胞、心筋細胞) に特異的な lncRNA を絞り込んでおり、これらの lncRNA に関して今回申請した 4 年以内に以下の項目について解析する。

(1) 中胚葉性細胞から心筋前駆細胞、心筋前駆細胞から心筋細胞におけるそれぞれの移行を制御する lncRNA の動態を解析する

(2) 中胚葉性細胞から細胞系統が近似している血液細胞への以降に関して同様の検討を行う。

(3) (1)と(2)の結果を基に lncRNA による心筋分化制御機構を確立する。

3. 研究の方法

本研究は下記の 4 段階に分けて解析を進めた。

(1) 候補 lncRNA の選択

(2) ヒト iPSC の心筋分化誘導と過程における候補 lncRNA の発現変化解析

(3) 候補 lncRNA の発現量の調整における心筋分化と血液分化誘導効率の解析

(4) 候補 lncRNA と相互作用するターゲットの解析

これらの解析はそれぞれ候補 lncRNA の選択と機能解析に必要となる。1 の候補 lncRNA の選択は既に終わっており、2 にてこれらの候補 lncRNA の発現量変化を経時的に解析する。さらに 3 にて分子生物学的アプローチにて遺伝子発現量を制御し、その動態と心筋分化誘導効率に与える影響を調べる。最後に 4 にて候補 lncRNA と相互作用するターゲットを解析し、その機能解析を試みた。

4. 研究成果

(1) 候補 lncRNA の選択と (2) ヒト iPSC の心筋分化誘導と過程における候補 lncRNA の発現変化解析

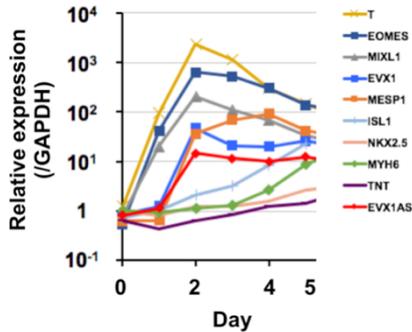


図1 hiPSC-CM誘導における心筋関連遺伝子発現解析
ヒト iPSC 細胞から安定した心筋細胞への分化誘導系を確立し、各分化ステージ (day0, 1, 5, 7) にて total RNA を回収し、定量的 RT-PCR による発現確認をした (図 1)。この結果、iPSC から中胚葉系 (T, MESP1)、心筋前駆細胞 (NKX2-5, GATA4)、心筋細胞 (cTnI, alpha-MHC) への遺伝子発現変化を確認できた。以上結果より、良好な心筋分化誘導が出来ていたことが明らかになったため、このこれらの RNA のうち、特に初期ステージの RNA を用いて更に RNA-seq 解析を行った (図 2)。この結果、マウスでは報告があるもののヒトでは機能が不明な新たな lncRNA である EVX1AS が一過性に強発現していることが明らかとなった (図 3)。取得された全長は、これまでの報告と異なっていたことから、RACE 法による全長を再取得しおよそ 3.4 kbp の配列解析に成功した (図 4)。

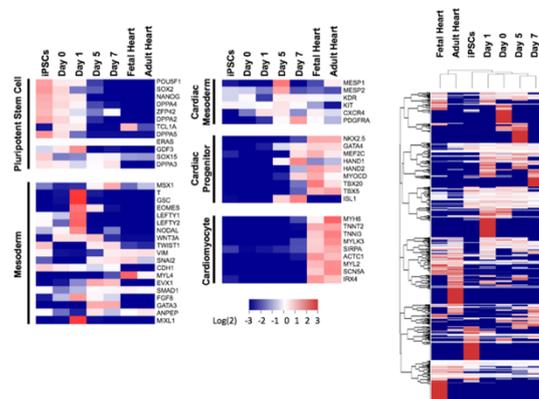


図2 hiPSCから心筋細胞へのRNA-seq解析

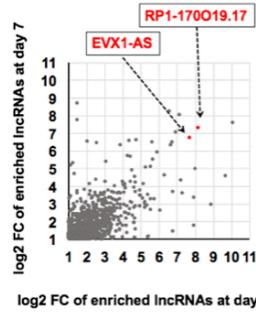


図3 Day5における発現量の高いlncRNA

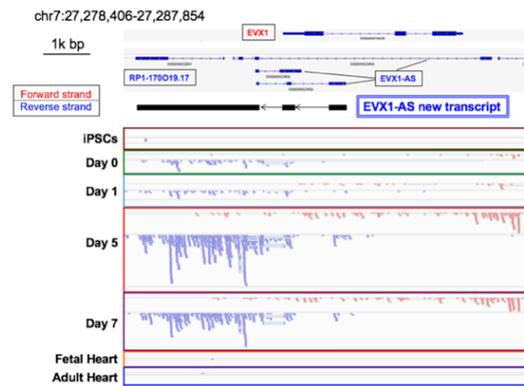


図4 新規EVX1-AS配列決定

(3) 候補 lncRNA の発現量の調整における心筋分化と血液分化誘導効率の解析

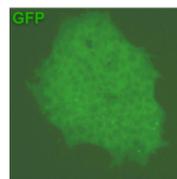


図5 EVX1AS-over expression iPSC細胞の樹立

全長決定した EVX1AS は lentivirus vector (EF1alpha プロモータ) に挿入し、ヒト iPSC 細胞へ導入し、強制発現系を樹立した (図 5)。この iPSC を心筋細胞に分化誘導したところ、有意差を持って心筋分化誘導関連遺伝子 (GATA4, MEF2C, TBX5, BAF60C, TBX20, HAND2, cTNT) の発現量が 1.5 から 4 倍増加した (図 6)。一方で発現抑制の系を small interfering RNA (siRNA) や Locked Nucleic Acid (LNA) にて試してみたものの、安定した遺伝子発現抑制の系の構築に苦難しており、現在も系を構築している。

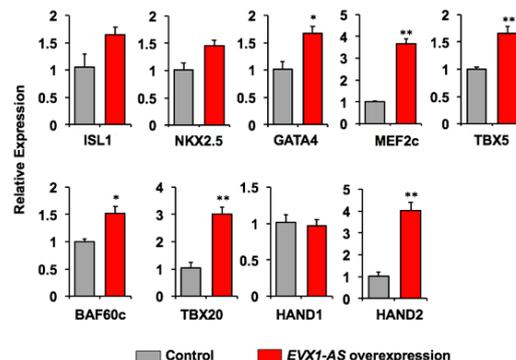


図6 EVX1AS OE-hiPSC-CM遺伝子発現解析

(4) 候補 lncRNA と相互作用するターゲットの解析

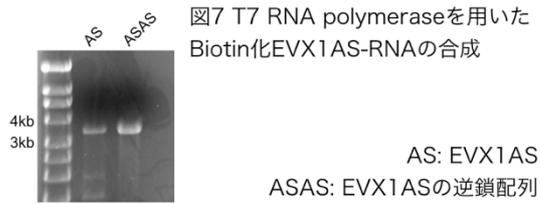


図7 T7 RNA polymeraseを用いた Biotin化EVX1AS-RNAの合成

AS: EVX1AS

ASAS: EVX1ASの逆鎖配列

決定した全長配列を参考に鋳型を PCR にて作製し、5' の直上に T7 プロモーターを付与した。この鋳型を PCR にて大量に増幅させた後、T7RNA ポリメラーゼと Biotin ラベルしたウリジンとその他核酸を添加し、目的 Biotin-EVX1AS も大量に合成できた (図 7)。合成した Biotin-EVX1AS のアガロースゲル電気泳動をしたところ、単一のバンドで目的サイズ付近に存在していたことから、Biotin-EVX1AS 合成は成功したと考えられる。

この Biotin-EVX1AS に iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導過程のタンパク質と混合することで、この Biotin-EVX1AS と結合するタンパク質を決定することにした。誘導は lncRNA の発現がピークに達する誘導日を用いた。この際、ネガティブコントロールとして、目的配列と逆配列の Biotin-EVX1AS (ASAS) も合成し、これを利用した。

これらのタンパク質は Biotin-EVX1AS と反応させたのち、Streptavidin magnetic beads にて濃縮した。濃縮したタンパク質溶液は SDS-PAGE によって分離し、複数の大きさによってゲルを回収し、これらのゲルをそれぞれ LC-MS/MS 解析にて解析し、心筋分化誘導時にこの EVX1AS と特異的に結合する候補タンパク質を絞り込んだ (Table 1)。絞り込んだ候補タンパク質 (HuR, ARID1A) と心筋分化との関連が報告されているタンパク質 (BRG1) の抗体を用いて、再度 RNA pull down した総タンパク質にてウェスタンブロッティングを試みた。しかしながら、これらのタンパク質は全て陰性であり、非特異的に RNA に結合したタンパク質を選択した可能性が高い (図 8)。

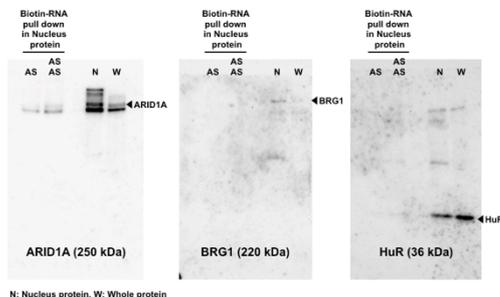


図8 Biotin化RNAを用いたRNA pull down assay

そこで現在、新たなタンパク質の選択も進めている。また Biotin と Streptavidin の結合力は高いことが報告されているが非特異的な結合も多いことが報告されているため (Adachi S., *Nucleic Acids Res.* 2014)、RNA pull down には適していない。そこで新

たな RNA pull down 法として、Flag を付与した RNA 分子を用いることで低バックグラウンドな解析が可能となるため、こちらも引き続き検討したい。

近年、lncRNA の新たなアプローチとして、lncRNA から翻訳される機能性ペプチドの解析が注目を浴びている。これは lncRNA から翻訳される 100 前後のアミノ酸ペプチドで、骨格筋にて lncRNA 由来の機能性ペプチドが作用することで筋再生に関与することが報告されている (Matsumoto et al. *Nature* 2017)。我々の lncRNA も本報告と同様の配列が 13 peptides 存在していることから同様のメカニズムにて心筋分化誘導に関与している可能性がある (図 9)。今後はこれらの視点も踏まえて研究を進めていく。

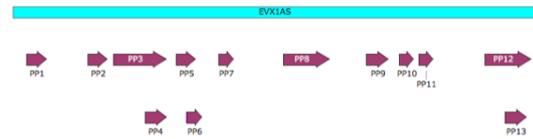


図9 EVX1ASに存在するpeptides

Table 1 Proteins using Biotin-EVX1AS RNA pull down assay

Accession	Description
GBG2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2
CYTA	Cystatin-A
SNRPA	U1 small nuclear ribonucleoprotein A
RS3	40S ribosomal protein S3
CASPE	Caspase-14
RS3A	40S ribosomal protein S3a
ELAV1	ELAV-like protein 1
HNRPD	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0
SOX11	Transcription factor SOX-11
RBMS1	RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1
CG025	UPF0415 protein C7orf25
SPB12	Serpin B12
KPYM	Pyruvate kinase PKM
DHE3	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial
SP14L	Nuclear body protein SP140-like protein
CEP83	Centrosomal protein of 83 kDa
PUS7L	Pseudouridylate synthase 7 homolog-like protein
ANPRB	Atrial natriuretic peptide receptor 2
REXO1	RNA exonuclease 1 homolog
ARHGA	Rho guanine nucleotide exchange factor 10

ARI1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
DMBT1	Deleted in malignant brain tumors 1 protein

(4) 研究協力者
該当なし

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 0 件)

該当なし

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. Kami D., Kitani T., Toyoda M., Gojo S. Non-coding Y-RNA1 is essential for iPS cell reprogramming. International Society for Stem Cell Research 13th Annual Meeting. Stockholm, Sweden. 2015.
2. Kitani T., Kami D., Kawasaki T., Gojo S. A new Long noncoding RNA EVX1-AS is transiently expressed during early human cardiac development. International Society for Stem Cell Research 13th Annual Meeting. Stockholm, Sweden. 2015.
3. Kami D., Kitani T., Matoba S., Gojo S. A new Long noncoding RNA EVX1-AS is transiently expressed and induced during early human cardiac development. Cardiovascular and Metabolic Week 2017. Osaka, Japan. 2017.

〔図書〕 (計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上 大介 (Kami Daisuke)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：80415588

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし