

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26113008

研究課題名(和文) ncRNAネオタクソノミのための大規模解析基盤の開発

研究課題名(英文) Development of a large scale analysis platform for ncRNA neotaxonomy

研究代表者

浅原 弘嗣 (ASAHARA, Hiroshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70294460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 78,500,000円

研究成果の概要(和文)：ハイコンテンツ顕微鏡システム、遺伝子ライブラリー、ゲノム編集技術などの新しい技術、戦略を開発・導入し、既知ncRNAタクソンの拡張、さらにはそれぞれのncRNAタクソンが作る複合体の同定と挙動の解析、さらには新規ncRNAタクソンの探索を行った。また、最近注目を浴びているゲノム編集技術であるCRISPR-Cas9をncRNAの機能解析用に最適化し、新規に同定されたncRNAの機能を細胞・個体レベルで高速に遺伝学的に解析する手法を開発し、領域内で共有する事で、ncRNAネオタクソノミ研究を加速させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、ハイコンテンツ顕微鏡、GFPタグ遺伝子ライブラリー、遺伝子編集での個体作成などの新しい技術、戦略を開発あるいは導入し、これらシステムを複合的に用いることで、新規ノンコーディングRNAの同定とその機能解析による分類を細胞・個体レベルで進めることができた。結果、関節炎、骨系統疾患や白血病の病態解明や治療法の開発に貢献することができた。

研究成果の概要(英文)：We developed and introduced new technologies and strategies such as high-content microscopy systems, gene libraries, genome editing technologies to extend known ncRNA taxon, and further complex that each ncRNA taxon makes. We aimed to identify and analyze their behavior, and search for new ncRNA taxons. In addition, we have optimized the genome editing technology for functional analysis of ncRNA, and developed a method to analyze the function of newly identified ncRNA at high speed and genetically, accelerating research on ncRNA neotaxonomy.

研究分野：システム医学

キーワード：ノンコーディングRNA マイクロRNA 関節炎 遺伝子編集 細胞内構造体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

異なる種間での比較ゲノム解析により、タンパク質をコードする遺伝子の種類・数は比較的保存されているが、タンパク質に翻訳されないゲノム領域は、生物の進化とともにその比率が加速度的に上昇していること、しかも、それらの領域の多くからRNAの転写が行われ、いわゆるncRNAを産生している事実に注目が集まっており、ゲノム科学に残された数少ないフロンティアの一つと考えられるようになった。我々は、関節炎の病態におけるマイクロRNA(miRNA)の解析を行い、miR-146が炎症を収束制御すること、miR-140が組織のホメオスタシスを高め、炎症に抵抗性を与える機能を持っている事などを報告してきた(Miyaki et al., *Genes Dev.* 2010; Yamashita et al., *J. Biol. Chem.* 2012; Nakasa et al., *Arthritis Rheum.* 2008)。しかしながら、miRNAはゲノムから転写されるncRNAの一部を占めるに過ぎない。その他の大部分のncRNAも、特定の作動エレメントを介して作動装置を形成し、生理機能を発揮していると考えられるが、その詳細は混沌としたままである(Hirose et al., *EMBO Rep* 2014)。本新学術領域「ncRNA ネオタクソノミ」研究では、雑多なncRNA群を作動エレメントごとに分類し、それぞれの特性に応じた解析を効率的に進めることを目指している。近年、領域代表の廣瀬らの研究により、核内構造体の骨格となって働く一群のncRNA(architectural RNA: arcRNA)の存在が明らかとなった。また、多くのncRNAがクロマチンと相互作用してエピジェネティックな遺伝子発現を制御している例が数多く報告されている。しかしながら、ncRNAの機能を一次配列の相同性から予測する事は困難であり、これらのncRNAタクソンに属するncRNAがゲノム中にどれくらい存在するのか、現時点での情報は全く得られていない。ncRNAによる生体制御機構の全容を明らかにするためには、各ncRNAタクソンに属するncRNAを効率よく探索し、その生理機能を迅速に解析し、情報を統合するための技術を開発することが重要な鍵となる。申請者は、現在までに、「総背番号性」に並べたヒト遺伝子ライブラリーを用いた細胞ベースでの機能スクリーニング(Ito et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; Watanabe et al., *PLoS Genetics* 2013)やデータベース構築(Yokoyama et al., *Dev. Cell* 2009; Shimizu et al., *PLoS One* 2013)を用いたシステム生物医学研究、クロマチンの制御による発生分化機構の分子生物・生化学的解析を行ってきた。さらに、2012年にはTALENおよびCRISPRによるノックアウトマウスの作製に成功しており、現在では、細胞、マウス、ラットでの自在なノックイン、ノックアウトなどの遺伝子変異導入系を確立させている。本研究では、ncRNAタクソノミを拡張するための基盤技術となる、ハイコンテツ顕微鏡、GFP融合遺伝子ライブラリーなどの新しい技術、戦略を開発・導入し、それらの技術を領域内で共有する事でncRNAネオタクソノミ研究を加速させる。

2. 研究の目的

本研究においては、ハイコンテツ顕微鏡、GFPタグ遺伝子ライブラリー、遺伝子編集などの新しい技術、戦略を開発・導入し、これらシステムを領域内で共有することで、既知ncRNAタクソンの探索を目指す。また、最近注目を浴びているゲノム編集技術であるTALE(Transcription Activator-Like Effector)やCRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas9システムをncRNAの機能解析用に最適化し、新規に同定されたncRNAの機能を細胞・個体レベルで高速に遺伝学的に解析する手法を開発し、領域内で広く共有することで、ncRNAネオタクソノミ研究を飛躍的に加速させる。

3. 研究の方法

(1) ハイコンテツ顕微鏡の顕微鏡観察技術による ncRNA 分類

昨年度に引き続き、ハイコンテツ顕微鏡システムを用いて炎症刺激下・ヒートショック刺激下における細胞内挙動について、刺激下における RNA 依存性の構造体が持つ生理的機能について詳細な解析を進める。

(2) miRNA ターゲット解析

全長 cDNA(ヒト)5000 種が組み込まれているルシフェラーゼレポーターライブラリー、マイクロアレイやデータベースを相補的に活用し、昨年度までの、乳がん発症に關与する miR-34a の成果を基に、更に、軟骨恒常性に關与する miRNA や RNA 結合タンパクの新規ターゲット遺伝子の解析を行う。

(3) ncRNA を利用した治療戦略

miRNA を用いた変形性關節症(OA)の治療を目指し、關節への核酸導入法の検討を行う。蛍光ラベル前駆体 miRNA を用いて膝靭帯切断による変形性關節症モデルマウスの關節への導入の最適化を行い、miRNA mimic を用いて変形性關節症モデルでの治療奏効について解析する。

(4) 炎症における ncRNA の解析

炎症時に発現する ncRNA を同定、この機能をノックアウトマウスを用いた個体レベルでの機能解析も含め進めることで、ncRNA による炎症制御機構の新たな分子機構を探る。

4. 研究成果

ハイコンテツ顕微鏡システム、遺伝子ライブラリー、ゲノム編集技術などの新しい技術、戦略を開発・導入し、これらシステムを領域内で共有することで既知 ncRNA タクソンの拡張、さらにはそれぞれの ncRNA タクソンが作る複合体の同定と挙動の解析、さらには新規 ncRNA タクソンの探索を行った。また、ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 を ncRNA の機能解析用に最適化し、新規に同定された ncRNA の機能を細胞・個体レベルで高速に遺伝学的に解析する手法を開発し、領域内で共有する事で、ncRNA ネットワーク研究を加速させた。具体的には、計画に従って、以下の4テーマにおいて研究を推進しており、成果を得た。(1)關節に特異的なマイクロRNAである miR-140 とその宿主遺伝子であるユビキチン酵素をコードする WW P 2 のそれぞれのノックアウトマウスの解析から、発生・発達期の骨格形成においては miR-140 の欠損のみがフェノタイプを生じ、その後の組織恒常性維持においては、miR-140 と WW P 2 の両方が軟骨を保護する機能をもつことを見出し、WW P 2 mRNA の關節内導入が關節炎の治療戦略となる可能性を明らかにした。(2)炎症時に発現する ncRNA を同定、この機能をノックアウトマウスを用いた個体レベルでの機能解析も含め進めることで、ncRNA による炎症制御機構の新たな分子機構の一端を解明した。これにより、ncRNA の新たな機能とそのメカニズムを見出した。(3)オリジナルで構築した全長 cDNA(ヒト)5000 種が組み込まれているルシフェラーゼレポーターライブラリーを活用し、炎症に關与するマイクロRNA や RNA 結合タンパクの新規ターゲット遺伝子の解析を行い、あらたなターゲット候補を同定した。(4) GFP ライブラリーとハイコンテツ顕微鏡システムを組み合わせることで、炎症刺激下・ヒートショック刺激下における細胞内挙動について、特に RNA 結合タンパクについてデータを取得、それらの刺激前後における分子挙動を詳細に解析し、分類した。その中から、今まで報告されていない興味深い分子局在について、その機能と結合する RNA との関係について研究を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件) 雑誌論文は全て査読有

1. Mokuda S, Nakamichi R, Matsuzaki T, Ito Y, Sato T, Miyata K, Inui M, Olmer M, Sugiyama E, Lotz M, [Asahara H](#). Wwp2 maintains cartilage homeostasis through regulation of Adamts5. *Nat Commun*. 2019 Jun 3;10(1):2429.
2. Mitsumura T, Ito Y, Chiba T, Matsushima T, Kurimoto R, Tanaka Y, Kato T, Uchida K, Ito T, Yamamoto K, Eishi Y, Kitagawa M, Miyazaki Y, Inase N, [Asahara H](#). Ablation of miR-146b in mice causes hematopoietic malignancy. *Blood Adv*., 2(2018), pp. 3483-3491.
3. Mochizuki Y, Chiba T, Kataoka K, Yamashita S, Sato T, Kato T, Takahashi K, Miyamoto T, Kitazawa M, Hatta T, Natsume T, Takai S, [Asahara H](#). Identification of a critical far-upstream enhancer complex for cartilage-specific Sox9 expression. *Dev Cell*., 46(6)(2018), pp. 794-806.
4. Nakamichi R, Kataoka K, [Asahara H](#). Essential role of Mohawk for tenogenic tissues homeostasis including spinal disc and periodontal ligament. *Mod Rheumatol*.,28(6)(2018),pp. 933-940.
5. Inui M, Mokuda S, Sato T, Tamano M, Takada S, [Asahara H](#). Dissecting the roles of miR-140 and its host gene. *Nat Cell Biol*.,20(5)(2018), pp. 516-518.
6. Kataoka K, Matsushima T, Ito Y, Sato T, Yokoyama S, [Asahara H](#). Bhlha9 regulates apical ectodermal ridge formation during limb development. *JBMM*.,36(1)(2018), pp. 64-72.
7. [Asahara H](#), Inui M, Lotz M. Tendons and Ligaments: Connecting Developmental Biology to Musculoskeletal Disease Pathogenesis. *JBMR*., 32(9)(2017), pp. 1773-1782. Review.
8. Yokoyama S, Furukawa S, Kitada S, Mori M, Saito T, Kawakami K, Izpisua Belmonte JC, Kawakami Y, Ito Y, Sato T, [Asahara H](#). Analysis of transcription factors expressed at the anterior mouse limb bud. *PLoS One* .,12(5)(2017), pp. e0175673.
9. Ito Y, Inoue A, Seers T, Hato Y, Igarashi A, Toyama T, Taganov K, Boldin M, [Asahara H](#). Identification of targets of tumor suppressor microRNA-34a using a reporter library system. *Proc Natl Acad Sci U S A*.,114(15)(2017), pp. 3927-3932.
10. Hasei J, Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Horii T, Olmer M, Hatada I, Fukuda K, Ozaki T, Lotz M, [Asahara H](#). TWIST1 induces MMP3 expression through up-regulating DNA hydroxymethylation and promotes catabolic responses in human chondrocytes. *Sci Rep*.,7(2017), pp. 42990.
11. Nakasuji T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, Yamatoya K, Tanaka H, Kondo T, Miyado K, Miyasaka N, Kubota T, Ogura A, [Asahara H](#). Complementary critical functions of Zfy1 and Zfy2 in mouse spermatogenesis and reproductiontran. *PLoS Genetics* .,13(1)(2017), pp. e1006578.
12. Koda N, Sato T, Shinohara M, Ichinose S, Ito Y, Nakamichi R, Kayama T, Kataoka K, Suzuki H, Moriyama K, [Asahara H](#).
The transcription factor mohawk homeobox regulates homeostasis of the periodontal ligament. *Development*.,144(2)(2017), pp. 313-320
13. Naito M, Mori M, Inagawa M, Miyata K, Hashimoto N, Tanaka S, [Asahara H](#). Dnmt3a Regulates Proliferation of Muscle Satellite Cells via p57Kip2. *PLoS Genetics* .,12(7)(2016), pp. e1006167.

14. Nakamichi R, Ito Y, Inui M, Onizuka N, Kayama T, Kataoka K, Suzuki H, Mori M, Inagawa M, Ichinose S, Lotz M, Sakai D, Masuda K, Ozaki T, Asahara H. Mohawk promotes the maintenance and regeneration of the outer annulus fibrosus of intervertebral discs. *Nat Commun.*,7(2016), pp. 12503.
15. Suzuki H, Ito Y, Shinohara M, Yamashita S, Ichinose S, Kishida A, Oyaizu T, Kayama T, Nakamichi R, Koda N, Yagishita K, Lotz M, Okawa A, Asahara H. Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ,113(28)(2016), pp. 7840-5.
16. Kayama T, Mori M, Ito Y, Matsushima T, Nakamichi R, Suzuki H, Ichinose S, Saito M, Marumo K, Asahara H. Gtf2ird1-Dependent Mohawk Expression Regulates Mechanosensing Properties of the Tendon. *Mol Cell Biol.* ,36(8)(2016) ,pp. 1297-309.
17. Gernapudi R, Wolfson B, Zhang Y, Yao Y, Yang P, Asahara H, Zhou Q. MicroRNA 140 Promotes Expression of Long Noncoding RNA NEAT1 in Adipogenesis. *Mol Cell Biol.* ,36(1)(2015), pp. 30-8.

〔学会発表〕(計 64 件)

1. Hiroshi Asahara、Genome dynamics for chondrogenesis and miRNAs for cartilage homeostasis via Sox9、Cartilage GRC 2019、Hotel Galvez、2019年3月21日
2. Hiroshi Asahara、miRNAs in arthritis pathogenesis and therapy、JAJ RNA 2018、北海道大学 医学部学友会館「フラテ」、2018年11月5日
3. Hiroshi Asahara、The completely automated ChIP system performed by LabDroid "Maholo"、Robotics and Semantic Systems for Biology (RSSB) 2、MIRAIKAN、Odaiba, Tokyo、2018年1月27日
4. Hiroshi Asahara、Transcription Factor Mxk Regulates Tendon Development, Homeostasis and Regeneration. Collagen Gordon Research Conference、アメリカ、Colby-Sawyer College、2017年7月16日
5. 浅原弘嗣、miRNA in Cancer, Arthritis and Homeostasis、第43回内藤カンファレンス、札幌市シャトレーゼガトーキングダム、2017年6月29日

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：肝がんモデルマウスおよび肝がん治療用の医薬

発明者：浅原 弘嗣、伊藤 義晃

権利者：同上

種類：特許

番号：JP2015/230477

出願年：2015年11月26日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

遺伝子の織り成す旋律を採譜するには、東京医科歯科大学ピアノの会 第21回市民フォーラム
(荏原文化センター) 2018年6月2日

RNA 階層における炎症制御機構の解明、千里ライフサイエンスセミナー(大阪)2014年2月
21日

分野ホームページにて研究内容を掲載

(<https://www.tmdusystemsbiomedicine.com/>)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：千葉 朋希

ローマ字氏名：CHIBA Tomoki

研究協力者氏名：松島 隆英

ローマ字氏名：MATSUSHIMA Takahide

研究協力者氏名：栗本 遼太

ローマ字氏名：KURIMOTO Ryota

研究協力者氏名：片岡 健輔

ローマ字氏名：KATAOKA Kensuke

研究協力者氏名：矢野雄暉

ローマ字氏名：YANO Yuki

研究協力者氏名：内田 雄太郎

ローマ字氏名：UCHIDA Yutaro

研究協力者氏名：伊藤 義晃

ローマ字氏名：ITO Yoshiaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。