

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08421

研究課題名(和文) コドン置換TALENライブラリーを応用した非コード長鎖RNAの生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidating the role of long non-coding RNA in vivo by genome editing technologies

研究代表者

千葉 朋希 (CHIBA, Tomoki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00645830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年の大規模なトランスクリプトーム解析によりゲノムの多くの領域からたんぱく質をコードしないRNA (lncRNA) が転写されていることが明らかになってきた。これまでに炎症性サイトカインの発現を正に制御する新規lncRNAを同定し、LASCと名付けた。LASCはIL-6やGM-CSFといった炎症性サイトカインの発現に重要であり、転写因子NF- $\kappa$ Bのプロモーター領域への動員に重要であることを明らかにした。lncRNAの生理的意義を明らかにするために、LASC遺伝子ノックアウトマウスをゲノム編集技術を用いて作製し、LASCが個体における炎症応答の惹起に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトやマウスにおいて、タンパク質をコードしない非コードRNA (non-coding RNA) は20,000種類以上あると推定されている。その多くは機能を持たないRNAであると考えられているが、一部のRNAは生命機能に重要な役割を果たしている。LASCは炎症性サイトカインの発現に重要な長鎖非コードRNAであり、個体における炎症応答に重要なRNAであることが示された。

研究成果の概要(英文)：Recent advantages of transcriptome analyses revealed that non-coding RNAs, especially long non-coding (lnc) RNAs, are transcribed across genome and involved in various aspects of biological processes. I have identified a novel lncRNA that positively regulates inflammatory cytokine expression and named LASC. LASC is required for the expression of inflammatory cytokines such as IL-6 and GM-CSF. Recruitment of transcription factor NF- $\kappa$ B was strongly reduced in LASC deficient cells, suggesting that LASC could regulate inflammatory cytokine expression at transcriptional level. In order to clarify the role of LASC in inflammation in vivo, LASC knockout mice were generated by genome editing technology and showed resistance to endotoxin shock.

研究分野：免疫学

キーワード：長鎖非コードRNA 炎症性サイトカイン ゲノム編集

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

### 1. 研究開始当初の背景

近年の GENCODE や FANTOM などのトランスクリプトーム解析によりタンパク質をコードする遺伝子がゲノム領域の5%未満にすぎないのに対して、ゲノムの非コード領域とされていた領域から20,000を超えるRNAが転写されていることが明らかになり、それらの多くはタンパク質をコードしないnon-coding RNA(非コードRNA)であると考えられ、non-coding RNAが生命現象や病態形成に大きな役割を担うことが強く示唆される。ncRNAはその転写産物の大きさから200塩基以下のsmall non-coding RNAと数百から数千塩基におよぶlong non-coding(lnc)RNAに分類される。炎症性サイトカインは炎症応答の中心を担うサイトカインであり、感染や組織修復に重要であるが、過度な炎症性サイトカインの産生は自己免疫疾患や炎症性疾患の発症はもとよりがんや生活習慣病などの様々な疾患につながると考えられている。lncRNAは転写レベルでの制御に関与することが報告されている。これまでの報告によるとlncRNAはポリコムタンパク質複合体の構成因子であるEzh2などと結合し、標的遺伝子のエピジェネティックな発現制御を介してES細胞の多能性の維持やがん細胞の浸潤能の獲得に寄与すると考えられている。近年、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析によりマクロファージや樹状細胞においても多くのlncRNAが発現していることが明らかになってきており、炎症性サイトカインの発現に関わるいくつかのlncRNAが報告された(Carpenter S. et al.2012 Science, Krawczyk M. et al. 2014 eLife)。しかし、lncRNAの炎症性疾患への寄与は明らかではない。

これまでに炎症性サイトカインのエピジェネティックな制御を明らかにする過程において発現制御に関わる新規のlncRNAを同定し、炎症性サイトカインの発現をポジティブに制御することを見出した。

### 2. 研究の目的

長鎖非コードRNA(lncRNA)による制御が炎症性サイトカインの発現制御における新たな階層として注目されているが、その生理的意義は明らかではない。これまでに炎症性サイトカインの発現を転写レベルで制御する新規のlncRNAを同定し、LASCと名付けた。そこで、TALENやCRISPR/Cas9に代表されるゲノム編集技術を応用し、LASCノックアウトマウスを作製し、長鎖非コードRNAによる炎症性サイトカインの発現制御機構を明らかにし、炎症性疾患における長鎖非コードRNAの役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) LASCノックアウトマウスの作製

これまでの研究成果からLASCは3つのエクソンからなるRNAであり、2つの異なる転写開始点が存在することを明らかにした。また、第3エクソンがその機能に重要であることを示唆する結果を得たため、第2エクソンの途中でポリA鎖負荷配列であるSV40 late poly A配列をノックインすることでLASCの転写を第2エクソンの途中で停止させることでノックアウトマウスを作製することを試みた。Cas9遺伝子およびLASC特異的sgRNAはT7ポリメラーゼを用いたin vitro転写によりRNAを作製し、その5'末端側にキャップ構造を付加した。ポリA鎖負荷配列の5'側および3'側にそれぞれ1,000塩基および800塩基のLASCコード領域と相同な配列を付加し、homology armとした。Homology armとポリA鎖負荷配列を含むDNAをリン酸化修飾したプライマーを用いて増幅し、その後lambda exonucleaseを用いて1本鎖DNA(ssDNA)とした。これらをC57BL/6マウスの受精卵にマイクロインジェクションにより導入し、産仔を得た。得られた産仔の遺伝型はPCRにより確認した。LASCノックアウトマウスより骨髓細胞を採取し、M-CSF存在下で1週間培養し、マクロファージを分化誘導し、100ng/ml LPSまたは1µg/ml Pam3CSK4で5時間培養した。LPS刺激したマクロファージからRNAを精製し、cDNAを合成した。LASCの発現をLASC特異的プライマーを用いて定量PCRにより解析した。

#### (2) マウス敗血症モデル

LASCのin vivoにおける炎症応答への寄与を明らかにするために、敗血症モデル(エンドトキシントック)を用いた。8から12週齢の野生型(8匹)およびLASCノックアウトマウス(7匹)の腹腔に20mg/kgのLPSを投与し、経時的に生存率を計測した。

#### (3) LASCによる炎症性サイトカインの発現制御機構

炎症性サイトカインは転写因子NF- $\kappa$ Bにより強く誘導されるが、これまでにLASCはNF- $\kappa$ Bの核移行には関与しないが、NF- $\kappa$ Bの炎症性サイトカインのプロモーター領域への結合、それに続くRNAポリメラーゼIIの転写開始点への動員に重要であり、炎症性サイトカインの発現を転写レベルで制御する可能性を見出してきた。そこで、炎症性サイトカインの遺伝子座におけるエピジェネティックな変化におけるLASCの役割をRestriction Enzyme Accessibility Assayを用いて検証した。マウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞にコントロールまたはLASC特異的なshRNAを発現するレトロウィルスを感染させ、LASCノックダウン細

胞を得た。これらの細胞を 100ng/ml LPS で経時的に刺激し、生化学的な手法により核画分を調整した。得られた核画分を制限酵素 EcoNI で処理し、断片化された DNA を IL-6 または TNF 特異的なプローブを用いてサザンブロッティングを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) LASC ノックアウトマウスの作製

C57BL/6 マウスの受精卵に Cas9 をコードする RNA および LASC 特異的 sgRNA を ssDNA とともにマイクロインジェクションを行ったところ複数の産仔が得られ、その中にポリ A 鎖負荷配列である SV40 late poly A 配列がノックインされたマウスが得られた(図1)。LASC ノックアウトマウスまたは野生型マウスより得られたマクロファージを LPS で刺激したところ LASC ノックアウトマウスでは LASC の発現が見られないことを確認した(図2)。

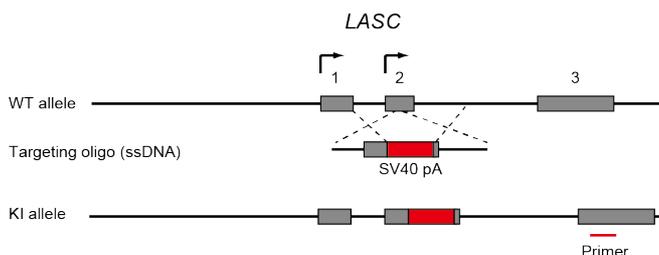


図1 ポリ A 鎖負荷配列の挿入による LASC ノックアウトマウスの作製

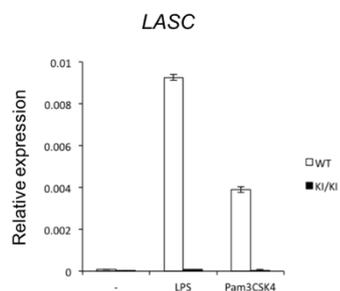


図2 LASC ノックアウトマウスにおける LASC の発現

##### (2) マウス敗血症モデル

野生型および LASC ノックアウトマウスに LPS を投与したところ野生型マウスが投与後 24 時間以内にすべて死亡するのに対して、LASC ノックアウトマウスは高い生存率を示した(図3)。

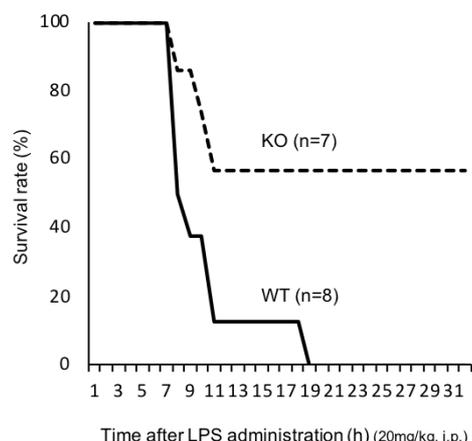


図3 LASC ノックアウトマウスはエンドトキシンショックにおいて高い生存率を示す

##### (3) LASC による炎症性サイトカインの発現制御機構

Restriction Enzyme Accessibility Assay により IL-6 および TNF 遺伝子座のエピジェネティックな変化を検証した。この手法を用いることで LPS 刺激で誘導される炎症性サイトカインの転写制御領域におけるクロマチン構造の状態を検証することが可能である。コントロールおよび LASC ノックアウト細胞において IL-6 および TNF の遺伝子座のクロマチン構造に差は見ら

れなかった(図4)。以上のことから LASC は炎症性サイトカインの発現制御において炎症性サイトカイン遺伝子座のエピジェネティックな制御には寄与しないが、転写因子 NF- $\kappa$ B のプロモーター領域への動員に直接関わる可能性が示唆された。

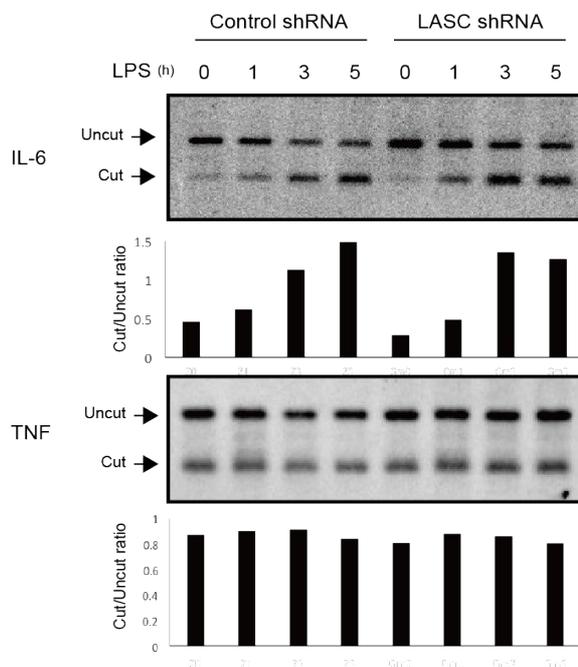


図4 Restriction Enzyme Accessibility Assay による炎症性サイトカイン遺伝子座のクロマチン構造の解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- 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.* 2018 2:3483-3491 (#, equal contribution)
- Mochizuki Y, Chiba T, Kataoka K, Yamashita S, Sato T, Kato T, Takahashi K, Miyamoto T, Kitazawa M, Hattā T, Natsume T, Takai S, Asahara H Combinatorial CRISPR/Cas9-approach to elucidate a far-upstream enhancer complex for tissue-specific Sox9 expression. *Dev Cell* 46, 794–806, September 24, 2018
- Chiba T, Ito Y, Asahara H. Post-transcriptional gene regulation by microRNA and RNA-binding protein. *RNA and Transcription* 2(3) 16-23 2016
- 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 reproduction. *PLoS Genetics.* 2017 Jan 23;13(1):e1006578.
- 千葉 朋希, 浅原 弘嗣, ゲノム編集における技術革新、遺伝子医学 Vol.9 No.1
- 千葉 朋希, 浅原 弘嗣, CRISPR/Cas9 によるゲノム編集 実験医学 Vol.33 No.22 (増刊) 200 (3396) ノンコーディング RNA テキストブック

〔学会発表〕(計9件)

- 寺尾 梨沙, 千葉 朋希, 浅原 弘嗣, 長鎖非コード RNA による炎症性サイトカインの発現制御、第5回ベーシックリサーチカンファレンス(日本リウマチ学会) 2018年11月2日-3日 秋葉原
- 寺尾 梨沙, 千葉 朋希, 浅原 弘嗣, Long non-coding RNA による炎症性サイトカインの発現制御、第20回日本RNA学会年会 2018年7月9日-11日 大阪

3. 千葉 朋希、浅原 弘嗣、長鎖非コード RNA による炎症性サイトカインの発現制御、第 4 回日本骨免疫学会、2018 年 6 月 24(日) - 26 日(火) (24 日) 沖縄県名護市 (万国津梁館)
4. 千葉 朋希、浅原 弘嗣、長鎖非コード RNA による炎症性サイトカインの発現制御 第 8 回 Orthopedic Research Club 2017 年 11 月 3 日-4 日 かずさアカデミアパーク
5. 千葉 朋希、浅原 弘嗣、長鎖非コード RNA による炎症性サイトカインの発現制御 第 4 回 ベーシックリサーチカンファレンス (日本リウマチ学会) 2017 年 10 月 13 日-14 日 秋葉原
6. Chiba T, Asahara H. Regulation of inflammatory cytokine expression by long non-coding RNA LASC 第 19 回日本 RNA 学会年会 2017 年 7 月 19 日-21 日 富山
7. Chiba T, Asahara H. Regulation of inflammatory cytokine expression by long non-coding RNA LASC 43th Naito Conference 2017 年 6 月 27 日-30 日 札幌
8. 千葉朋希、浅原弘嗣. コドン置換型 TALEN ライブラリーによる発現の安定化及びエフェクター機能の向上. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 横浜
9. 千葉朋希、浅原弘嗣. コドン置換型 TALEN ライブラリーによる発現の安定化及びエフェクター機能の向上. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015.12.02 神戸

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：浅原 弘嗣

ローマ字氏名：Hiroshi ASAHARA

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。