

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11060

研究課題名(和文) 胎仔マウス唾液腺の組織間をまたいで展開するRNAネットワークの探索

研究課題名(英文) Exploration of RNA network between tissues in fetal mouse salivary gland

研究代表者

柏俣 正典 (Kashimata, Masanori)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：30152630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胎仔マウス唾液腺は、上皮と間葉との相互作用によりその発生が進行する。これまでの研究により、マイクロRNAが間葉から上皮へと輸送されるシグナル分子であることが示唆された。唾液腺の間葉からマイクロRNAが輸送された場合、輸送先の上皮では複数のRNAが標的となりうる。そこでは何らかのRNAネットワークが形成されると仮定でき、その存在を実証することを目的とした。組織間のマイクロRNA輸送を抑制したところ、27種類のRNAの発現上昇がみられ、これらはRNAネットワークの一端を構成していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mouse salivary glands at embryonic day 13 (E13) have been a model organ to study epithelial-mesenchymal interactions. We reported that mesenchymal-derived microRNAs (miRNAs) in the salivary gland are transported to the epithelium. The miRNAs transported from the mesenchyme could target multiple RNAs such as mRNA and long non-coding RNA in the epithelium. Therefore it is hypothesized that those RNAs build an RNA network and influence the expression level of each other by competing for miRNA binding. To explore the RNA network between tissues during salivary gland organogenesis, miRNA transport from the mesenchyme to the epithelium was inhibited and then transcripts in the epithelium was analyzed with RNA-seq. The data showed up-regulation of 27 transcripts expression levels by inhibition of miRNA transport, suggested that these miRNAs and transcripts comprise an RNA network between tissues in E13 mouse salivary glands.

研究分野：薬理学、発生学

キーワード：マイクロRNA 唾液腺 上皮間葉相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質の鋳型とならないノンコーディング RNA が近年注目を集めている。短鎖ノンコーディング RNA として、mRNA と相補的に結合しその発現を抑制するマイクロ RNA が知られている。マイクロ RNA とその「受け手」である mRNA は、あたかもタンパク質におけるリガンドとその受容体のような関係と言える (図)。

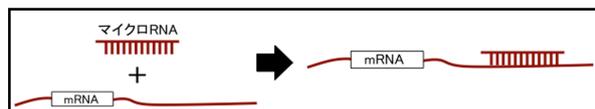


図. mRNA はマイクロ RNA の「受け手」

近年、mRNA 以外にも、長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) がマイクロ RNA の「受け手」となることがわかってきた。よって、マイクロ RNA を巡って「受け手」の RNA 間による競合が生じる。つまり、mRNA や lncRNA がマイクロ RNA の「受け手」となることで、RNA の発現レベルを調節しうることを示唆された。この現象は competing endogenous RNA ネットワーク (ceRNA ネットワーク) と呼ばれている (Salmena et al., Cell, 2011)。

(2) 胎生期 13 日齢 (E13) のマウス唾液腺は主に上皮と間葉から構成され、それらの相互作用により発生が進行する。上皮と間葉は分離することができ、上皮は単独で培養が可能である。

従来、上皮と間葉の相互作用において研究されてきた生体分子は主にタンパク質だった。しかし、私たちは間葉や上皮のマイクロ RNA が唾液腺の発生を調節する事を明らかにし (Hayashi, et al. Dev. Biol., 2011; Rebutini, Hayashi et al., Development, 2012)、それ以降、核酸のマイクロ RNA による上皮と間葉の相互作用に着目している。その結果、以下のことを明らかにした。

- ① 胎仔マウス唾液腺 (E13) が exosomes (細胞外小胞) を産生すること。
- ② exosomes が間葉から上皮へ輸送されていること。
- ③ その exosomes 中にマイクロ RNA が内包されていること。
- ④ 上皮からマイクロ RNA が検出されるにも関わらず、そのマイクロ RNA の前駆体が上皮から検出されないこと。

これらの結果は、胎仔マウス唾液腺の間葉で作られたマイクロ RNA が、あたかもリガンドのように、隣接する上皮へと輸送されることを示している (Hayashi et al., Dev. Cell, 2017)。

2. 研究の目的

間葉から上皮へマイクロ RNA が輸送される現象は、異なる組織間をまたいで RNA が相互作用することを示唆している。我々は、マイクロ RNA 輸送先の上皮で、複数の RNA がマイクロ RNA の「受け手」となることで構築される ceRNA ネットワークが存在する、と仮説をたてた。本研究計画では、間葉から上皮へとマイクロ RNA が輸送される胎仔マウス唾液腺をモデル器官として用い、異なる組織間をまたぐ ceRNA ネットワークの存在を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

胎仔マウス唾液腺の間葉から上皮へは exosomes を介してマイクロ RNA が輸送されている。そこで、E13 マウス唾液腺を brefeldin A (exosomes の分泌阻害剤として用いられている: Mittelbrunn et al., Nat. Commun., 2012) にて処理した。その後、ディスペルゼーションによる処理を施し、間葉と上皮を顕微鏡下で分離した。これまでの実験でマイクロ RNA 133b-3p (miR-133b-3p) は間葉で発現し上皮に輸送されるが、上皮では発現していないことが明らかになっている。そこで、分離した上皮から RNA を調整し、マイクロ RNA 133b-3p (miR-133b-3p) に対する定量 PCR を実施することで、exosomes 輸送が阻害されているかどうかを調べた。こうして用意した上皮由来の RNA を用いて、RNA-seq を実施した。得られたアウトプットを用いて転写産物の網羅的解析を実施した。コントロールと比べて、発現レベルが上昇した転写産物 (mRNA、lncRNA) のうち、exosomes 由来のマイクロ RNA の標的となりうる種類、つまり ceRNA ネットワークを構成しうる RNA をリストアップした。

4. 研究成果

本研究期間中に、胎仔マウス唾液腺の間葉から上皮へと、マイクロ RNA が輸送されていることを報告した (Hayashi et al., Dev. Cell, 2017)。このとき、マイクロ RNA は細胞外小胞の exosomes に内包されていることが示唆された。そこで exosomes の分泌阻害剤として用いられている brefeldin A で E13 胎仔マウス唾液腺を処理し、その後分離した上皮において、間葉から輸送される miR-133b-3p の発現レベル (存在レベルとも言える) を調べた。その結果、コントロールに比べて miR-133b-3p が有意に低下していた。このことは、brefeldin A 処理により、間葉から上皮への exosomes を介したマイクロ RNA 輸送が抑制されたことが示唆している。したがって、この brefeldin A を処理した上皮では、間葉由来のマイクロ RNA により負の制御を受けている RNA 群が、その発現レベルを上昇させている可能性が考えられた。

次に exosomes 輸送を阻害した上皮について、その転写産物を網羅的に解析するため、RNA-seq を実施した。brefeldin A を処理した上皮とそのコントロール群から total RNA を抽出し、その純度と RNA integrity number (RIN) を調べた。その結果、純度の指標である 260/280 はともに 1.97、RNA 分解度の指標である RIN はそれぞれ 9.7 と 9.5 であった。これらの値は、抽出した RNA が以降の解析に十分な品質であることを示していた。

これら上皮の RNA を試料とし、TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (イルミナ社) によりシーケンス用ライブラリの調整を実施した (本研究計画では lncRNA のうち、poly-A tail を有する種類を対象としている)。イルミナ社の HiSeq により、2000 万リードペア (100 塩基/リード、Paired end) を取得した。これらのリードについて、TopHat を用いて参照ゲノム (mm10) にマッピングし、Cufflinks による遺伝子発現レベルの解析、Cuffdiff を用いて発現変動遺伝子の検出を実施した。

brefeldin A を処理した上皮では、間葉からのマイクロ RNA 輸送が抑制されているため、それらの標的遺伝子 (mRNA、lncRNA) の発現レベルが上昇していることが期待された。そこで、コントロールに比べて発現レベルが 2 倍以上高くなった転写産物 (FPKM=3 以上、鎖長 200 塩基以上の RNA を対象) を調べたところ、27 種類の RNA が該当した (表)。そのうち、4 種類の RNA が lncRNA だった。

これまでの実験により、間葉からの exosomes から 81 種類のマイクロ RNA が、qPCR を基盤とするアレイ解析により検出されている (Hayashi et al., Dev. Cell, 2017)。81 種類のマイクロ RNA のうち、Ct 値が 30 以下を示したマイクロ RNA は 30 種類あった。これらは exosomes に比較的多く内包されているマイクロ RNA と考えられる。そこで、この 30 種類のマイクロ RNA が、表に示された RNA を標的としうるかを、3' 非翻訳領域に基づいた標的遺伝子予測ツールである TargetScan (Agarwal et al., eLife, 2015) を使って調べた (表)。

その結果、複数のマイクロ RNA により標的とされうる RNA が 11 種類、1 種類のマイクロ RNA により標的とされうる RNA が 2 種類あった (表)。上皮中のこれら 13 種類の RNA は、間葉から exosomes を介して輸送されるマイクロ RNA により制御を受けている可能性がある。残りの 14 種類の RNA は、翻訳領域にマイクロ RNA 結合領域がある、もしくは brefeldin A 処理による影響などで、発現レベルが上昇していることが考えられた。

本研究期間においては、異なる組織間をまたいだ ceRNA ネットワークの存在の実証には至らなかった。しかし、今後の検証の基盤となるデータが得られたため、研究期間終了後においても、ceRNA ネットワークを継続して探索していく予定である。今後は、表に示した mRNA や lncRNA の発現レベルを人為的に制御し、その際にマイクロ RNA が標的とする転写産物の抑制の度合いがどう変化するか、さらには標的そのものが変わるのか、といった点に着目したい。

表. 間葉からのマイクロ RNA 輸送を阻害した際に、上皮で発現レベルが上昇した遺伝子. Exosomes に内包されているマイクロ RNA のうち、いくつかの種類によって標的とされうるかも示した。

Gene symbol	Number of miRNA predicted to target each transcript
2900052L18Rik	0
<i>Adamts15</i>	2
<i>Alpl</i>	1
<i>Atg16l2</i>	3
BC018473	0
<i>Cc120</i>	0
<i>Chac1</i>	0
<i>Chst1</i>	3
<i>Chst9</i>	0
<i>Clu</i>	0
<i>Cyp1b1</i>	2
<i>Fam84a</i>	7
<i>Fbx12</i>	3
<i>Ggt5</i>	2
Gm13669	0
Gm21769	0
<i>Hist1h2a1</i>	0
<i>Igf1bp5</i>	5
<i>Mfap4</i>	0
<i>Mmp2</i>	1
<i>Neat1</i>	0
<i>Parm1</i>	3
<i>Pmpa1</i>	4
<i>S100a6</i>	0
<i>Tfcp2l1</i>	3
<i>Tspo</i>	0
<i>Wfdc18</i>	0

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 4 件)

1. Masanori Kashimata and Toru Hayashi. Regulatory mechanisms of branching morphogenesis in mouse submandibular gland rudiments. *Japanese Dental Science Review*. 54, 2-7, 2018. DOI: 10.1016/j.jdsr.2017.06.002

2. Toru Hayashi and Matthew P. Hoffman. Exosomal microRNA communication between tissues during organogenesis. *RNA Biology*. 14, 1683-1689, 2017. DOI: 10.1080/15476286.2017.1361098

3. Toru Hayashi, Isabelle M.A. Lombaert, Belinda R. Hauser, Vaishali N. Patel, and Matthew P. Hoffman. Exosomal MicroRNA Transport from Salivary Mesenchyme Regulates Epithelial Progenitor Expansion during Organogenesis. *Developmental Cell*. 40, 95-103 2017. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.12.001

4. Kenji Mizukoshi, Noriko Koyama, Toru Hayashi, Ligiang Zheng, Sachiko Matsuura, Masanori Kashimata. Shh/Ptch and EGF/ErbB cooperatively regulate branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands. *Developmental Biology*. 412, 278-287, 2016. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.02.018

[学会発表] (計 9 件)

1. 林徹、胎仔マウス顎下腺の発生における脱メチル化制御機構、第 123 回日本解剖学会総会・学術集会、2018

2. 林徹、胎仔マウス顎下腺の発生における脱メチル化制御機構、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017

3. Toru Hayashi and Masanori Kashimata. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in Fetal Submandibular Gland Development. Gordon Research Conference Salivary Glands & Exocrine Biology. 2017

4. Toru Hayashi and Masanori Kashimata. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in Fetal Submandibular Gland Development. The 4th International Symposium on Salivary

Glands in Honor of Niels Stensen. 2016

5. 林徹、RNA interactions between tissues in fetal mouse salivary glands、第 58 回歯科基礎医学会学術大会 The 30th Salivary Research Colloquium "Salivary glands: an unique and valuable experimental system"、2016

6. 足立圭亮、胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成における integrin beta1 subunit の役割、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016

7. 林徹、胎仔マウス顎下腺における 5-メチル化シトシンと 5-ヒドロキシメチル化シトシンのダイナミクス、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、2015

8. 水越堅詞、Shh は EGF/ErbB カスケードを介して分枝形態形成を調節している、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、2015

9. 赤井崇浩、胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成におけるインテグリン $\alpha 5$ サブユニットの役割、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、2015

[その他]

ホームページ等

<http://scw.asahi-u.ac.jp/~pharmaco/>

<https://researchmap.jp/payasi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏俣 正典 (Masanori Kashimata)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：30152630

(2) 研究分担者

林 徹 (Toru Hayashi)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：10454266