

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08984

研究課題名(和文) エピゲノム制御に関わる疾患アンチセンスRNAの同定とその定量検査法の開発

研究課題名(英文) Development of RT-PCR methods detecting disease-associated antisense RNA

研究代表者

山中 康成 (YAMANAKA, YASUNARI)

国立研究開発法人理化学研究所・科技ハブ産連本部・客員主管研究員

研究者番号：90402859

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)：クロマチン関連蛋白質HMGB2 蛋白質と結合するアンチセンスRNAを同定し、疾患アンチセンスRNAを同定したのち、同RNA 定量の検査試薬を作製するなかで、HMGB2 蛋白質と結合するアンチセンスRNA の候補を挙げたが、疾患アンチセンスRNA を同定するにはいたらなかった。測定系の開発のため国産プローブを用いて疾患関連遺伝子を定量PCR法で測定したところ、既存の米国のTaqManプローブと同等の感度と特異度を得ることができた (doi: 10.1371/journal.pone.0202429)。これは、国産技術を用いた研究開発結果であり、遺伝子関連検査の向上に寄与すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国産プローブを用いた定量PCR法は、既存の米国のTaqManプローブと同等の感度と特異度を得ることができた。これは我が国の遺伝子関連検査の向上に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNAs(lncRNAs) have widespread roles in regulating gene expression. Very few lncRNAs that regulate disease progression, are identified to associate with Hmgb2. Quantitative RT-PCR using original probe can successfully detect lncRNAs and can be expected to improve laboratory medicine.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：アンチセンスRNA

### 1. 研究開始当初の背景

シーケンサー技術の進歩とともに、蛋白質をコードしない RNA がヒトのゲノムから大量に転写されることが明らかになった。このような RNA のうち、アンチセンス RNA は、蛋白質をコードするメッセンジャー (センス) RNA とゲノム上で対立する相補鎖から転写され、センス RNA と一部のエクソンを逆向きに共有する。アンチセンス RNA は、センス RNA の発現や安定性を、正あるいは負に調節する。これまでにアンチセンス RNA は、細胞の多能性や分化、細胞周期の調節などさまざまな過程を制御し、さらに、多くのヒト疾患の病態にかかわることが明らかになってきた (Wahlestedt C, Nat Rev Drug Discov 2013)。アルツハイマー病(AD) では、アンチセンス RNA について次のような知見が得られている。

(1) AD の脳では  $\beta$ -site APP Cleaving Enzyme (BACE) 1 の量が増加し、アミロイド・ベータが蓄積している。BACE1 のアンチセンス RNA (BACE1-AS)は、AD の脳で高く発現し、BACE1 の発現を上げる (Faghihi MA et al. Nat Med 2008)。

(2) AD の脳では Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) の量が減少している。BDNF のアンチセンス RNA (BDNF-AS)は、ヒストン修飾酵素 EZH2 を動員して BDNF の発現を下げる (Modarresi F et al. Nat Biotechnol 2012)。

(3) AD の脳では Low-density lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) 1 の量が減少し、アミロイド・ベータのクリアランスが低下している。申請者は、LRP1 のアンチセンス RNA (LRP1-AS)がアルツハイマー病の脳で高く発現し、クロマチン関連蛋白質の High Mobility Group Box (HMGB) 2 の活性を調節することで、LRP1 の発現を下げることを見出した (Yamanaka Y et al. Cell Reports 2015)。

### 2. 研究の目的

ヒト疾患においてアンチセンス RNA が病態の形成や進行に果たしている役割について不明な点が多く、特に、アンチセンス RNA の発現量と、疾患の病期や重症度との間で相関があるのかいなかについて理解がすすんでいない。今後はアンチセンス RNA が果たすエピゲノム制御の機序に注目して疾患研究が進み、さらに、患者検体を対象とするアンチセンス RNA の発現定量が病態把握に活用されて、臨床応用が進むと考えられる。これまでに次のような予備的な研究開発の結果を得ている。

(1)新たに同定した HMGB2 が結合する RNA の長さは、およそ 500 塩基から 1,000 塩基に多く分布する (未発表)。ヒトのメッセンジャーRNA の平均的な長さは 1.5 から 2.0 キロ塩基なので、これらはアンチセンス RNA を含むと考えられる。

(2) HMGB2 は、アンチセンス RNA とセンス RNA が逆向きに共有するエクソンに特異的に結合する (未発表)。これは HMGB2 が RNA の部分的かつ一過的な二重鎖を認識し、アンチセンス RNA に結合することを示唆する。

(3)安価かつ正確な RNA 定量法が遺伝子関連検査に求められるなか、定量 RT-PCR に利用可能な国産蛍光プローブ (Eprobe; Hanami T et al. PLoS One 2013) は、米国 TaqMan プローブと同等あるいはそれ以上の感度と特異度をもつ (未発表)。

### 3. 研究の方法

(1)クロマチン関連蛋白質 HMGB2 蛋白質と結合するアンチセンス RNA を同定する。結合する RNA を網羅的に同定するために、つぎの異なる手法を用いて解析する。

Cross-linking immunoprecipitation (CLIP)を用いた解析を行う。アンチセンス RNA の LRP1-AS を用いたクロマトグラフィーで新規に同定された HMGB2 は、ヒト組織に偏在する。HMGB2 に結合する RNA を同定するため、ヒト細胞株 (HEK293, 皮質神経細胞 HCN-1a)において、HMGB2 抗体(コントロールとして正常 IgG)をもちいて CLIP を行い、沈降物と Input について RNA-seq を行う。この CLIP では、UV で細胞内の蛋白質と RNA をクロスリンクしたのち、RNase で処理すると、蛋白質と直接結合した RNA の部分は分解されないことから、蛋白質に結合する RNA を同定することができる。以下は予備検討の結果である。

RNA immunoprecipitation (RIP)を用いた解析を行う。CLIP で得られる RNA の収量が極めて少なく、RNA-seq に供することができない事態も考えられる。そこで、ヒト細胞株において、HMGB2 抗体と正常 IgG をもちいて RIP を行い、沈降物と Input について RNA-seq を行う。以下は予備検討の結果である。

RNA のなかからアンチセンス RNA を同定する。RNA-seq のデータから、HMGB2 抗体 (あるいは正常 IgG) で沈降したリードと Input のリードの比率を求め、Exact test のうち FDR を算出し、HMGB2 蛋白質・抗体の複合体に特異的に結合するリードを同定する。次に、正常 IgG に比して HMGB2 抗体で高濃縮されたリードを、HMGB2 蛋白質だけに特異的に結合するリードと判断する。さらに、そのリードを参照ヒトゲノム (UCSC Genome Browser) に

マップし、このうち mRNA のエクソンと逆向きに位置した RNA をアンチセンス RNA と判断する。データベース (antiCODE, NATsDB) も参照する。

アンチセンス RNA が HMGB2 に相互に結合することを確認する。アンチセンス RNA を固定したクロマトグラフィーを作製し、細胞抽出液から HMGB2 が捕捉されることを調べ、それらの結合を確認する。HMGB2 は、アンチセンス RNA とセンス RNA が逆向きに共有するエクソンに特異的に結合するので (未発表)、そのエクソンに位置するように合成オリゴヌクレオチドを作成し、合成オリゴヌクレオチド存在下では GST 融合 HMGB2 蛋白質とアンチセンス RNA の結合が阻害されることを調べる。

(2) アンチセンス RNA と対をなすセンス RNA によってコードされる蛋白質が、病態にかかわるヒト疾患を探索し、疾患アンチセンス RNA を同定する。そのセンス RNA がコードする蛋白質について、OMIM データベースを参照し、病態に関わるようなヒト疾患を探索する。

(3) 疾患アンチセンス RNA の遺伝子発現の調節機能を解析する。ヒト細胞株 (HEK293, HCN-1a) でアンチセンス RNA をノックダウンあるいは過剰発現し、アンチセンス RNA がセンス RNA の発現量に与える影響を定量 RT-PCR で調べる。

(4) 疾患アンチセンス RNA 定量の検査試薬を作製し、臨床研究を準備する。センス RNA とアンチセンス RNA の発現量やそれらの比率を正確に測定するため、研究用試薬を作製する。国産蛍光プローブ (Eprobe) は、米国 TaqMan プローブと同等あるいはそれ以上の感度と特異度をもつ (未発表)。

#### 4. 研究成果

クロマチン関連蛋白質 HMGB2 蛋白質と結合するアンチセンス RNA を同定し、疾患アンチセンス RNA を同定したのち、同 RNA 定量の検査試薬を作製するなかで、HMGB2 蛋白質と結合するアンチセンス RNA の候補を挙げたが、疾患アンチセンス RNA を同定するにはいたらなかった。測定系の開発のため国産プローブを用いて疾患関連遺伝子を定量 PCR 法で測定したところ、既存の米国の TaqMan プローブと同等の感度と特異度を得ることができた (doi: 10.1371/journal.pone.0202429)。これは、国産技術を用いた研究開発結果であり、遺伝子関連検査の向上に寄与すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuchiya K, Tabe Y, Ai T, Ohkawa T, Usui K, Yuri M, Misawa S, Morishita S, Takaku T, Kakimoto A, Yang H, Matsushita H, Hanami T, Yamanaka Y, Okuzawa A, Horii T, Hayashizaki Y, Ohsaka A	4. 巻 13(10)
2. 論文標題 Eprobe mediated RT-qPCR for the detection of leukemia-associated fusion genes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0202429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0202429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takamochi K, et al.	4. 巻 16
2. 論文標題 Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 760-769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabé Y, et al.	4. 巻 77
2. 論文標題 Bone Marrow Adipocytes Facilitate Fatty Acid Oxidation Activating AMPK and a Transcriptional Network Supporting Survival of Acute Monocytic Leukemia Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 1453-1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----