

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860151

研究課題名(和文) 骨格筋細胞の分化におけるノンコーディングRNAの機能解析と治療への応用

研究課題名(英文) The functional analysis of novel non-coding RNAs in the differentiation of myogenic cells

研究代表者

常陸 圭介 (Hitachi, Keisuke)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：10508469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、我々が同定したノンコーディングRNA(miR-191とMyog pancRNA)が骨格筋細胞の分化に必須である事が明らかとなった。Myog pancRNAによる筋分化制御には、RNA結合タンパク質であるDdx17やhnRNPKとの相互作用が重要であり、これらの相互作用を阻害した場合に正常な筋分化が阻害される事が観察された。また、Myog pancRNAは神経原性の筋萎縮時にも骨格筋で発現が向上する事が明らかとなったため、今後Myog pancRNAを標的とする事で、神経原性筋萎縮等の筋疾患に対する新たな治療法の開発が可能である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified two novel non-coding RNAs (miR-191 and Myog pancRNA) involved in the regulation of myogenic differentiation. We found that miR-191 is essential for the differentiation of myogenic cell line (C2C12 cells). In addition to the miRNA, we also revealed that Myog pancRNA, expressed from the promoter region of myogenin gene, regulates the differentiation of C2C12 cells via the interaction with Ddx17 and hnRNPK proteins. Interestingly, knockdown of Ddx17 inhibited the C2C12 myogenic differentiation. On the other hand, knockdown of hnRNPK promoted the differentiation of C2C12 cells. We also found that the expression of Myog pancRNA is largely increased in atrophic skeletal muscle induced by denervation. Taken together, our results indicate that non-coding RNAs are new regulator of the myogenic cell differentiation, and suggest that Myog pancRNA is a new therapeutic target to improve skeletal muscle atrophy caused by denervation.

研究分野：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：ノンコーディングRNA 細胞分化 RNA結合タンパク質 筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

細胞は様々な刺激に応答して分化し、多様な器官や臓器を形成している。この細胞分化に、タンパク質をコードしない RNA 分子である non-coding RNA が関与している事が報告され注目を集めている。例えば、約 22 塩基の小さな non-coding RNA である miRNA は、細胞分化のみならず発生・増殖等の様々な生命現象において重要な役割を果たしている。また近年、遺伝子のプロモーター領域近傍から pancRNA (promoter associated non-coding RNA) と呼ばれる新しいタイプの long non-coding RNA が作り出され、近傍に存在する遺伝子の発現制御に関わる事が報告された (Tomikawa et al. JBC. 2011)。しかしながら、non-coding RNA がどのようにして種々の細胞分化を制御しているのか、その分子機構の詳細は未だ明らかではない。

骨格筋の細胞は、古くから細胞分化のモデル系として利用されてきた。我々は筋芽細胞株を用いた解析から、骨格筋細胞の分化 (筋分化) に伴い発現が著しく増加する 5 種類の新規 miRNA を同定する事に成功している。また、筋分化制御遺伝子である *myogenin* のプロモーター領域から発現する新規 non-coding RNA を世界で初めて見つけ出し、Myog pancRNA と命名した。Myog pancRNA の発現もまた筋分化に伴い大きく増加していた。よって、我々が同定した新規 miRNA や Myog pancRNA が、筋分化の制御において重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 我々が同定した新規 non-coding RNAs (miRNA と pancRNA) の筋分化における機能を明らかにする事で、non-coding RNA を介した細胞分化制御機構の解明を試みる。

(2) Non-coding RNA を利用した、皮膚等の細胞から骨格筋細胞を作り出す (ダイレクトリプログラミング) 手法の開発や、筋疾患に対する新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) miRNA による筋分化制御機構の解析

筋芽細胞株 C2C12 の筋分化誘導時に、miRNA Inhibitor を利用して miRNA の機能を阻害する事で、我々が同定した新規 miRNA が筋分化制御に関与するか解析した。

(2) Myog pancRNA の構造の決定と機能阻害

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により Myog pancRNA の全長配列を決定し、得られた塩基配列を利用して siRNA と ASO (Antisense Oligonucleotide) を設計し、Myog pancRNA の機能阻害を試みた。

(3) Myog pancRNA 結合因子の同定

In vitro 合成した Myog pancRNA をベイトとして利用し、骨格筋細胞から Myog pancRNA

と相互作用するタンパク質を単離し、質量分析により同定した。また、タンパク質との結合に必要な Myog pancRNA 上の領域を RNA Pull-down により決定した。

(4) Non-coding RNA の医療応用

我々が同定した新規 miRNA や pancRNA を利用して、間葉系細胞株 C3H10T1/2 を高効率で骨格筋細胞に分化誘導する事が可能な条件の探索を行った。また、神経原性の骨格筋萎縮時に、Myog pancRNA の発現がどのように変化するかリアルタイム PCR により検出した。

4. 研究成果

(1) miRNA による筋分化制御機構の解析

我々が同定した筋分化に伴い発現が増加する miRNA (miR-22、miR-128、miR-152、miR-191、miR-99a) が骨格筋細胞の分化制御に関与しているかを明らかにするために、筋芽細胞株 C2C12 を利用して miRNA の機能阻害実験を行った。miR-128 に関しては骨格筋との関係性が他のグループによって報告されてしまったため (Motohashi et al. JCS. 2013)、残りの miRNA の機能について解析を行った。その結果、miR-191 の機能阻害により、筋分化マーカーである Myogenin と MHC タンパク質の発現低下が観察され、miR-191 が筋分化に必須である事が明らかとなった。

次に、miR-191 による筋分化制御機構の詳細を明らかにするために、miR-191 の標的となる遺伝子を TargetScan により予測した。miR-191 の発現は筋分化に伴って増加するため、筋分化に伴い発現が低下する遺伝子が miR-191 の有力な標的候補であると考えられた。そこで、TargetScan で予測された miR-191 の標的候補遺伝子の中で、筋分化に伴い発現が減少する 5 種類の遺伝子を抽出した。miR-191 の機能阻害時にこれらの遺伝子の発現をリアルタイム PCR によって検出した結果、有意な発現の増加が認められた。今後はタンパク質レベルで標的候補遺伝子の発現増加を確認し、miR-191 の真の標的因子を同定する予定である。

(2) Myog pancRNA の構造の決定と機能阻害

RACE 法により、約 1200 nt におよぶ Myog pancRNA の全長配列を決定した。決定した配列情報をもとに Myog pancRNA をクローニングし in vitro 翻訳する事で、Myog pancRNA がタンパク質をコードしない non-coding RNA である事を実験的に証明した。さらに、配列をもとに siRNA と ASO を設計し、C2C12 細胞の筋分化時に Myog pancRNA の機能阻害を行った。その結果、Myogenin と MHC の発現低下が確認され、Myog pancRNA が C2C12 細胞の筋分化に必須である事が明らかとなった。

(3) Myog pancRNA 結合因子の同定

これまで報告されている long-non coding の多くは、タンパク質との相互作用を介して

機能する事が報告されている。そこで網羅的プロテオミクス手法を用いて、Myog pancRNA と結合するタンパク質の探索を試みた。Myog pancRNA は分化誘導後の筋管細胞の核で多く発現しているため、筋管細胞の核からタンパク質を抽出し、in vitro 合成した Myog pancRNA と混合する事で、Myog pancRNA と結合するタンパク質の同定を試みた。質量分析による解析の結果、Myog pancRNA と結合するタンパク質として、RNA 結合タンパク質である Ddx17 と hnRNPK を同定する事に成功した。また、これらのタンパク質に対する抗体を用いた RNA 免疫沈降により、骨格細胞内で Ddx17 と hnRNPK が内在性の Myog pancRNA と実際に結合している事を証明した。さらに、RNA Pull-down により、Myog pancRNA の 3' 側の領域が、Ddx17 や hnRNPK との結合に必要な領域である事を見出した。

機能阻害実験によって Myog pancRNA が mRNA レベルでの *myogenin* 遺伝子の発現調節に関与している事が示唆された。そこで次に、Ddx17 や hnRNPK との結合が Myog pancRNA による *myogenin* 遺伝子の発現調節に必要な事を明らかにするために、siRNA を用いて Ddx17 と hnRNPK の機能阻害を行った。その結果、Ddx17 の機能阻害により *myogenin* 遺伝子の発現が低下し、C2C12 細胞の筋分化が阻害された。一方、hnRNPK の機能阻害では *myogenin* 遺伝子の発現向上が認められ、筋分化が促進する事が確認された。また、*myogenin* 遺伝子のプロモーター活性が、Ddx17 によって向上、hnRNPK によって抑制されることを確認した。さらに、Myog pancRNA 上の Ddx17 との結合に必要な領域を欠損させた場合に *myogenin* 遺伝子のプロモーター活性が低下する事が確認され、hnRNPK との結合領域を欠損させた場合には *myogenin* 遺伝子のプロモーター活性が向上する事が認められた。これらの結果から、Ddx17 は *myogenin* 遺伝子の発現に対して正に作用し、hnRNPK は負に作用する事が証明された。

(4) Non-coding RNA の医療応用

Non-coding RNA を利用して、皮膚等の細胞から骨格筋細胞をダイレクトリプログラミングにより作成する事を目指し、C3H10T1/2 細胞を用いて骨格筋細胞の誘導条件の検討を行った。C3H10T1/2 細胞は転写因子 MyoD の遺伝子導入により骨格筋細胞へと分化する。そこで、miRNA や pancRNA を遺伝子導入する事で、MyoD を用いずに C3H10T1/2 細胞から骨格筋細胞の分化誘導を行う事が可能か検討した。骨格筋細胞での高発現が認められる miR-1、miR-206、miR-133 と、我々が発見した miR-22、miR-128、miR-152、miR-191、miR-99a、Myog pancRNA をそれぞれ C3H10T1/2 細胞へと遺伝子導入したが、残念ながら骨格筋細胞へと分化誘導する事はできなかった。一方で、miRNA と MyoD を共に C3H10T1/2 細胞へと遺伝子導入した場合には、MyoD 単独の場

合よりも多数の筋管細胞が観察された。これらの結果から、non-coding RNA 単独では C3H10T1/2 細胞から骨格筋分化を誘導することはできないが、non-coding RNA には MyoD による筋分化誘導作用を促進する効果がある事が明らかとなった。

Myogenin 遺伝子は筋分化のみならず、神経原性の骨格筋萎縮時にも骨格筋での発現が増加する事が報告されている (Moresi et al. Cell. 2010)。そこで次に、Myog pancRNA の発現が神経原性筋萎縮時にどのように変化するか明らかにするため、座骨神経を切除したマウスの骨格筋で Myog pancRNA の発現がどのように変化するかリアルタイム PCR により検証した。その結果、座骨神経の切除によって前脛骨筋における Myog pancRNA の発現が大きく増加する事が確認され、Myog pancRNA が神経原性筋萎縮に関与している可能性が示唆された。今後は Myog pancRNA の機能を阻害する事で、神経切除によって引き起こされる骨格筋萎縮の緩和が可能か検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

(1) 常陸圭介、中谷直史、上住聡芳、土田邦博、マイオスタチンによる骨格筋量調節、The Lipid, 27(1)、2016、23-28、査読あり

(2) 土田邦博、上住聡芳、中谷直史、上田洋司、常陸圭介、サルコペニアにおける筋肉脂肪変性の関与、整形・災害外科、58(02)、2015、155-161、査読あり

(3) Keisuke Hitachi、Masashi Nakatani、Kunihiro Tsuchida、Myostatin signaling regulates Akt activity via the regulation of miR-486 expression、The International Journal of Biochemistry & Cell Biology、47、2014、93-103、査読あり、DOI: 10.1016/j.biocel.2013.12.003

(4) Keisuke Hitachi、Kunihiro Tsuchida、Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy、Frontiers in Physiology、4、2013、408、査読あり、DOI: 10.3389/fphys.2013.00408

〔学会発表〕(計6件)

(1) 常陸圭介、高崎昭彦、土田邦博、*Myogenin* 遺伝子のプロモーター領域から発現する新規 lncRNA の筋分化過程における機能解析、BMB2015、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫)

(2) 常陸圭介、土田邦博、転写調節領域由来 lncRNA による遺伝子発現活性化機構の解析、第47回藤田学園医学会、2015年10月1日、藤田保健衛生大学(愛知)

(3)常陸圭介、高崎昭彦、土田邦博、プロモーター領域から発現する Myog pancRNA はホストである *Myogenin* 遺伝子の発現に必要である、第7回日本 RNAi 研究会、2015年8月28日、グランドプリンスホテル広島(広島)

(4)常陸圭介、高崎昭彦、土田邦博、転写調節領域由来長鎖ノンコーディング RNA による筋分化制御機構の解析、第17回日本 RNA 学会、2015年7月16日、ホテルライフオーソ札幌(北海道)

(5)Keisuke Hitachi, Kunihiro Tsuchida, miR-486 is the intermediary molecule connecting myostatin signaling and the IGF-1/Akt/mTOR pathway in skeletal muscle, FASEB Science Research Conferences; Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells, July. 20-25, 2014, Steamboat Springs (CO, USA)

(6)常陸圭介、土田邦博、マイオスタチン欠損骨格筋肥大に関わる新規因子の探索と機能解析、第6回日本 RNAi 研究会 2014年8月29日、グランドプリンスホテル広島(広島)

〔図書〕(計1件)

(1)Kunihiro Tsuchida, Keisuke Hitachi, Masashi Nakatani, Akiyoshi Uezumi, Hiroshi Ageta, The role of myostatin and related factors in muscle hypertrophy and atrophy, Nova Science publishers, 2016

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

常陸 圭介 (HITACHI KEISUKE)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：10508469