

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460357

研究課題名(和文) Micro RNAによる組織形成と病態の制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of tissue morphogenesis and pathology by miR-199a/214

研究代表者

内島 泰信 (Uchijima, Yasunobu)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助手

研究者番号：90272426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Dnm3os KOマウスのDNAアレイ分析で発現量が大きく変化した遺伝子は少数であったが Nrip1はmiR-214の標的配列を持つと予想され表現型への関与が予想された。ETAR遺伝子座へのマイクロRNA KI動物の成体でドキシソルピシンによる心筋障害が顕著に抑制される機序には神経堤細胞(NCC)の関与が示唆されたので、胎仔の心臓からNCC由来細胞を得て単一細胞遺伝子発現解析を行った。その結果、NCC由来物には心臓平滑筋に寄与する集団とKit、Sox10、およびPax3を発現する集団が認められた。後者は心臓前駆細胞様であり、心筋傷害からの保護に寄与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In Dnm3os Knock-out mice, Nrip1 mRNA was increased and this gene was considered as a candidate for the target of miR-214. In vitro analysis suggested Nrip1 may contribute to the phenotypes such as decreased size observed in the KO mice. Doxorubicin (Dox) induced myocardial injury and this was suppressed by knocking in miR-199a/214 into the Ednra locus. Because the participation of neural crest cell (NCC) was suggested for the rescue mechanism of myocardium injury, NCC derived embryonic heart cells were collected and subjected to the single cell transcriptome analysis. In these cells, some expressed several smooth muscle cell markers, and a few cells expressed progenitor cell markers such as Kit, Sox10, and Pax3. The latter cells were expected to contribute to the protection from myocardium injury.

研究分野：分子形態形成

キーワード：micro RNA miR-199a miR-214 形態形成 心筋線維化

1. 研究開始当初の背景

Non-coding RNA (ncRNA)の生物学的重要性が示されつつあるが、筆者が所属する研究グループでncRNAであるmiR-199a、miR-214等をコードするDnm3os遺伝子をノックアウト(KO)したマウスを作製したところ体躯が小さく、骨格の形成不全や筋肉組織の低形成が認められ、組織形成にncRNAが関与することが明らかとなった。また、miR-199a/214は心肥大や虚血後の腎傷害モデルにおいて発現量が増加することが示されていた。そこで、心臓疾患におけるmiR-199aとmiR-214の関与する機序を明らかにするためにエンドセリンA受容体(Ednra)遺伝子座へ両miRNAをノックイン(KI)したところ、心筋傷害モデルで線維化の著名な抑制などの組織保護作用が確認され、miRNAが組織を保護する機序を明らかにすることで有益な情報が得られると期待された。



図1. Dnm3os KO マウスにおける骨格低形成

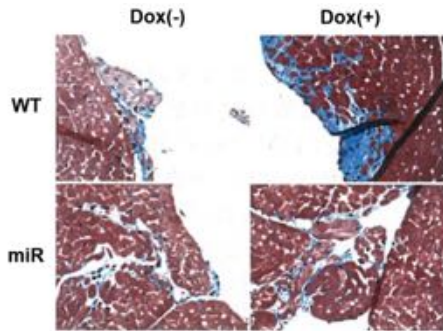


図2. 左室肉柱はEdnra遺伝子座へのmiRNAのKIによりDoxによる線維化(矢印)が著明に抑制された

2. 研究の目的

Dnm3os遺伝子にコードされるncRNAによって調節される組織の形成と機能分化の仕組みと、心疾患動物モデルにおけるmiRNAの保護作用の機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- ① Dnm3os KO動物へのmiR-199a/214 KIによるmicro RNAの表現型形成への寄与の明確化
- ② miR-199a/214の標的遺伝子および心筋傷害モデルにおけるmiR-199a/214の標的遺伝子のDNAマイクロアレイを用いた網羅的探索
- ③ 心筋障害モデルにおける線維化抑制機序の組織病理学的な分析による解明
- ④ 心臓発生と傷害抑制に寄与する神経堤

細胞の役割についてのFluidigm C1システムを用いた単一細胞遺伝子発現分析による解析

- ⑤ RMCE 遺伝子交換ノックインシステムを用いたマイクロRNAおよびそれらの標的遺伝子ノックイン動物の作製と表現型解析および組織保護との関与の証明

4. 研究成果

Dnm3os KO遺伝子は複数のmiRNAをコードするほか、Dnm3の発現にも影響を及ぼす恐れがあった。KOマウスで得られた表現型が本遺伝子がコードするmiRNAの発現低下に起因するか明確化するためにmiR-199aとmiR-214を発現する遺伝子をKOした遺伝子座に個別または両者同時にKIした動物を作製したところ、一方のみでは表現型は回復しないことが確認できた。また、miR-214のKIによる発現量は野生型(WT)のヘテロマウスと比べて半分程度の低い値であったため、Dnm3os遺伝子座にCre-ERT2をKIしたマウスと、ROSA26遺伝子座にmiR-199a/214をKIしたマウスを作製して交配して得られた産仔の解析を併行することを検討したが、miR-214が低い状態でも、両miRNAの同時KIによる発現によって椎骨の低形成の表現型が解消され(図3)、生後の体重も回復が認められた。miR-199aの単独KIでは表現型がレスキューされなかった知見と考え合わせると、両miRNAがKO動物における組織形成における表現型の寄与が確固となった。

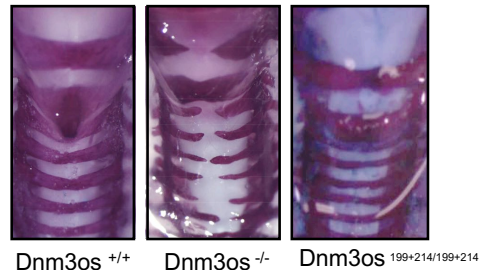


図3. miR KIによる椎骨低形成の回復

続いてDnm3os遺伝子座のmiR-199a/214の遺伝子KOマウスと野生型マウスを対象にDNAマイクロアレイを実施したところ、KOにより発現量が2倍以上増加ないし減少した遺伝子はNrip1(以下カッコ内は2を底とするlog ratio 1.2)、AK087671(1.1)、Ext1(1.0)、Dnm3os(-2.1)、Adipoq(-1.9)、Irs4(-1.2)と少数であった。miRNA標的予測アルゴリズムのmiRanda-mirSVR(<http://www.microrna.org/microrna/getGeneForm.do>)を用いて検索したところ、Nrip1がmiR-214の標的候補と予想された。Nrip1については骨粗鬆症患者の末梢血において1.7倍程度の発現量増加が認められるとの報告がなされている(参考文献①)。一方、Nrip1遺伝子のノックアウトマウスではホモ接合体は生後2割程度体躯が小さくなるもの

の、ヘテロ接合体では野生型と同じく体躯に関する表現型は認められない。よって、*Nrip1* の発現量の増加が *miR-214* 遺伝子 KO/KI で見られた骨形成制御に関与する可能性が示唆された。*Nrip1* の発現量を各遺伝子型の個体別に調べたが体重との相関に有意性は見いだせなかった。*Nrip1* については胎仔の間葉系細胞において発現が確認されている。そこでマウス胎仔より胚線維芽細胞を得て *miR-199a/214* を強制発現したところ *Dnm3os* KO マウス由来物では *Nrip1* mRNA 量の増加が、*miR-199a/214* KI マウス由来の細胞ではその増加の抑制が確認できた。以上の結果から、*Nrip1* が *Dnm3os* から生じる *miRNA* の標的となっていると考えられ、表現型に寄与している可能性が強く示唆された。*Nrip1* の関与を成体においても確認するために *Rosa26* 遺伝子座に *Nrip1* を組み込んだマウスを作成中であり、*Dnm3os-Cre* との交配で得られた産仔の表現型解析を行うことで知見の確からしさが確認できると期待している。

*Dnm3os* KO マウスで発現量が増えたその他の遺伝子については *miR-199a/214* の標的と予測されるものはなかったが、マイクロ RNA がシード配列をもとに数多くの mRNA 量やタンパク質量をわずかな強度で広範に減少させる機序が *miRNA-199a* で関与していると考えられた。

*Ednra* 遺伝子座への *miR-199a/214* の KI 動物成体(2-4 ヶ月齢)に 15 mg/kg ドキソルビシン(Dox)を投与して心筋障害を引き起こさせ、得られた組織を左室の Masson-trichrome 染色および Victoria blue-van Gieson 染色にて確認したところ、左室肉柱の心筋と冠動脈の外膜外組織の線維化が顕著に抑制された。対照群と比較すると KI 動物の組織では心筋細胞数の減少が抑制され、血管周囲の形態変化の抑制が考えられ、この現象への *miR-199a/214* の関与が示唆された。組織傷害の原因となる遺伝子機序の検索のために傷害組織から RNA を得て DNA アレイで解析を行うこととし、特に Dox は活性酸素種の生成を介して病態形成に寄与するのではないかと予想して発現量の比較を行った。しかし、心筋遺伝子の量的変化などは著しいものの抗酸化系で作用する遺伝子に変化は確認できなかった。

KI した *miRNA* が発現する細胞について考察すると、*Ednra* 発現細胞ということから神経堤細胞(NCC)の関与が予想された。NCC は大血管をはじめ様々な細胞種として形態形成に独特の役割を果たしていることはよく知られている。また、筆者の所属研究室では前耳胞に位置する NCC の一群が冠動脈平滑筋に寄与していることを明らかにしている。*Ednra* 遺伝子座への *miR-199a/214* のノックインが心筋傷害を防止する機序についても NCC の関与が強く示唆された。そこで、所属研究室で維持しているマウスを交配して NCC 特異的のマーカである *Wnt1* プロモーターにて NCC を EYFP で標識する *Wnt1-Cre;R26R-EYFP* を対

象に心臓形成がほぼ完成した E17.5 に冠動脈基部を含む心基部周辺組織を得て FACS にて EYFP 細胞を分取し、Fluidigm 社の C1 システムによる単一細胞のキャプチャと核酸の取得、そして Fluidigm 社の BioMark システムによる qPCR システムを用いて単一細胞レベルで遺伝子発現解析を行った。その結果、EYFP 陽性細胞には *Myh11*、*SM22 $\alpha$* 、および *Angpt1* から平滑筋細胞マーカを発現する一群が確認され(図 4 右上黒枠)、NCC の冠動脈平滑筋への寄与が遺伝子レベルでも確認された。また、こ

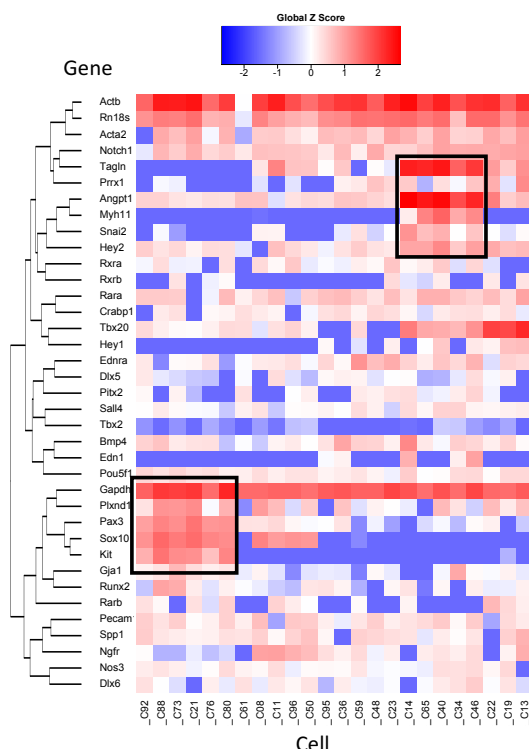


図 4 NCC 由来心臓細胞の遺伝子発現

これらの平滑筋細胞マーカを強く発現する細胞群とは別の集団として幹細胞/未分化細胞マーカである *Kit*、*Sox10*、および *Pax3* で標識される少数の細胞が観察された(図 4 左下黒枠)。これらは NCC 由来の心臓前駆細胞として組織損傷時の修復に寄与している可能性が考えられた。*Kit* 陽性細胞の局在を同時期のマウス胎仔から得た組織切片において確認したところ、心流出路周辺に *Kit* と *Sox10* 陽性の細胞が確認できた。*Ednra* 陽性 NCC 由来心筋幹細胞が *miR-199a/214* を共発現すると傷害を受けた心筋の再生が効果的に促される可能性が考えられた。筆者らの NCC 由来心臓前駆細胞の確認と同時に Hatzistergos らは *Kit* 陽性の NCC 起源の心臓前駆細胞の存在を報告した(参考文献②)。この報告においても *Kit/Sox10/Pax3* 陽性の NCC 細胞の存在が明らかにされており、筆者らの観察の正しさが確認された。Dox 投与による心筋傷害の *miRNA* KI による救済に関わる機序については DNA アレイで明確な変化が確認できなっていないが、上述した単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を用いることで、KI 遺伝子発現による NCC 細胞や心臓前駆細胞様細胞の組成変化および細

胞生存に関わる遺伝子の発現量の比較を行うことで miR-199a/214 を介して心臓保護に関わる機序が明らかにできると期待された。

#### 参考文献

- ① Li JJ et al. Identification of candidate genes in osteoporosis by integrated microarray analysis, *Bone Joint Res.* 2016 Dec; 5(12): 594–601.
- ② Hatzistergos KE et al. cKit+ cardiac progenitors of neural crest origin, 112:13051-13056 (2015)

#### 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 1 件)

- ① Kitazawa T, Fujisawa K, Narboux-Nême N, Arima Y, Kawamura Y, Inoue T, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Kodama T, Kim KS, Sato T, Uchijima Y, Maeda K, Miyagawa-Tomita S, Minoux M, Rijli FM, Levi G, Kurihara Y, Kurihara H. Distinct effects of Hoxa2 overexpression in cranial neural crest populations reveal that the mammalian hyomandibular-ceratothyal boundary maps within the styloid process. *Dev Biol* 査読有, 402(2):162-74, 2015.

##### [学会発表] (計 5 件)

- ① Shimizu M, Kitazawa T, Kawamura Y, Narboux-Nême N, Levi G, Wada Y, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. A homeotic transformation in neural crest specific Dlx5-overexpressing mice (2P0985) 第 38 回日本分子生物学会年会
- ② 瀬谷大貴, 宮川-富田幸子, 丸山和晃, 内島泰信, 栗原由紀子, 栗原裕基 Early effects of re.noic acid on neural crest cells contributing to coronary artery formation (P59-01) 第 52 回日本小児循環器学会学術集会
- ③ 瀬谷大貴, 宮川-富田幸子, 有馬勇一郎, 浅井理恵子, 丸山和晃, 内島泰信, 栗原由紀子, 栗原裕基, 冠動脈形成異常を引き起こすレチノイン酸シグナルの早期効果(2P-0479), 第 39 回日本分子生物学会年会
- ④ 丸山和晃, 宮川-富田幸子, 有馬勇一郎, 苗村和明, 内島泰信, 植村明嘉, 吉田豊, Mann Fanny, 栗原裕基, Semaphorin3E-PlexinD1 シグナルは冠動脈発生に重要である(3PS15-3), 第 39 回日本分子生物学会年会
- ⑤ Takubo N, Naekura K, Yoshida R, Tokunaga T, Hirose O, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H, Macroscopic dynamics of vascular endothelial cells in angiogenesis (2Pos133), 第 54 回日本生物物理学会年

会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://bio.m.u-tokyo.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

内島 泰信 (UCHIJIMA, Yasunobu)  
東京大学・大学院医学系研究科・助手  
研究者番号：90272426

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )