

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462317

研究課題名(和文) トランスクリプトーム情報を基盤にした骨芽細胞と脂肪細胞の分化機構の統合的解析

研究課題名(英文) The Integrated Transcriptome Analysis of Adipocyte and Osteoblast Differentiation

研究代表者

水野 洋介 (Mizuno, Yosuke)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30406532

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)：間葉系幹細胞は様々な細胞種への分化能を持ち、脂肪細胞と骨芽細胞への分化のバランスを調節するメカニズムは骨粗鬆症や生活習慣病の発症や病態と密接に関連する。脂肪細胞分化および骨芽細胞分化する際の調節に関するRNAバリエーションやnoncodingRNA(ncRNA)を同定することを目的として、分化誘導刺激を加えた細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行い、全遺伝子の各エクソンとncRNAの発現変動を網羅的に調べた結果、顕著な発現変動を示すRNAバリエーションやncRNAを複数検出することができた。これらのRNAバリエーションやncRNAの中に、実際に分化の制御に関わるものが含まれていると考えている。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells can differentiate into various cell types. Particularly the regulatory mechanisms of the balance between differentiation to adipocytes and osteoblasts are closely linked to the pathogenesis of metabolic syndrome and osteoporosis. We performed detailed RNA expression analysis using differentiating cells. Differential expression of each exon and ncRNAs are comprehensively analyzed using exon array, miRNA array and RNA-sequencing. As a result, we detected various RNA variants of other genes and ncRNAs that are differentially expressed between both types of differentiation. We estimate that specific RNA variants and ncRNAs which regulate the differentiation are involved in those differentially expressed RNA variants, and currently the experiments for their validation are underway

研究分野：分子生物学

キーワード：非コードRNA 間葉系幹細胞 脂肪細胞分化 骨芽細胞分化 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系幹細胞は、骨芽細胞や脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞などへの分化能力を持ち、骨、脂肪、筋組織などの生体を形作る基本的な組織の構成バランスを保つために非常に重要な役割を持つ。骨髄間葉系幹細胞の分化方向性を決定付ける遺伝子としては、転写因子 PPAR $\gamma$ が脂肪細胞分化において重要である事が知られている。近年では $\beta$ カテニンははじめとする Wnt シグナルが骨芽細胞分化と脂肪細胞分化の振り分けに重要な役割を持つ事が報告されている。我々はこれまでに、マウスの骨髄間葉系幹細胞において、転写因子 Id4 が骨芽細胞分化を促進、脂肪細胞分化を抑制する遺伝子であることを突き止めた (Tokuzawa et al, PLoS Genetics, 2009)。またマイクロ RNA の miR-210 と miR-125b が骨芽細胞分化をそれぞれ促進、抑制することを明らかにした (Mizuno et al, FEBS letters, 2009; Mizuno et al, BBRC, 2008)。他にも様々な遺伝子や miRNA が 2 方向の分化制御に関与する事を明らかにしてきた。

一方で、個々の遺伝子には転写開始点やスプライシングパターンなどが異なる複数の RNA バリエーションが存在する事が報告されている。また、これらが生体内の組織や細胞の種類によって繊細に使い分けられていて、一つの遺伝子の中でも特定の RNA バリエーションのみが一定の機能を持つ事も報告されている。例えば転写因子 PPAR $\gamma$ には、転写開始点やスプライシング部位が異なるバリエーションが $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3 などをはじめとして7種類以上知られており、それぞれが異なる細胞種で異なる働きを有しているが、これらの中で $\gamma$ 2 のバリエーションのみが脂肪細胞分化に必要な働きを持つ。こうした現象は単に個々の遺伝子の RNA 発現量を調べるだけでは見逃されてしまう重要な細胞機能制御メカニズムである。また、成熟 mRNA 形成時の選択的な開裂・ポリ A 付加により、同一遺伝子でも長さの異なる 3' 非翻訳領域 (UTR) を持つ mRNA が生成する。マイクロ RNA (miRNA) は標的遺伝子の 3' UTR 上の特定配列を認識して抑制するため、同じ遺伝子でも 3' UTR が長い RNA バリエーションは多くの miRNA による抑制を受け、逆に 3' UTR が短いバリエーションでは特定の miRNA による抑制を免れる。さらに、タンパク質をコードしない非コード RNA (ncRNA) の中でも miRNA については新知見が蓄積されてきているが、近年では Large non-coding RNA (lncRNA) をはじめとする miRNA 以外の ncRNA が生体内で様々な重要機能を持つことが報告されている。骨芽細胞分化、脂肪細胞分化においても、特定の遺伝子 RNA バリエーションや ncRNA が重要な機能を有する事が考えられるが、そうした新知見はまだ非常に少ない。骨芽細胞と脂肪細胞への分化の方向付けに関して、個々の遺伝子の転写開始点やスプライシングパターンな

どの転写物バリエーションの違いまでを区別して、特定の RNA バリエーションが特徴的な作用メカニズムによって分化を制御することを明らかにした報告は世界的にもまだほとんど存在しない。また ncRNA の様々な生命現象への関与が報告される中、骨芽細胞と脂肪細胞への分化の方向付けに関与するものは miRNA 以外ではまだほとんど見つからない。

## 2. 研究の目的

(1)骨芽細胞分化、脂肪細胞分化時に、異なって発現する遺伝子 RNA バリエーションと ncRNA を同定する。(2)上記の RNA の中で、骨芽細胞分化、脂肪細胞分化に実際に影響を与える RNA を同定する。(3)上記 2 の RNA による骨芽細胞分化、脂肪細胞分化制御メカニズムを解明する。(4)これらの RNA 自体がどのような発現調節を受けて発現しているのかを解明する。

目的とする RNA バリエーションと ncRNA を同定するために、次世代シーケンサーによる RNA シーケンス解析や、エクソン発現アレイ解析を行う。申請者らがこれまでに蓄積してきた発現アレイデータや RNA シーケンスデータも本研究に活用する。転写物を解析するためのこれらの大規模データ、すなわちトランスクリプトーム情報を駆使して、骨芽細胞分化、脂肪細胞分化の新たな制御メカニズムを解明する。本研究では個々の遺伝子の中でも一つ一つの RNA バリエーションにまで着目して、骨芽細胞分化、脂肪細胞分化の制御能力を有する真の RNA バリエーションと ncRNA を同定し、その制御メカニズムを明らかにする。本研究で用いるトランスクリプトーム情報をまとめて解析・俯瞰することで、これまで見ることのできなかった幹細胞分化制御メカニズム解明の新機軸を打ち立てていくことができると考えられる。

本研究により得られる新知見から、特定の遺伝子の中でも骨芽細胞分化、脂肪細胞分化の制御機能を持つバリエーションのみを標的とし、同一遺伝子の他の細胞機能には影響を及ぼさないような創薬標的の発見につながると考えられる。このことは、骨粗鬆症や糖尿病、肥満などの疾患に関して、副作用軽減の観点からも期待される。さらに他の疾患においても同様の解析手法を用いることで、疾患原因となる真の転写物やそれに由来するタンパク質を突き止め、副作用の少ない治療法開発につながる可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1)骨芽細胞分化、脂肪細胞分化時に、異なって発現する遺伝子 RNA バリエーションと ncRNA の同定

目的とする RNA バリエーションと ncRNA を同定するために、我々がこれまでに蓄積してきたデータと新規に構築するデータを合わせて活用した。マウス間葉系幹細胞を用いてデータ

を取得、解析し、同定された RNA のヒトでの保存性をヒト間葉系幹細胞を用いて確認した。

(2) 転写開始点バリエーションの同定・定量  
RNA の 5' 転写開始点部分の発現量を定量する。理化学研究所で開発された CAGE (Cap analysis of Gene Expression) 解析手法により定量を行った。マウス間葉系幹細胞で骨芽細胞分化・脂肪細胞分化時系列それぞれ 15 点のタイムポイントの CAGE データを既に取り得しており、これを利用した。これまでの予備解析で、骨芽細胞分化、脂肪細胞分化誘導細胞間での転写開始点バリエーションや機能未知の ncRNA を既に複数種類見出ししてきた。

(3) スプライスバリエーションの同定・定量  
骨芽細胞、脂肪細胞の分化過程で異なって発現するスプライスバリエーションを同定するため、遺伝子 RNA のエクソンごとの詳細な発現解析を行った。アフィメトリクス社の次世代型エクソン発現アレイであるトランスクリプトームアレイを用いて、各分化方向でそれぞれ 8 ポイントと、分化誘導をしないコントロール細胞を合わせて合計 18 ポイントの時系列サンプルを採取してアレイ解析を行い、各エクソンの発現量を詳細に定量した。

(4) 各遺伝子の詳細な発現定量  
骨芽細胞、脂肪細胞への分化時に発現変動する遺伝子を確認するために、既存の発現アレイデータを活用した。マウス間葉系幹細胞を用いて分化誘導過程の非常に高密度な時系列で採材した発現データを既に取り得しており、これを用いて骨芽細胞分化、脂肪細胞分化時の連続的な遺伝子発現パターンを高精密に解析した。

(5) 3' UTR 長バリエーションと lncRNA の発現量解析  
骨芽細胞、脂肪細胞の分化過程で異なって発現する 3' UTR 長バリエーションと lncRNA を同定するため、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンス解析を行った。lncRNA の定性・定量については、ゲノム上の未知の転写領域も検出するため、CAGE データも併せて活用した。

(6) miRNA の発現定量  
骨芽細胞、脂肪細胞の分化過程で発現量が変化する miRNA を同定するため、アジレント社 miRNA アレイによる発現アレイ解析を行った。マウス間葉系幹細胞を用いて、各分化方向に分化誘導後 6 日目、12 日目のタイムポイントでのデータを既に取り得している。本研究では分化の方向性を規定する miRNA を同定するため、新たに分化の初期段階 (分化誘導後 30 分、1 時間、6 時間、12 時間、1 日目、3 日目) での miRNA 発現アレイデータを取得し、miRNA の発現変動を調べた。

#### 4. 研究成果

マウストランスクリプトームアレイ解析、マイクロ RNA マイクロアレイ解析、small RNA シーケンス解析、RNA シーケンス解析を行い、各遺伝子についてのエクソンごとの相対的利用量の変動を解析した結果、脂肪細胞分化、骨芽細胞分化に伴って、特徴的なエクソン利用を示す遺伝子を複数種類検出することができた。また各分化に伴って異なる発現パターンを示すマイクロ RNA と長鎖非コード RNA を多く検出することができた。これらの遺伝子やマイクロ RNA の標的遺伝子について Gene Ontology 解析を行ったところ、脂肪細胞分化、骨芽細胞分化の Term を持つ遺伝子カテゴリが優位に濃縮されていることがわかった。また miRNA と mRNA の発現パターンが高い逆相関の関係にあるペアを複数見出した。これらの RNA が骨芽細胞分化、脂肪細胞分化に深く関わっていることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Shuhei Noguchi, Takahiro Arakawa, Shiro Fukuda, Masaaki Furuno, Akira Hasegawa, Fumi Hori, Sachi Ishikawa-Kato, Kaoru Kaida, Ai Kaiho, Mutsumi Kanamori-Katayama, Yosuke Mizuno (95 番目), Yutaka Nakachi (102 番目), Yasushi Okazaki, Yoshihide Hayashizaki, 他 134 名, FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples, Scientific Data, 査読有, Volume 4, 2017, 170112  
<https://www.nature.com/articles/sdat a2017112>

Hideno Tochigi, Takeshi Kajihara, Yosuke Mizuno, Yumi Mizuno, Shunsuke Tamaru, Yoshimasa Kamei, Yasushi Okazaki, Jan J Brosens, Osamu Ishihara, Loss of miR-542-3p enhances IGF1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells, Scientific Reports, 査読有, Volume 7, 2017, 40001 <https://www.nature.com/articles /srep40001>

Ayumu Suzuki, Masataka Hirasaki, Tomoaki Hishida, Jun Wu, Daiji Okamura, Atsushi Ueda, Masazumi Nishimoto, Yutaka Nakachi, Yosuke Mizuno, Yasushi Okazaki, Yasuhisa Matsui, Juan Carlos Izpisua Belmonte, Akihiko Okuda, Loss of MAX results in meiotic entry in mouse embryonic and germline stem cells, Nature Communications, 査読有, Volume 7, 2016, <https://www.nature.com/articles/ncom ms11056>

研究者番号： 3 0 4 0 6 5 3 2

(2)研究分担者

仲地 豊 (NAKACHI, Yutaka)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号： 1 0 5 2 2 0 9 7

Shunsuke Tamaru, Yosuke Mizuno, Hidenochi Tochigi, Takeshi Kajihara, Yasushi Okazaki, Ryugo Okagaki, Yoshimasa Kamei, Osamu Ishihara, Atsuo Itakura, MicroRNA-135b suppresses extravillous trophoblast-derived HTR-8/SVneo cell invasion by directly down regulating CXCL12 under low oxygen conditions, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、Volume 461、2015、  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X15007342?via%3Dihub>

〔学会発表〕(計5件)

Yosuke Mizuno, Yutaka Nakachi, Yukiko Yatsuka, Yasushi Okazaki、The regulatory mechanisms of osteoblast and adipocyte differentiation revealed by the integrated transcriptome analysis, The 43rd Naito Conference、2017年6月29日

水野 洋介、仲地 豊、徳澤 佳美、八塚 由紀子、岡崎 康司、骨芽細胞と脂肪細胞の分化を制御する転写物バリエーション、マイクロRNA、非コードRNAの探索、BMB2015、2015年12月2日

Yosuke Mizuno, Yutaka Nakachi, Yoshimi Tokuzawa, Yukiko Yatsuka, Yasushi Okazaki, The Integrated Transcriptome Analysis of Adipocyte and Osteoblast Differentiation, IMGC2015、2015年11月9日

水野 洋介、仲地 豊、八塚 由紀子、徳澤 佳美、岡崎 康司、トランスクリプトーム情報を活用した、骨芽細胞と脂肪細胞の分化機構の統合的解析、第17回日本RNA学会年会、2015年7月16日

Yosuke Mizuno, Yutaka Nakachi, Yukiko Yatsuka, Yoshimi Tokuzawa, Yasushi Okazaki, The Integrated Transcriptome Analysis of Adipocyte and Osteoblast Differentiation, Keystone Symposium 2014, Obesity and the Metabolic Syndrome: Mitochondria and Energy Expenditure (X7)、2015年3月24日

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 洋介 (MIZUNO, Yosuke)

埼玉医科大学・医学部・講師