

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

脂肪細胞と骨芽細胞の分化を制御する 非コードRNAネットワークの分子基盤の解明

研究代表者 水野 洋介（ゲノム医学研究センター）

緒 言

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 γ 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 β カテニンをはじめとする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。申請者らは近年、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¹⁾。またマイクロRNA (miRNA) 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^{2,3)}。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。タンパクをコードしない非コードRNAの中でもmiRNAについては、上記の例のように、様々な生命現象を調節していることが具体的なメカニズムと共に多く明らかになってきている。現在データベースに登録されているmiRNAの数はヒト、マウスでそれぞれ高々約2,600種、約2,000種類であり、また個々のmiRNAが制御する対象となる標的遺伝子は比較的容易に推定できることもあり、特定のmiRNAとその標的遺伝子の制御関係を含んだ個々の生命現象における制御メカニズムを解明する作業は、一連のワークフローとして既にほぼ一般化している。一方、miRNAよりも長い塩基長を持つ長鎖非コードRNA (lncRNA) については、マウスでは約10万種類が、NCBIやEnsembl, lncRNA database等の公共データベースに個別の転写物として登録されている。lncRNAの中には、標的遺伝子やそのゲノム領域に対するクロマチン修飾やメチル化修飾などを介して、様々な重要な生命現象に関与していることが明らかとなっており^{4,5)}、がんや心筋症などの特定の病態との関与も少しずつ明らかになってきている。しかし、個々の生命現象を制御することが解明された具体的なlncRNAの数は現時点でまだ約10万種類

のうちの数百種類程度とごく限られている。特に、骨芽細胞分化、脂肪細胞分化を制御する具体的なlncRNAはまだほとんど同定されていない。骨芽細胞分化に影響を与えることが報告されているlncRNAのごく限られた例として、lncRNA-ANCRがある⁶⁾。lncRNA-ANCRはヒト骨芽細胞前駆細胞の一種であるhFOB1.19において骨芽細胞分化時に発現が減少する。またこのRNAを細胞内で強制発現させると骨芽細胞分化が抑制される事が示されており、EZH2とRunx2に対する何らかの抑制的な制御機構が存在することが示唆されている。約10万種類のlncRNAの中には、骨芽細胞分化や脂肪細胞分化をより積極的に制御するものが存在する事が考えられるが、まだその同定にはほとんど至っていないのが現状であり、ましてやその具体的な制御メカニズムが明らかにされているものは皆無である。そこで本研究では、マウス間葉系幹細胞が骨芽細胞分化、脂肪細胞分化する際に発現変動するlncRNAを検出し、両方向への分化に影響を与えるlncRNAの候補を抽出することを目的として実験・解析を実施した。

材料と方法

1) 間葉系幹細胞サンプルの調整

10%ウシ胎児血清を添加したPRMI1640培地でマウス間葉系幹細胞ST2を培養し、脂肪細胞分化誘導および骨芽細胞分化誘導を行った。脂肪細胞分化誘導では、インスリン、デキサメタゾン、ロシグリタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを基本培地に添加した誘導用培地を用いた。2日後に誘導用培地を除去し、基本培地に交換して培養を継続した。骨芽細胞分化誘導では、培養の全期間において、基本培地にBMP-4 (R&D社) を200 ng/mlの濃度で添加した培地を用いた。分化誘導を行わない対照サンプルとして基本培地のみでの培養も併せて行った。分化誘導開始直前(0時間)、開始1時間後、12時間後、2日後、4日後、6日後、10日後の細胞を回収し、miRNeasy mini kit (Qiagen社) によりsmall RNAを含む全RNAを抽出した。サンプルからDNAを除去するため、RNA抽出作業時にDNase処理を行った。

2) 脂肪・骨芽細胞分化の確認

分化誘導サンプルの分化を確認するため、脂肪細胞、骨芽細胞分化の遺伝子マーカーの発現を逆転写定量PCR (qRT-PCR) 法を用いて定量した。まず、前項で得られたRNAを用いて、逆転写酵素 (Bioscript, Bioline社) を用いてcDNAを合成した。得られたcDNA産物を鋳型として、各遺伝子特異的プライマー (脂肪細胞分化マーカーとしてPPAR γ , 骨芽細胞分化マーカーとしてオステオカルシン) を用いて、Power SYBR Green (ライフテクノロジー社) による定量的PCRを行った。更に、脂肪細胞分化誘導処理、骨芽細胞分化誘導処理したサンプルについてそれぞれナイルレッド染色、アルカリフォスファターゼ染色を行い、脂肪細胞と骨芽細胞への分化を確認した。

3) トランスクリプトームアレイ解析

各サンプルRNA 100 ngを用いて、アフィメトリクス社 Mouse Transcriptome Array 1.0による発現アレイ解析実験を行った。アフィメトリクス社のプロトコルに従い、逆転写反応、二本鎖cDNA合成、インビトロ転写反応、一本鎖cDNA再合成、cDNA断片化反応・標識反応を行って、ハイブリダイゼーション用のサンプルを調整した。調整したサンプルをアレイに充填し、45℃で16時間回転させながらインキュベーションし、アレイへのハイブリダイゼーションを行った。その後、Fluidics Station (アフィメトリクス社) を用いてアレイを洗浄・染色し、専用スキャナにて各プローブスポットの蛍光強度を定量した。得られたデータ (CELファイル) から Expression Consoleアプリケーション (アフィメトリクス社) を用いて数値化と遺伝子対応付けを行い、Transcriptome Analysis Console3.0アプリケーション (TAC, アフィメトリクス社) を用いて各遺伝子のエクソン毎の発現量とその変動量を可視化した。

結 果

1) 脂肪・骨芽細胞分化の確認

a) 脂肪細胞分化の確認

脂肪細胞分化誘導後6日目のサンプルを用いて、PPAR γ 遺伝子発現量を定量的PCR法にて定量した結果、未分化の細胞と比較してPPAR γ 発現量が約1800倍まで上昇していることが分かった。またナイルレッド染色により、実際に油滴の蓄積を確認した (data not shown)。

b) 骨芽細胞分化の確認

骨芽細胞分化誘導後6日目のサンプルを用いて、オステオカルシン遺伝子発現量を定量的PCR法にて定量した結果、未分化の細胞と比較してオステオカルシン発現量が約300倍まで上昇していることが分かった。またアルカリフォスファターゼ染色により、アルカリフォスファターゼ活性陽性の細胞を確認した (data not shown)。

2) lncRNAの発現変動解析

前項の解析により脂肪細胞分化、骨芽細胞分化の誘導

ができた細胞検体より抽出したRNAを用いて、発現アレイ解析を行った。TACアプリケーションのGene level expression analysisモードを用いて視覚化した例を図1と図2に示す。図1では、分化誘導を行わずに10日間培養した細胞サンプルの発現データをコントロールとして、

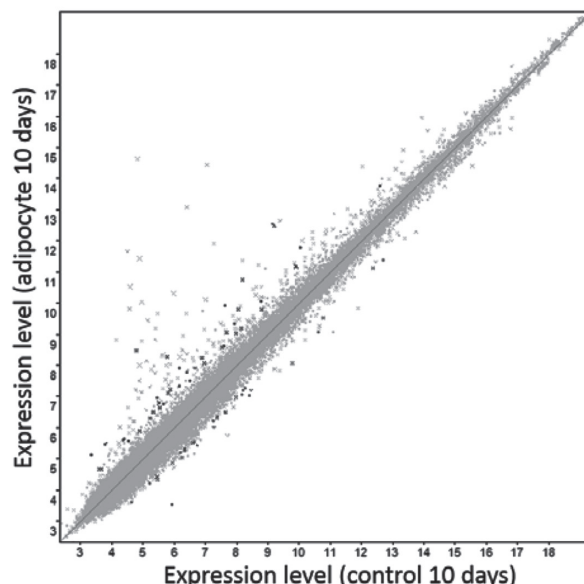


図1. 脂肪細胞分化10日目の網羅的遺伝子発現変動パターン。各転写物の発現量について、脂肪細胞分化誘導10日目のサンプルをY軸、分化誘導を行わないコントロールサンプルをX軸においた散布図。発現が2倍以上変動したlncRNAを濃いドットで示している。

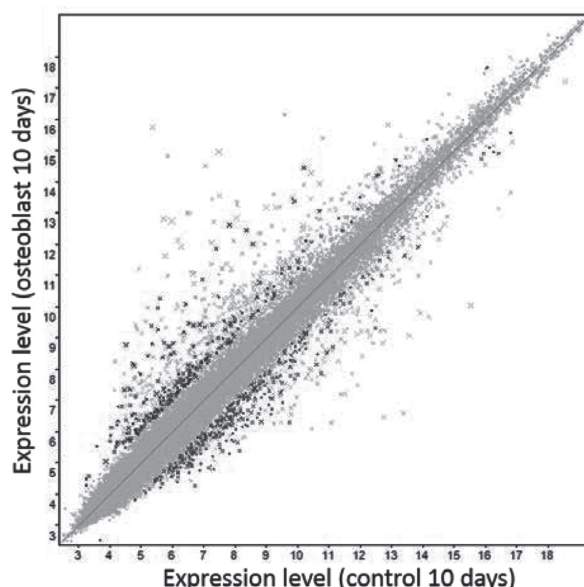


図2. 骨芽細胞分化10日目の網羅的遺伝子発現変動パターン。各転写物の発現量について、骨芽細胞分化誘導10日目のサンプルをY軸、分化誘導を行わないコントロールサンプルをX軸においた散布図。発現が2倍以上変動したlncRNAを濃いドットで示している。

脂肪細胞分化誘導後10日目の細胞の発現データを用いた、各遺伝子の発現量の散布図を示している。TACアプリケーションでnoncodingRNAと定義されている転写物をlncRNAとみなし、それをフィルタリングにより抽出したところ、約90種類のlncRNAが2倍以上発現変動していることが分かった。最も発現変動の大きかったlncRNAでは、脂肪細胞分化誘導により約13倍の発現上昇が見られた。同様の解析を骨芽細胞分化誘導サンプルでも実施した。図2では、分化誘導を行わずに10日間培養した細胞サンプルの発現データをコントロールとして、骨芽細胞分化誘導後10日目の細胞の発現データを用いた、各遺伝子の発現量の散布図を示している。骨芽細胞分化誘導時では発現変動した遺伝子の種類数が脂肪細胞分化時よりも多く、lncRNAに関しては約600種類が2倍以上発現変動していることが分かった。発現変動の幅も脂肪細胞分化時よりも大きく、最も発現変動の大きかったlncRNAでは、骨芽細胞分化誘導により約27倍の発現上昇が見られた。

考 察

今回の解析により、脂肪細胞分化、あるいは骨芽細胞分化を誘導したマウス間葉系幹細胞において、発現量に変動するlncRNA群を新規に検出することができた。これらのlncRNAには、実際に脂肪細胞分化や骨芽細胞分化に影響を及ぼしているものが含まれていると推測される。今回使用したマウストランスクリプトームアレイでは、2013年までに公共データベースに登録されている非コードRNAの多くがプローブとして搭載されていることから、既知の非コードRNAの発現量を解析するという観点においては本アレイは簡便で有効なツールであると考えられる。今回検出されたlncRNAについては、それぞれどのような遺伝子に作用を及ぼしているのか、またそれを介して細胞分化にどのように影響を与えるのかを今後解明していく必要がある。これにより、骨粗鬆症や生活習慣病に対する創薬や診断・治療等の臨床へ展開していく事が期待される。

謝 辞

この研究はゲノム科学部門の岡崎康司教授の助言、監督の下に遂行されました。また、細胞サンプルの調整には

ゲノム科学部門の八塚由紀子助手に多大なご協力を頂き、発現解析に関してはトランスレーショナル・リサーチ部門の仲地豊助教に助言を頂きました。深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Tokuzawa Y, Nakachi Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Mizuno Y, Okazaki Y, et al. Id4, a new candidate gene for senile osteoporosis, acts as a molecular switch promoting osteoblast differentiation. PLoS Genet 2010; 6(7): e1001019.
- 2) Mizuno Y, Tokuzawa Y, Yatsuka-Kanesaki Y, Okazaki Y. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. FEBS Lett 2009; 583(13): 2263-8.
- 3) Mizuno Y, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Okazaki Y, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. Biochem Biophys Res Commun 2008; 368(2): 267-72.
- 4) Kornfeld JW, Brünig JC. Regulation of metabolism by long, non-coding RNAs. Front Genet 2014; 5(57): eCollection.
- 5) Guan D, Zhang W, Zhang W, Liu GH, Belmonte JC. Switching cell fate, ncRNAs coming to play. Cell Death Dis 2013; 4: e464.
- 6) Zhu L, Xu PC. Downregulated LncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression. Biochem Biophys Res Commun 2013; 432: 612-7.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 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, 札幌
- 2) 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, 第38回日本分子生物学会年会 (BMB2015), 2015年12月2日, 神戸