

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

統合的トランスクリプトーム解析で明らかにする
脂肪・骨芽細胞分化調節メカニズム

研究代表者 水野 洋介（ゲノム医学研究センター）

研究分担者 仲地 豊*

緒 言

間葉系幹細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞などの様々な細胞種に分化する能力を有するが、特に個々の間葉系幹細胞が脂肪細胞と骨芽細胞のどちらに分化するか、そ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。

我々はこれまで、骨髄間葉系幹細胞が骨芽細胞や脂肪細胞へ分化する際の遺伝子制御ネットワークを描出してきた。骨芽細胞や脂肪細胞への分化過程で重要な機能を担っている遺伝子を調べるため、それぞれの分化過程において極めて詳細なタイムポイントで遺伝子発現解析を行ってきた。その結果、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) である miR-125b と miR-210 が、骨芽細胞分化をそれぞれ抑制、促進することを明らかにした^{2,3)}。これらの他にも、様々な遺伝子や miRNA がその発現量に応じてそれぞれの分化の方向性に関与する事を明らかにしてきた。

遺伝子がゲノムDNAから転写されてRNAができ、それを鋳型として翻訳が起こりタンパク質が作られるセントラルドグマは古くから知られているが、実際にはその個々の過程で多くの複雑かつ精細な制御機構があることが次々と明らかになっている。ゲノム上の1つの遺伝子座位からは1つの決まった一次構造を持つRNAのみが作られるのではなく、転写開始点や使われるエクソンが異なる多くのアイソフォームが存在することが多くの遺伝子座位で明らかになっており、これらのRNAアイソフォーム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る事実も多く報告されてきている。例えば、転写

因子 PPAR γ には少なくとも $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ という転写開始点や利用エクソンが異なる3つのアイソフォームが知られており、それぞれが異なる細胞種で異なる働きを有している。これらの中で脂肪細胞分化に必須な働きを持つのはアイソフォーム $\gamma 2$ である⁴⁾。こうした現象は単に個々の遺伝子座位からのRNA発現量を調べるだけでは見逃されてしまう重要な作用メカニズムである。さらに、タンパク質をコードしていない non-coding RNA (ncRNA) が機能性 RNA として生体内の様々な現象に関与していることが明らかになってきている。ncRNA の中でも miRNA についてはこれまで新知見が最も盛んに報告されてきたが、近年になっては Large non-coding RNA (lncRNA) をはじめとする miRNA 以外の ncRNA の機能も次々と明らかになってきている^{5,6)}。

そこで本研究では、間葉系幹細胞が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遺伝子アイソフォームや ncRNA を同定するために、ヒト間葉系幹細胞を脂肪細胞分化、骨芽細胞分化させたサンプルを用いて、全遺伝子と ncRNA のエクソン毎の発現量をトランスクリプトームアレイを用いて網羅的に調べた。

材料と方法

1. 間葉系幹細胞サンプルの調整

3種類のヒト間葉系幹細胞をロンザ社より購入した。増殖用の基本培地 (MSCGM Mesenchymal Stem Cell Growth Mediumu BulletKit, ロンザ社) を用いて細胞を増殖させた後、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、

*ゲノム医学研究センター

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 2 時間後、3 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ズ社) 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オイルレッド染色、アルカリフォスファターゼ染色により分化を確認した。

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 Human Transcriptome Array 2.0 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) からコンピュータ上で 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 Console アプリケーション (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 10 倍以上上昇していることが分かった (図 1)。またオイルレッド染色により、実際に油滴の蓄積を確認した。

b) 骨芽細胞分化の確認

骨芽細胞分化誘導後 6 日目、12 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 5 倍程度まで上昇していることが分かった (図 2)。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。

2. トランスクリプトームアレイ解析

a) 転写物単位での発現変動確認

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、トランスクリプトームアレイ解析を行った。Transcriptome Analysis Console アプリケーションの

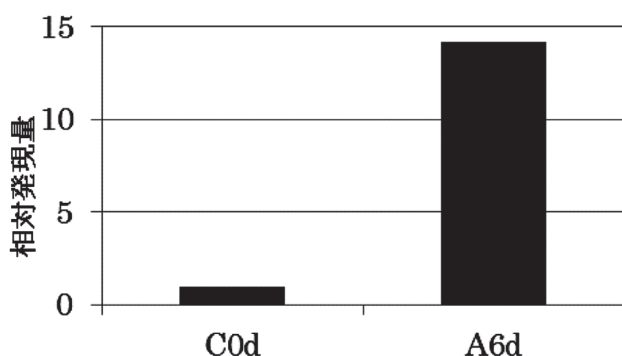


図 1. 脂肪分化細胞における PPAR γ 遺伝子の発現上昇。未分化の細胞 (C0d) と比べて、脂肪細胞分化誘導後 6 日目の細胞 (A6d) では、PPAR γ 遺伝子 mRNA の発現量が約 14 倍にまで上昇した。

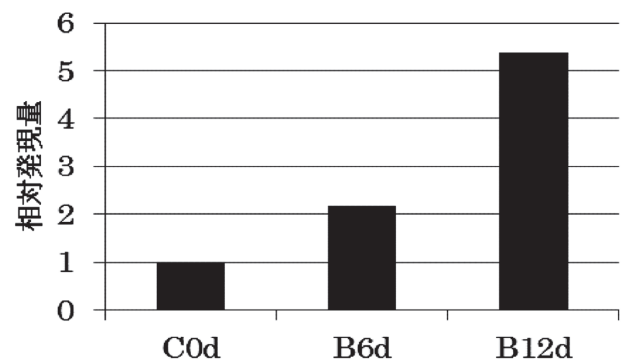


図 2. 骨芽細胞分化におけるオステオカルシン遺伝子の発現上昇。未分化の細胞 (C0d) と比べて、骨芽細胞分化誘導後 6 日目 (B6d)、12 日目 (B12d) の細胞では、オステオカルシン遺伝子の発現量がそれぞれ約 2.1 倍、5.3 倍にまで上昇した。

Gene level expression analysisモードを用いて視覚化した例を図3と図4に示す。脂肪細胞分化誘導サンプルにおいては、FABP4やADIPOQなど、脂肪細胞分化時に発現が上昇する代表的な遺伝子の発現が上昇していることが確認できた(図3)。また、骨芽細胞分化誘導サンプルでは、オステオモジュリンやHEY1, MMP13などの骨芽細胞分化誘導時に発現が上昇することが知られている遺伝子の発現が上昇していることが分かった(図4)。

b) エクソン単位での発現変動とncRNA 発現変動の確認

前項で用いたアレイデータについて、Transcriptome Analysis ConsoleアプリケーションのAlternative splicing analysisモードを用いてデータの解析と可視化を行った。視覚化データの一例を図5に示す。この例では、脂肪細胞分化誘導後6日目のサンプルと分化誘導を行わずに6日間培養したコントロール細胞との間で、PPAR γ 遺伝子について、RNAサンプルに含まれる各エクソンの存在比が示されている。PPAR γ 遺伝子は、PPARG1, PPARG2等の、転写開始点異なるアイソフォームがいくつか知られており、脂肪細胞分化時にはPPARG2のアイソフォームの発現量が選択的に亢進し、脂肪細胞分化を促進させる役割があることが知られている。今回の解析において、脂肪細胞

分化6日目では、PPARG2のアイソフォームが特異的に発現上昇していることを確認することができた(図5)。次に、脂肪細胞分化と骨芽細胞分化それぞれ6日目のサンプルと、分化誘導を行わずに6日間培養したコントロール細胞との間で、転写開始点やエクソンの組み合わせが異なる遺伝子の同定を試みた。各遺伝子の中で、相対的な発現量が5倍以上変動したエクソンを含む遺伝子の数をカウントしたところ、表1に示した数の遺伝子において、エクソンの相対的な発現量が5倍以上変動していた。また、同様のサンプルにおいて、表1のncRNAの項目に示した数のncRNAで5倍以上の発現変動が観察された。

考 察

間葉系幹細胞の脂肪細胞分化・骨芽細胞分化時における制御ネットワークを解析する手法として、これまでに従来の遺伝子単位での網羅的遺伝子発現解析が我々の研究を始めとして多く行われてきており、様々な知見が蓄積されてきた。一方で、各遺伝子から生み出されるRNAは全て一様ではなく、転写開始点が異なっていたり、選択的スプライシングなどにより多様なアイソフォームが存在し、特定のアイソフォームが細胞内の特定のイベントに重要な役割を示す事が分かってきた。本研究においては、正確に各遺

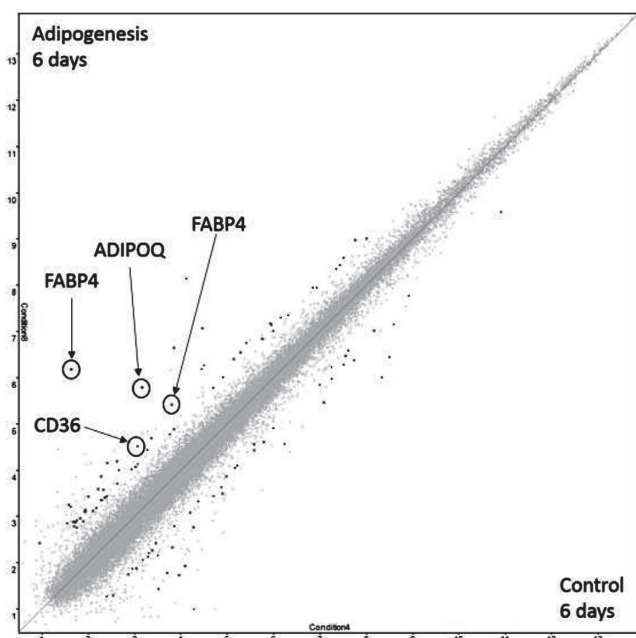


図3. 脂肪細胞分化6日目の網羅的遺伝子発現変動パターン。各転写物の発現量について、脂肪細胞分化誘導6日目のサンプルをY軸、分化誘導を行わないコントロールサンプルをX軸においた散布図。脂肪細胞で発現する代表的な遺伝子の発現上昇が認められた。

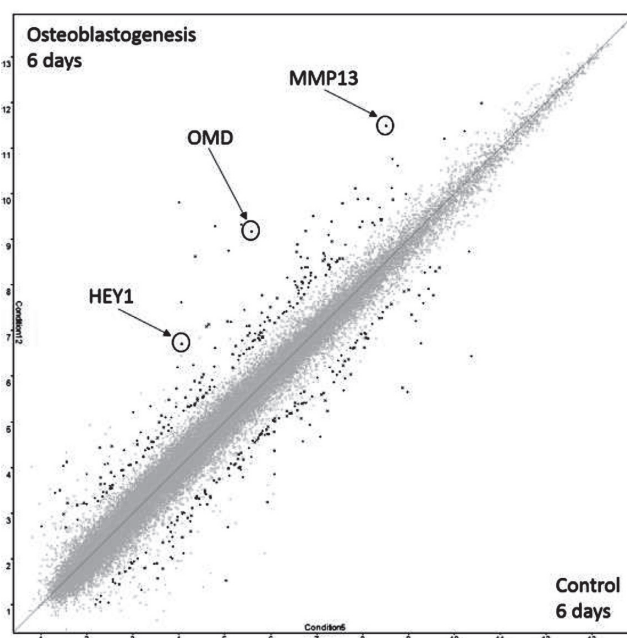


図4. 骨芽細胞分化6日目の網羅的遺伝子発現変動パターン。各転写物の発現量について、骨芽細胞分化誘導6日目のサンプルをY軸、分化誘導を行わないコントロールサンプルをX軸においた散布図。骨芽細胞で発現する代表的な遺伝子の発現上昇が認められた。

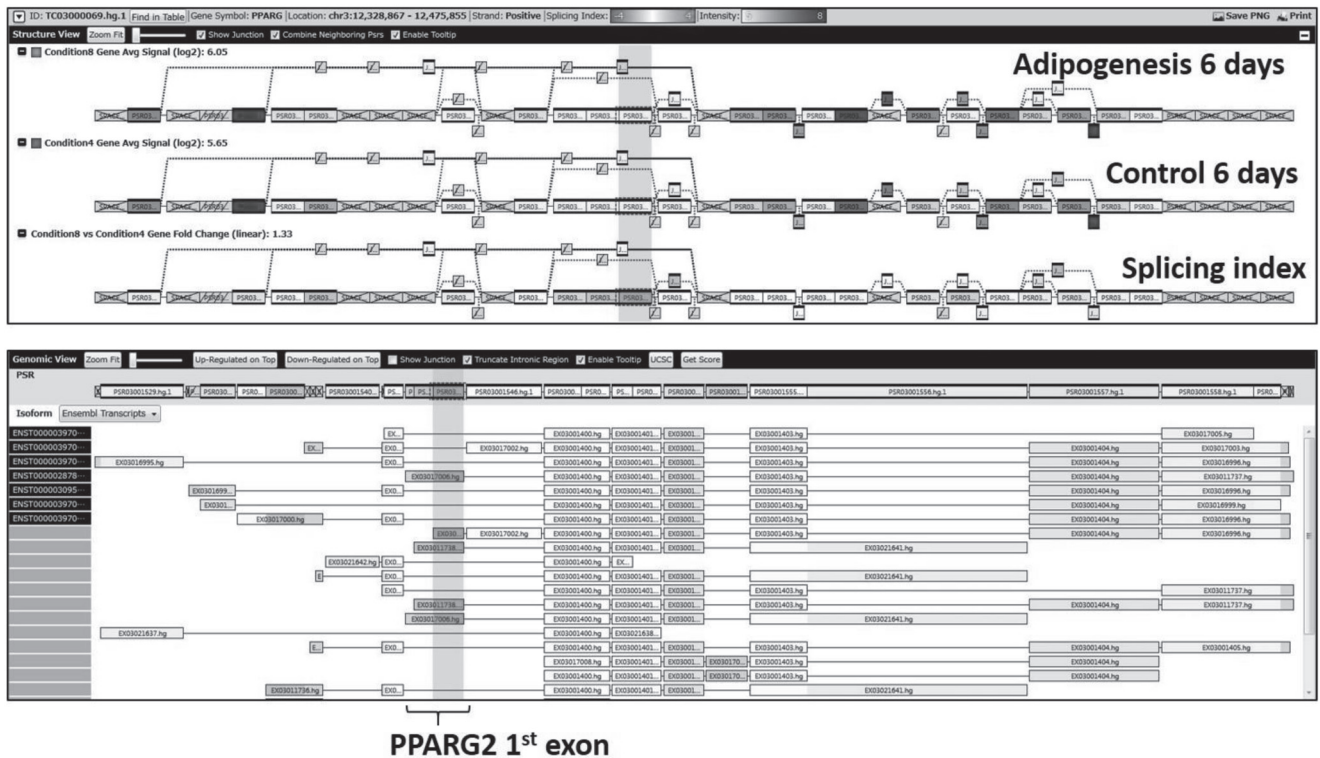


図 5. 脂肪細胞分化6日目のサンプルにおける, PPARG 遺伝子エクソンの発現変動パターン. 上段は, 1列目が脂肪分化誘導後6日目, 2列目が分化誘導無しのコントロール6日目サンプルについて, PPARG 遺伝子におけるエクソン毎の発現量を示している. 上段3列目は, エクソン毎の相対的な発現比を表す Splicing index の数値が可視化されている. 中央の縦帯で示されたエクソンが PPARG2 遺伝子の第一エクソンである. また下段では, 既存の各種データベースに収録されている PPARG 遺伝子のアイソフォームを示している. 中央やや左の縦帯で示されたエクソンが PPARG2 遺伝子の第一エクソンである. 脂肪分化誘導後6日目のサンプルでは, PPARG2 遺伝子の第一エクソンの利用度合いが高い事が示されている.

表 1. Gene の項目では, 各遺伝子の中で相対的な発現量が5倍以上変動したエクソンを含む遺伝子の数をカウントした. ncRNA の項目では, 発現量が5倍以上変動した ncRNA の数をカウントした.

	Adipogenesis		Osteoblastogenesis	
	6 days		6 days	
	Up	Down	Up	Down
Gene	39	25	56	58
ncRNA	1	0	4	1

伝子のエクソン毎の発現定量や ncRNA の発現定量を網羅的に行うことができるトランスクリプトームアレイを用いて, 転写開始点やスプライシングパターンが異なるアイソフォームや ncRNA の発現量を定量した. その結果, 脂肪細胞分化, 骨芽細胞分化のそれぞれの過程において, 特定のアイソフォームの発現が大きく

変動する遺伝子と, 分化の過程で発現が大きく変動する ncRNA を見出すことができた. 今後はこれらのアイソフォームと ncRNA について, 細胞分化にどのように影響を及ぼしているのか, そのメカニズムを解明し, 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ました。またゲノム科学部門の徳澤佳美研究員には適切な助言を頂きました。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, 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.
- 3) 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.
- 4) Ackert-Bicknell C and Rosen C. The Genetics of PPAR γ and the Skeleton. *PPAR Res* 2006;2006:93258.
- 5) Kornfeld JW, Brüning JC. Regulation of metabolism

by long, non-coding RNAs. *Front Genet* 2014;5(57):eCollection.

- 6) Guan D, Zhang W, Zhang W, Liu GH, Belmonte JC. Switching cell fate, ncRNAs coming to play. *Cell Death Dis* 2013;4:e464.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 水野洋介, 仲地豊, 徳澤佳美, 兼先 - 八塚由紀子, 岡崎康司. 脂肪・骨芽細胞分化を制御する非コードRNAの探索, NGS現場の会 第三回研究会, 2013年9月4日, 神戸
- 2) 水野洋介, 仲地豊, 徳澤佳美, 兼先 - 八塚由紀子, 岡崎康司. 間葉系幹細胞分化を調節するキー転写因子による, マイクロRNAを介した細胞分化制御, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日, 神戸
- 3) 仲地豊, 水野洋介, 徳澤佳美, 山下泉, 八塚由紀子, 岡崎康司. CAGELOH (CAGE Loci Oriented Heatmap) によるマウス間葉系幹細胞の脂肪細胞・骨芽細胞分化 トランスクリプトーム統合解析, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月5日, 神戸
- 4) 仲地豊, 水野洋介, 徳澤佳美, 山下泉, 八塚由紀子, 岡崎康司. 脂肪細胞及び骨芽細胞への2方向性分化で機能する制御因子の探索, 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻人類学演習IV・談話会, 2013年11月29日, 東京