

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

脂肪細胞分化・骨芽細胞分化の2方向性分化で機能する
アンチセンスRNAの解析

研究代表者 仲地 豊（ゲノム医学研究センター）

緒 言

アンチセンスRNAは非コードRNAの一種であり、蛋白質をコードする遺伝子の相補鎖側から転写されるRNAである（図1）。GenBankに登録されているデータの解析から、約2割のマウス遺伝子で相補鎖側からRNAが転写していることがわかっている。このようなアンチセンスRNAの一部が機能分子として働くことは以前から報告されており、Xist 遺伝子およびそのアンチセンスRNAであるTsixのバランスによるX染色体不活化機構が知られている¹⁾。がん化やES細胞分化などの様々な生命現象の中でも、アンチセンスRNAがその相補鎖遺伝子（センス遺伝子）の発現を調節していることが近年明らかになってきた²⁾。そのため骨量減少と脂肪細胞の蓄積が同時におこる老人性骨粗鬆症^{3,4)}など、間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞への適切な分化が鍵となる多因子疾患でもアンチセンスRNAによる発現制御が重要だと考えられる（図2）。しかし間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞への分化時に発現するアンチセンスRNAの役割はこれまで解明されていない。これはマイクロアレイのような既存の方法では既知遺伝子の発現しか検出できず、間葉系幹細胞分化特異的なアンチセンスRNAの発現がこれまで検出できなかったことに起因する。

著者はこれまで文部科学省ゲノムネットワークプロジェクトにおいて、間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞に分化する際の遺伝子転写調節ネットワークについて研究をおこなってきた^{5,6)}。なかでもmRNAの5'側配列決定による発現解析法（CAGE法：図3）^{7,8)}をもちいた発現プロファイル解析により、非常に多くのアンチセンスRNAが脂肪細胞・骨芽細胞分化過程で特異的に発現変化していることがこれまでわかっている。実際に骨芽細胞分化に影響を与えるセンス遺伝子とアンチセンスRNAのペアも同定している（data not shown, 論文準備中）。しかしさらに多くのアンチ

センスRNAが老人性骨粗鬆症のような多因子疾患に深く関わっていることが容易に想像でき、それらは生活習慣病発症のあらたな機序解明と創薬標的の開発に重要な役割を担うと考えられる。そこで本研究では超並列高速シーケンサー（次世代シーケンサー）によるCAGE解析により、脂肪細胞分化および骨芽細胞分化で機能するアンチセンスRNAの網羅的な探索をおこなった。

材料と方法

細胞と分化条件

本研究では材料にはマウス骨髄由来間質系細胞であるST2細胞を用いた。この細胞は培地交換により脂肪細胞分化も骨芽細胞分化も効率良く誘導することができる。本研究で用いたST2の脂肪細胞分化誘導は0.5 mM イソブチルメチルキサンチン、0.25 mM デキサメタゾン、5 mg/ml インスリン、1 mM ロシグリタゾン含有培地によりおこなった。また骨芽細胞分化誘導は100 ng/ml BMP4 含有培地にておこなった。

シーケンシングデータ解析

本研究では理化学研究所オミックス研究基盤との共同研究により、DNA増幅工程が不要で測定ダイナミックレンジが広い超並列高速シーケンサー（ヘリコス社 Heliscope）とCAGE法による遺伝子発現解析を組み合わせた手法（Heliscope-CAGE）^{9,10)}によるST2細胞分化過程の時系列発現データを利用した。これは両分化方向各15点および未分化対照細胞2点による計94サンプル分の低バイアスかつ高精細なRNA転写プロファイルデータである（図4：それぞれ反復実験3回分のデータ）。この時系列発現データを各サンプル・各領域の発現量を100 bpごとの小領域に分割して集計・視覚化し、その発現の増減を全時系列で統計的に比較^{11,12)}する手法（CAGE Loci Oriented Heatmap; CAGELOH, 論文準備中）をあらたに開発し、全ゲノム領域から分化過程特異的な発現変化を示すRNAを同定した。分化過程特異的な発現変化をしめしたRNAの中から

公共データベース (GenBank¹³⁾ および Ensembl¹⁴⁾ の遺伝子領域情報をもちいてアンチセンスRNAを抽出した。またアンチセンスRNAと対になるセンス遺伝子に関しては Gene Ontology¹⁵⁾ や KEGG¹⁶⁾ などの公共データベースを利用してその機能情報を考察した。

結 果

本研究では、脂肪細胞分化および骨芽細胞分化にて発現変化のあったアンチセンスRNAを同定して機能解析をおこない、アンチセンスRNAを介した2方向性の分化制御モデルの構築を最終的な目的としている。そのため超並列高速シーケンサーをもちいたCAGE解析による時系列発現データから、脂肪細胞および骨芽細胞分化時期に特異的に発現変化するアンチセンスRNA群を多数同定した。

間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞への分化過程において、CAGE解析により全ゲノム中418,187領域においてN = 3の反復実験すべてでのRNAの発現が観測された。その中の11,185領域においてアンチセンスRNAが分化過程で有意に発現変動していることがわ

かった ($FDR < 0.05$)。このうち分化特異的な発現亢進または発現減少を示すアンチセンスRNAの発現領域は脂肪細胞分化・骨芽細胞分化でそれぞれ2,066領域 (センス鎖には1,445遺伝子)、680領域 (センス鎖には531遺伝子) であった。

これらのうち35領域 (29遺伝子) のアンチセンスRNAは脂肪細胞分化で発現亢進かつ骨芽細胞分化で発現減少していた。逆に脂肪細胞分化で発現減少し、骨芽細胞分化で発現亢進するアンチセンスRNAが40領域 (33遺伝子) で同定された。またこれらのアンチセンスRNAとそのセンス鎖遺伝子について Gene OntologyデータおよびKEGGデータをもちいた解析をおこなったところ、脂肪細胞分化で発現亢進かつ骨芽細胞分化で発現減少したアンチセンスRNAのセンス鎖遺伝子群には osteoclast differentiation ($p\text{-value} = 0.007$) や G-protein coupled receptor protein signaling pathway ($p = 0.01$) に関わる遺伝子が顕著に含まれていることがわかった。逆に脂肪細胞分化で発現減少し骨芽細胞分化で発現亢進するアンチセンスRNAのセンス鎖遺伝子群には phosphatidylinositol

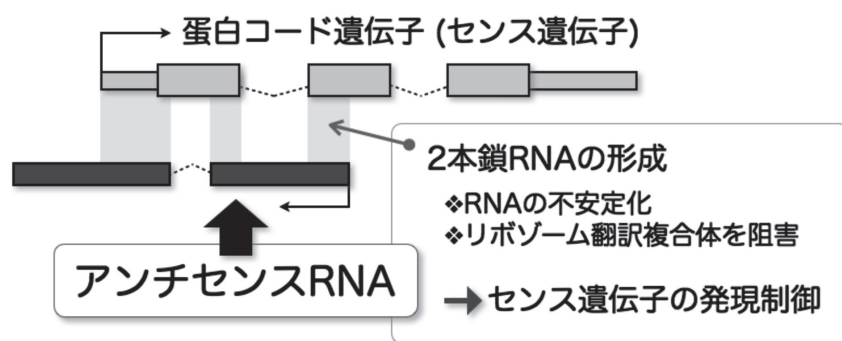


図1. アンチセンスRNA.

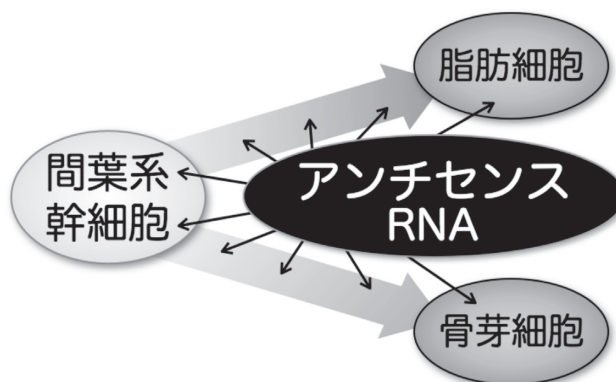


図2. アンチセンスRNAによる2方向性間葉系幹細胞分化制御.

3-kinase cascade ($p = 0.00005$), sphingolipid metabolic process ($p = 0.001$), membrane lipid metabolic process ($p = 0.002$), ceramide metabolic process ($p = 0.004$)などの機能をもつ遺伝子が顕著に含まれていた。これらのような2方向性の細胞分化でそれぞれ排他的

な発現プロファイルをもつアンチセンスRNAはそのセンス鎖遺伝子とともに2方向分化の鍵因子として機能している可能性があり、現在これらセンス鎖遺伝子-アンチセンスRNAペアの機能解析を進めている (data not shown)。

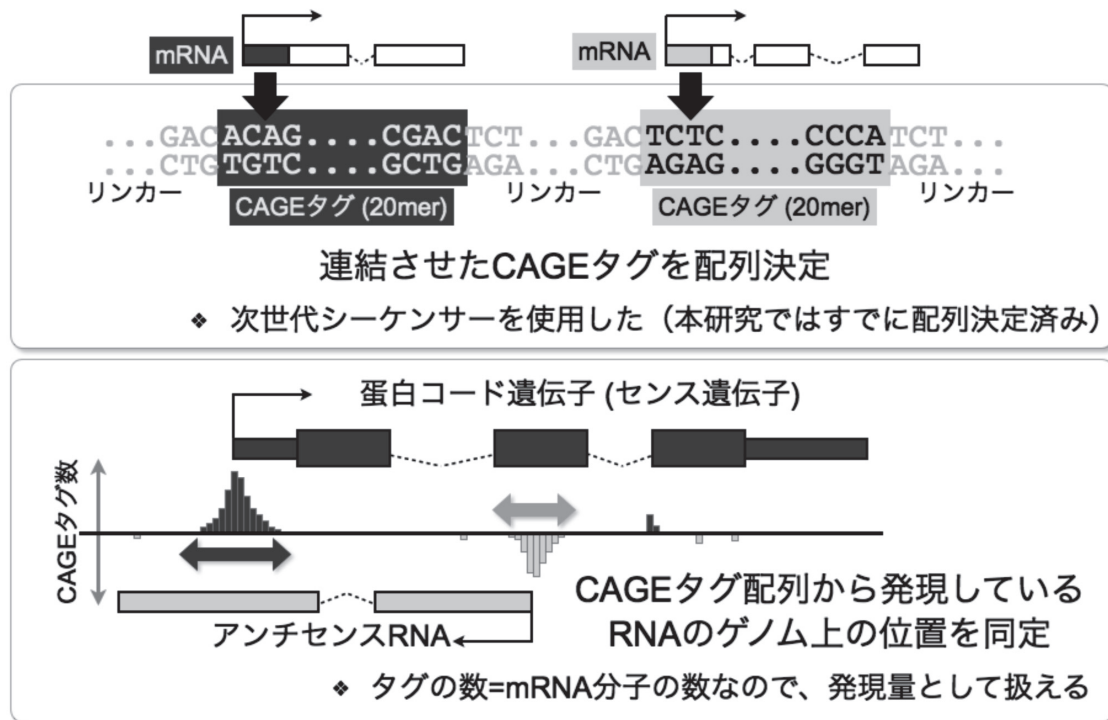


図3. CAGE解析によるアンチセンスRNA同定。

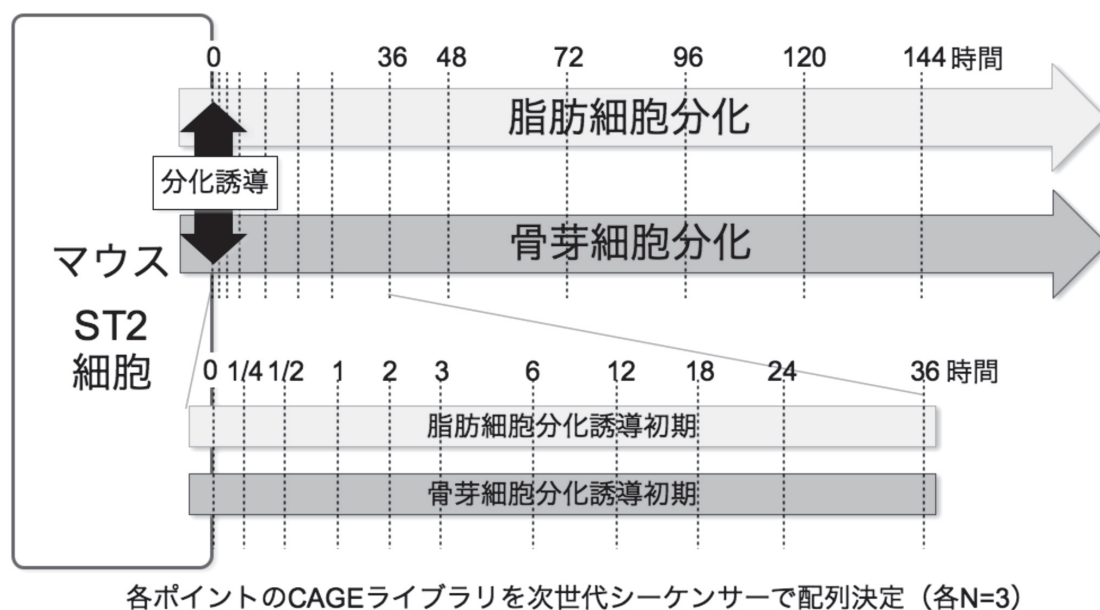


図4. CAGE解析でもちいた時系列発現サンプルの概要。

考 察

本研究では超並列高速シーケンサーをもちいることで、マウスST2細胞から脂肪細胞および骨芽細胞へと分化する過程で時期特異的に発現するアンチセンスRNA群を同定した。数千におよぶ領域で分化特異的に有意な発現変化を示すことが判った。また2方向性の細胞分化でそれぞれ排他的な発現変化をしめすアンチセンスRNAも約60領域で同定することができた。これらの結果から間葉系幹細胞から脂肪細胞・骨芽細胞への分化の過程におけるアンチセンスRNAの役割の大きさが推測される。間葉系幹細胞の発現調節ネットワーク解析に今回のような高精細な時系列データを利用した例は類がなく、同定されたセンス鎖遺伝子-アンチセンスRNAペアの機能解析から老人性骨粗鬆症の新規かつ詳細な発症機序を描出できると考えられる。今後はこれらのセンス鎖遺伝子-アンチセンスRNAペアが2方向性の細胞分化におよぼす影響を解析し、老人性骨粗鬆症および周辺疾患の作用機序モデル構築することで、新たな診断マーカーや創薬標的の開発を目指す予定である。また本研究におけるCAGEデータと解析結果、各種データベース情報の閲覧・解析・公開の統合プラットフォームとしてCAGE Loci Oriented Heatmap (CAGELOH) の公開も現在準備中である。

謝 辞

本研究はゲノム医学研究センタートランスレーショナルリサーチ部門およびゲノム科学部門において実施され、両部門の方々には多くのご助言やご助力をいただいた。この場をお借りして深謝申し上げます。またCAGEデータは理化学研究所横浜研究所オミックス研究基盤およびFANTOMコンソーシアムとの共同研究におこなわれた。今回の学内グラントによる助成および成果発表の機会を得られたことを別所正美学長、医学研究センター 松下祥教授に御礼申し上げます。

研究成果リスト

学会発表

- 1) Nakachi Y, Mizuno Y, Tokuzawa Y, Yamashita Y, Kanesaki-Yatsuka Y and Okazaki Y. Integrated analysis of non-coding RNAs expression during bi-directional differentiation from mouse mesenchymal stem cells to adipocytes/osteoblasts, 生命医薬情報学連合大会 C18_165, 2012年11月10日, 東京都江戸川区
- 2) Nakachi Y, Mizuno Y, Tokuzawa Y, Yamashita Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Okazaki Y. CAGELOH: CAGE Loci Oriented Heatmap platform to analyze and visualize the integrated transcriptome data during

adipocytes/osteoblasts differentiation from mouse mesenchymal stem cells. P31, 第10回RCGMフロンティア国際シンポジウム, 2012年11月3日, 埼玉県日高市

引用文献

- 1) Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* 1999 Apr 1;21(4):400-4.
- 2) Faghihi MA, Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 Sep 1;10(9):637-43.
- 3) Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992 Jun;102(Pt 2):341-51.
- 4) Kajkenova O, Lecka-Czernik B, Gubrij I, Hauser SP, Takahashi K, Parfitt AM, et al. Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia. *J Bone Miner Res* 1997 Nov;12(11):1772-9.
- 5) Nakachi Y, Yagi K, Nikaido I, Bono H, Tonouchi M, Schönbach C, et al. Identification of novel PPARGgamma target genes by integrated analysis of ChIP-on-chip and microarray expression data during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Jul 25;372(2):362-6.
- 6) Tokuzawa Y, Yagi K, Yamashita Y, Nakachi Y, Nikaido I, Bono H, et al. Id4, a New Candidate Gene for Senile Osteoporosis, Acts as a Molecular Switch Promoting Osteoblast Differentiation. *PLoS Genet* 2010 Jul 8;6(7):e1001019.
- 7) Shiraki T, Kondo S, Katayama S, Waki K, Kasukawa T, Kawaji H, et al. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Dec 23;100(26):15776-81.
- 8) The FANTOM Consortium. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science* 2005 Sep 2;309(5740):1559-63.
- 9) Kanamori-Katayama M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Katayama S, Kojima M, et al. Unamplified cap analysis of gene expression on a single-molecule sequencer. *Genome Res* 2011 Jul 1;21(7):1150-9.
- 10) Itoh M, Kojima M, Nagao-Sato S, Saijo E, Lassmann T, Kanamori-Katayama M, et al.

- Automated workflow for preparation of cDNA for cap analysis of gene expression on a single molecule sequencer. PLoS ONE 2012;7(1):e30809.
- 11) Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol 2004;5(10):R80.
- 12) Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat Appl Genet Mol Biol 2004;3:Article3.
- 13) Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. Nucleic Acids Res 2013 Jan;41(Database issue):D36-42.
- 14) Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, et al. Ensembl 2012. Nucleic Acids Res 2012 Jan;40(Database issue):D84-90.
- 15) Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 2000 May 1;25(1):25-9.
- 16) Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Res 2012 Jan;40(Database issue):D109-14.