

26. ヒト形質賦与を目指したノンコーディング RNA の活用

今村 拓也

広島大学 大学院統合生命科学研究科 生命医科学プログラム / 理学部 生物科学科

Key words : エピゲノム, ノンコーディング RNA, 神経幹細胞, 大脳, 遺伝子活性化

緒言

近年の生命科学の発展により、発生過程や組織恒常性維持については老化を制御する、生物間で保存された現象に対する分子・遺伝子レベルの解明が大きく進展した。しかし、例えば、ブタの結腸は円錐型であるのに対し、ウシは円盤型であり、また、ヒト・マウスの胎盤は盤状であるのに対し、イヌ・ネコは帯状であり、ウマ・ブタは散在性を示すなど、表現型は種ごとに多岐にわたるが、その分子基盤解明は黎明期にあると言わざるをえない。ほ乳類において著しく発達した機能を支える脳の場合も同様であり、ヒトでは脳溝・脳回がある一方、マウスではいわゆる平滑脳という形態を示す。例えば、タンパク質をコードする遺伝子配列の類似性は、ヒトとマウスでは85%、ヒトとチンパンジーでは99%など、極めて高い相同性を示すものの、細胞機能や組織・臓器レベルの生体機能における種特異的な性質とは何であるのか、また、個体レベルにおける生物種間との差異は何であるのか、を説明できていない。これらの問いに解答するための、種特異的な制御機構の定性・定量化がもたらすインパクトは計り知れない。

遺伝子セットが進化的によく保存されているにも関わらず動物間で細胞・個体が様々な観点から異なる挙動を示す原因として、転写・翻訳・タンパク質の修飾や分解速度の違い、ncRNAの発現差などが考えられる。いずれのプロセスも転写がなければ成立せず、これまでの膨大な研究結果も機能性分子の調節には転写制御が大事な役割を果たすことを示している。「動物らしさ」を規定する遺伝子発現制御の基盤としては、種特異的エピゲノム修飾や、それを規定する遺伝子制御領域のゲノム配列特異性の存在が想定できるが、ここで大事なことは、ゲノムの98%をも占める遺伝子外領域に目を向けることであると考えており、遺伝子転写のON/OFFや程度を調節するncRNA、さらにはその修飾規定の根源を成す遺伝子発現制御領域配列(レトロトランスポゾン挿入部位や遺伝子自体の配置を含む)に着目することで、遺伝子の制御構造の特徴をよく捉えることが可能となり、種特異性のルール描出に資すると考えられる。

そこで、本課題では、ヒト・非ヒト霊長類・マウスを分ける遺伝子発現制御機構に着目し、種に固有の臓器表現型をもたらす細胞の機能エピゲノムの違いと、それを基礎とした細胞同士の時空間相互作用の違いを、霊長類iPS細胞・脳オルガノイド・マウス個体の高度利用により定量的に解析することとした。特に、種特異的ノンコーディングRNA(ncRNA)と種に従って配置の異なるゲノム領域に着目し、それらの存在の有無が制御下遺伝子群にもたらすインパクトを包括的に定量化し、インパクトの大きいゲノムエレメントを複数選定する。さらに、ゲノム編集によるゲノムエレメント交換実験に向けて、観察される細胞の振る舞いの改変度を多階層に渡って定式化することを目標とした。

方法および結果

1. UCP2はヒトとマウスの神経幹細胞(NSCs)において発現量が大きく異なる

ヒトとマウスのNSCsにおいて発現量が異なる遺伝子を調べるために、Florioら(2015)のRNA-seqデータ[1]を用いた。このデータセットは、マウス胎仔大脳において、 DiI^+ 、 $Prom1^+$ 、 $Tubb3-GFP^-$ の細胞をapical radial glia(aRG)、 DiI^+ 、 $Prom1^-$ 、 $Tubb3-GFP^-$ の細胞をbasal radial glia(bRG)、 DiI^+ 、 $Tubb3-GFP^+$ 、 $Prom1^-$ をニューロンとして選別されている。ヒトの胎児から単離した脳においてもaRGとbRGは、上記マーカーで標識し、さらにG0期に存在するニューロンと、S-G2-M期の神経前駆細胞などをDNA染色により蛍光標識で選別されている。

発現量が大きく異なる遺伝子上位 250 個のうち、Gene Ontology の Human Phenotype カテゴリーに含まれ、代謝に関わっている遺伝子は計 18 遺伝子あった。ヒトとマウスを比較したときに、ヒト NSCs で発現量が多い遺伝子が 11、マウス NSCs で発現量が多い遺伝子が 7 であった。この代謝関連遺伝子の中で、抗酸化応答に働くと考えられる *UCP2* に着目した。*UCP2* の発現量はヒトの神経幹細胞 (aRG) で 396.7 ± 12.75 (TPM) (n=4) であり、マウスの神経幹細胞 (aRG) では 10.62 ± 1.21 (TPM) (n=4) であった。つまり、ヒトではマウスの約 40 倍の発現量を示したことから、ヒト幹細胞において *UCP2* が重要な機能を果たす可能性が想定できた。また、ヒトにおいて分化運命の決定前後で *UCP2* の発現量が増えるか調べる。その結果、ヒトのニューロンでの発現量は、 236.2 (TPM) (n=2) であり、これは神経幹細胞の発現量の 57.7% であった。このことから、ヒトにおいて *UCP2* は幹細胞においてより多く発現していることも分かった。一方、マウスでの *UCP2* のニューロンでの発現量は 28.61 ± 1.25 (TPM) (n=4) であり、これは神経幹細胞の約 3 倍の増加であった。ヒトとマウスで幹細胞期とニューロンでの発現様式が異なっていたことから、ヒトとマウスでそれぞれ異なる制御メカニズムが存在すると考えられた。

2. *UCP2* の KD は神経幹細胞において細胞増殖を減少させる

ヒト iPS 細胞由来のヒト神経幹細胞である AF22 を用い、*UCP2* が神経幹細胞の振る舞いに与える影響について検証した。そのために、shRNA による *UCP2* の KD を行い、EdU の取り込み実験によって細胞増殖率を評価した。shRNA による *UCP2* の発現変化は qRT-PCR によって評価した。その結果、*UCP2*-sh1 で $95.4 \pm 0.250\%$ 発現量が低下し、*UCP2*-sh2 では $79.9 \pm 4.70\%$ 発現量が低下した。つまり、*UCP2*-sh1 では細胞増殖が約 44% 減少し、*UCP2*-sh2 では約 55% 減少したことになる (図 1)。統計処理の結果、*UCP2* を KD することで細胞増殖が有意に減少したと結論付けた。以上のことから、*UCP2* の発現は神経幹細胞の細胞増殖の亢進に関わっていると考えられた。

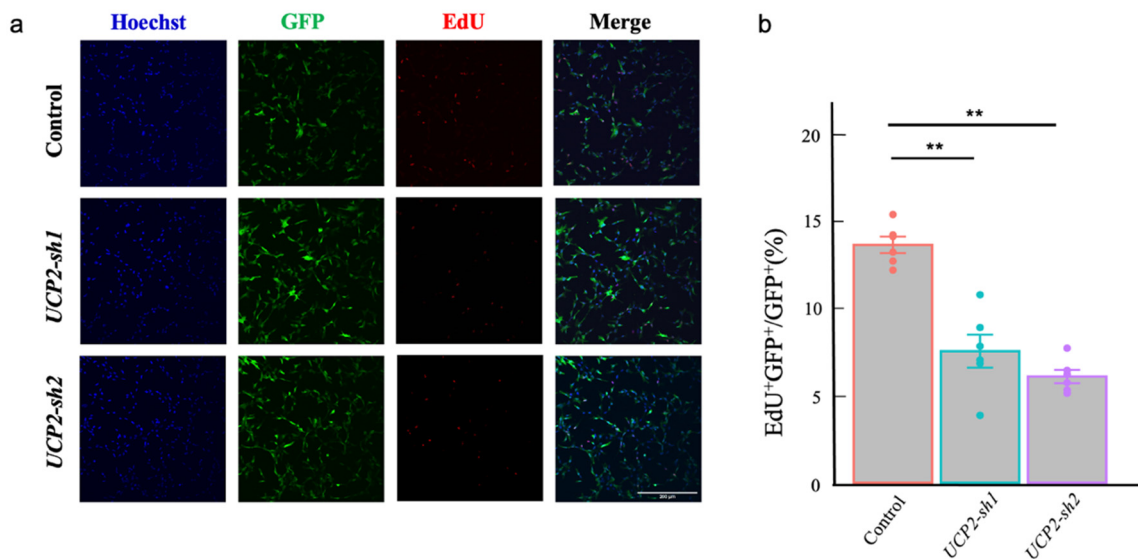


図 1. *UCP2* KD による細胞増殖率の変化

- AF22 における抗体免疫染色の結果。核を Hoechst で染色。GFP は sh ベクターを含むウイルスが感染した細胞。EdU が増殖している細胞。スケールバー : $200 \mu\text{m}$ 。
- 細胞増殖率のグラフ。Control は $13.6 \pm 0.43\%$ 、*UCP2*-sh1 は $7.52 \pm 5.31\%$ 、*UCP2*-sh2 は $6.07 \pm 0.88\%$ であった。n=6、*P<0.05、**P<0.01、テューキーの多群検定。エラーバーは標準誤差を示す。

3. 網羅的遺伝子発現データは *UCP2* の細胞増殖能と細胞生存機能を支持する

UCP2 を KD した場合の遺伝子発現変化を見るために RNA-seq 解析を行った。q 値が 0.05 以下を示す発現変動遺伝子群について GO 解析を行った (n=4)。図 2 に示したように、*UCP2* を KD することで発現量が増えた遺伝子は、

ROS 応答、TORC1 シグナルの負の制御、細胞増殖制御、コレステロール逆輸送・流出やアミノ酸応答などに関連していた。実際に発現量が上昇した遺伝子をみてみると、ストレス応答に関わる Sestrin (*SESN*) 遺伝子ファミリー、細胞死に関係する Fas cell surface death receptor (*FAS*) などがあつた。また、UCP2 の KD によって発現量が減少した遺伝子には、細胞周期の進行、DNA 複製に関わるものが多く挙げられた。実際に発現量が減少した遺伝子をみてみると、chromatin licensing and DNA replication factor 1 (*CDTI*)、cell division and cycle associated 5 (*CDCA5*)、DNA primase subunit 1 (*PRIM1*)、cyclin dependent kinase inhibitor 3 (*CDKN3*) などがあつた。これらのことから、UCP2 の KD によって細胞内シグナルに生じた変化を介して細胞増殖が抑えられ、細胞死が亢進したと考えられた。

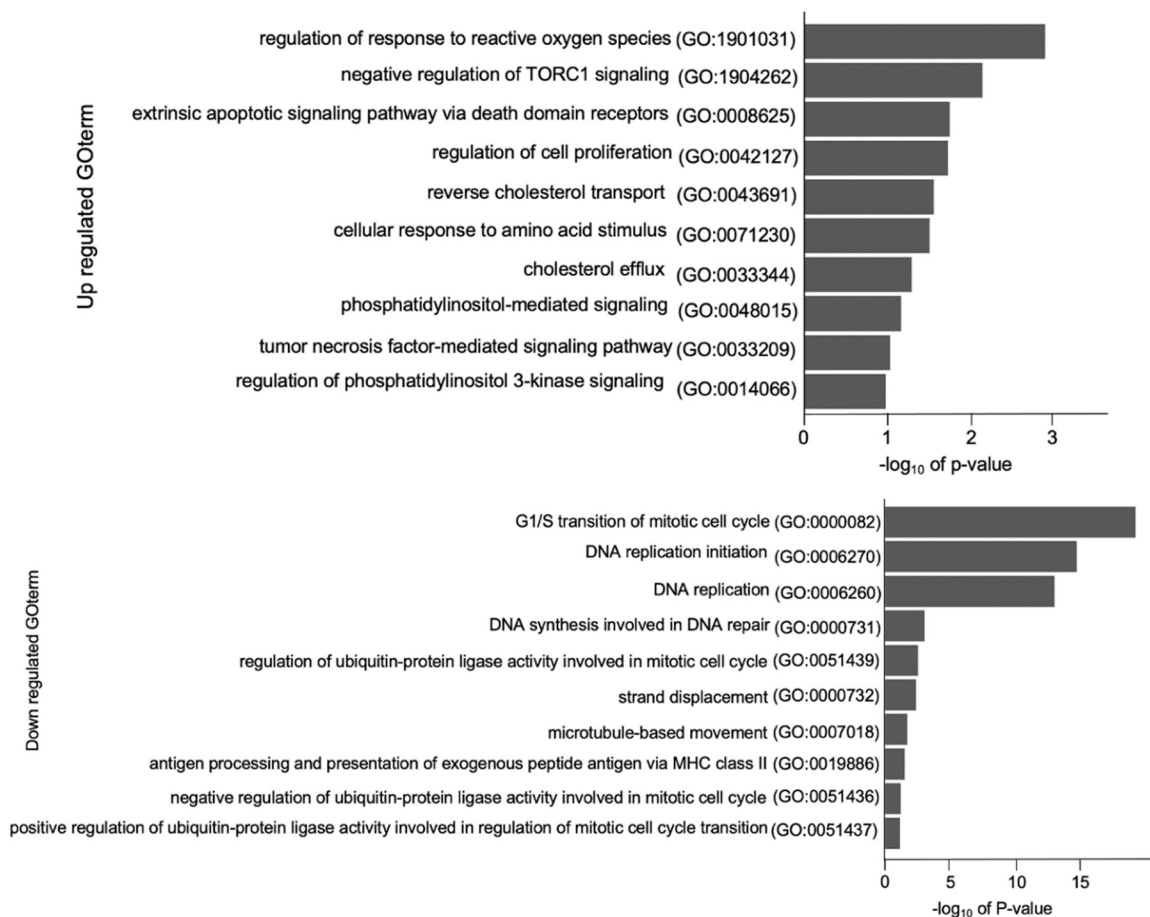


図 2. RNA-seq データの GO ターム解析

UCP2 の KD によって発現量が増加した遺伝子の GOterm 解析結果。横軸は p 値の $-\log_{10}$ をとった値。

4. UCP2 の発現はグルタミン代謝酵素の発現に影響を与える

UCP2 は代謝シフトを促す因子であると考えられている。がん細胞において UCP2 の下流には、解糖系の律速酵素である PFKFB2 の活性化経路が存在する。また、グルコース酸化の変化は、例えばグルタミンの代謝にも関連して影響を与える可能性が考えられる。しかし、RNA-seq 解析では、解糖系の代謝酵素の変化は上位に挙がってこなかった。そこで、神経幹細胞において UCP2 が解糖系酵素の発現に影響を与える可能性を検討するため、UCP2 を KD した AF22 における解糖系関連酵素の発現量を調べた。解糖系に関わる酵素として HK1、PFKFB2、LDHA、グルタミン代謝に関わる酵素として GLS、GLUD1 を調べた。この実験では、KD 効率が高い UCP2_{sh1} を用いてサンプルを製作した。その結果、コントロールでの発現量を 100%としたところ、HK1 では $103 \pm 12.5\%$ 、PFKFB2 では $120 \pm 16.9\%$ 、LDHA では $71.1 \pm 8.68\%$ 、GLS では $64.9 \pm 12.2\%$ 、GLUD1 は $88.1 \pm 9.36\%$ となった (n=3)。標準誤差が大きい、LDHA と GLS は UCP2KD によって発現量が減少するという結果が得られた。この結果は、UCP2 を KD

した AF22 の RNA-seq 解析データとも一致した。

5. ヒト特異的 *pancRNA* を有する CD63 のマウス大脳への強制発現は容積増大をもたらす

図 1 に示したようなヒト iPS 細胞由来の神経幹細胞株 AF22 を用いた EdU の取り込み実験と active Caspase3 抗体染色は、UCP2 以外にも複数並行して進めており、MEIS1、NRSN2、CD63 についても、KD すると細胞増殖の有意な抑制と細胞死の増加傾向が認められた。反対に、子宮内エレクトロポレーションによるマウス胎仔脳への過剰発現から神経幹・前駆細胞の増加傾向が認められた。

例えば、エクソソーム膜で機能することが知られるヒト特異的 *pancRNA* 駆動型遺伝子 CD63 について、マウス大脳発生中の神経幹細胞においてヒト型発現に改変すると、大脳新皮質の層構造のうち、深層ニューロン (Ctip2⁺) の数は変化させずに、浅層ニューロン (Satb2⁺) の数が増大し、さらに、マウスではみられないはずのしわの原基のような構造が、改変当時神経幹細胞だったニューロンにより構築された (図 3)。したがって、*pancRNA* 獲得に伴うこれらの遺伝子の発現量種差は、大脳神経幹細胞増殖変化を介して表現型の違いに寄与してきたことが強く示唆された。

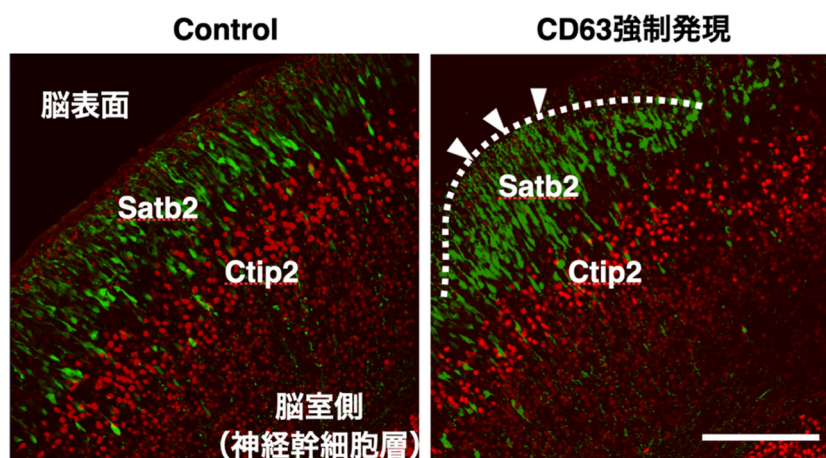


図 3. マウス *in utero* エレクトロポレーションによるヒト型発現模倣の効果
マウス CD63 を胎生 13 日齢の大脳神経幹細胞に強制発現すると、大脳の浅層ニューロンの数が増大する。スケールバー：200 μ m。

考 察

図 1 に示したように、UCP2 を KD することで細胞増殖が抑えられた。UCP2 の発現は細胞内 ATP レベルを介した AMP-activated protein kinase (AMPK) 経路の変化によって細胞周期を回しうることが知られている。実際がんに於いて、UCP2 の発現が AMPK 経路の活性を制御し、細胞増殖を促進するという結果が示されている [2]。しかし、発生の過程においても UCP2 が細胞の増殖に機能するのかわは不明であった。今回、図 2 の GO 解析の結果から、UCP2 の KD によって、例えば ROS の活性を抑える *SESN* 遺伝子ファミリーの発現などが上昇していたことは、正常な発生においても UCP2 依存性の AMPK 経路制御が機能していることを示唆している。この *SESN* は DNA 損傷応答を引き起こす p53 の下流に存在し、AMPK シグナルを正に制御することで、mTORC1 シグナルを抑制し、細胞増殖を抑えてしまう [3]。実際、GO 解析から regulation of response to reactive oxygen species と negative regulation of TORC1 signaling に関する遺伝子がエンリッチしていたことから、UCP2 が存在しない場合には、AMPK 経路からの mTORC1 シグナル抑制と ROS 産生が共役して起こり、ヒト神経幹細胞の増殖が負に制御されてしまうのである。したがって、UCP2 はヒト神経幹細胞において解糖系を優位にすることで、その増殖活性を維持することに機能していると考えられる。

図 2 から、UCP2 を KD するとコレステロールの取り込みに関わる遺伝子の発現が上昇し、神経幹細胞における UCP2 は脂肪酸代謝にも関係することが示唆された。神経幹細胞やがん細胞などの増殖が盛んな細胞では、グルコース

だけではなく脂肪酸やグルタミンの代謝も盛んに行うことで、エネルギー産生や細胞内ホメオスタシス（酸化還元バランス）を維持している [4]。UCP2 は飢餓時などにおいて、グルコース利用から脂肪酸の代謝を促進する働きがあり [5]、UCP2 が脂肪酸のミトコンドリアへの取り込みを修飾する可能性も考えられる。これらのことから、UCP2 の機能を考えるにあたっては、解糖系と酸化的リン酸化のバランスに加えて脂質代謝まで広範にわたった代謝プログラミングを考慮に入れた上で議論していかねばならないだろう。現在そのメカニズムを詳細化するために、脂質代謝の場合、*SCARB1* 遺伝子に着目している。この遺伝子は、コレステロールの取り込みを仲介するタンパク質であり [6]、UCP2 を KD したときに発現量が減少した。現在、UCP2 を KD した効果が *SCARB1* 遺伝子の強制発現にレスキューできるか評価することを計画しており、その他下流遺伝子の意義についても調べることにより、代謝プログラミングの分子実態が明らかになると考えている。

図 3 に示したように、ヒトにありマウスにない *pancRNA* をもつ遺伝子の発現をマウスにおいてヒト型に変換すると、神経幹細胞の増殖促進を介して、脳の体積が増大することを明らかにしつつある。現在機能解析に供与している遺伝子は、膜タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、転写因子、細胞骨格関連分子と多岐に渡っており、マウスとヒトの脳機能を分ける要因は想像以上に多数の遺伝子の発現調節にあることが考えられる。また、種特異的ノンコーディング RNA の獲得は細胞の数だけではなく質（より多様な細胞サブタイプの創出）にも影響を及ぼしている可能性も考えられる。今後はシングルセルレベルの解析を通して、脳の高次化を担う分子群の実態を明らかにしていくことで、マウスに簡便にヒト形質を賦与することが可能となり、創薬技術の飛躍的發展に資するものと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、広島大学大学院統合生命科学研究科の安東明莉と安博洋である。

文 献

- 1) Florio M, Albert M, Taverna E, Namba T, Brandl H, Lewitus E, Haffner C, Sykes A, Wong FK, Peters J, Guhr E, Klemroth S, Prüfer K, Kelso J, Naumann R, Nüsslein I, Dahl A, Lachmann R, Pääbo S, Huttner WB. Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science*. 2015 Mar 27;347(6229):1465–1470. PMID: 25721503 DOI: 10.1126/science.aaa1975
- 2) Yu J, Shi L, Shen X, Zhao Y. UCP2 regulates cholangiocarcinoma cell plasticity via mitochondria-to-AMPK signals. *Biochem Pharmacol*. 2019 Aug;166:174–184. PMID: PMC6631322 DOI: 10.1016/j.bcp.2019.05.017
- 3) Lee JH, Budanov AV, Karin M. Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. *Cell Metab*. 2013 Dec 3;18(6):792–801. PMID: PMC3858445 DOI: 10.1016/j.cmet.2013.08.018
- 4) Yeo H, Lyssiotis CA, Zhang Y, Ying H, Asara JM, Cantley LC, Paik J-H. FoxO3 coordinates metabolic pathways to maintain redox balance in neural stem cells. *EMBO J*. 2013 Oct 2;32(19):2589–2602. PMID: PMC3791369 DOI: 10.1038/emboj.2013.186
- 5) Sheets AR, Fülöp P, Derdák Z, Kassai A, Sabo E, Mark NM, Paragh G, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein-2 modulates the lipid metabolic response to fasting in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Apr;294(4):G1017–24. PMID: PMC2386270 DOI: 10.1152/ajpgi.00016.2008
- 6) Liu Y, Ordovas JM, Gao G, Province M, Straka RJ, Tsai MY, Lai C-Q, Zhang K, Borecki I, Hixson JE, Allison DB, Arnett DK. The *SCARB1* gene is associated with lipid response to dietary and pharmacological interventions. *J Hum Genet*. 2008 Jun 10;53(8):709–717. PMID: PMC3836273 DOI: 10.1007/s10038-008-0302-2