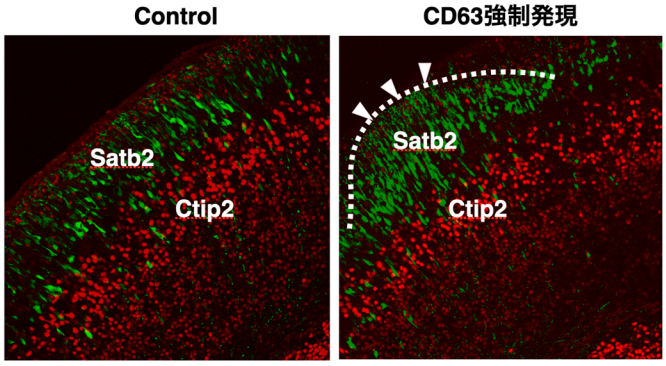
26　ヒト形質賦与を目指したノンコーディングＲＮＡの活用	今村　拓也

【目的】脳の形態学的・機能的な違いは遺伝的に 98%の相同性を示すヒト・サルでも明らかであり、実験動物として汎用されるマウスも、殆どの遺伝子セットを共通に利用していながら、独特な神経系を獲得している。したがって、マウス神経系解析の医療応用には、この難題に対処することが必須となる。タンパクになれないノンコーディング RNA（ncRNA）セットは種間多様度が極めて高いことから、ほ乳類脳の種特異性成立メカニズムにおいては、種特異的な ncRNA が機能することが想定できる。実際に最近、5 種 5 組織の計 25 サンプルの大規模比較トランスクリプトーム解析を行い、種特異的プロモーターncRNA（pancRNA）を進化的に獲得すると、特定の細胞群でのみ遺伝子発現を達成できることを発見していた（Uesaka et al., BMC Genomics, 2017）。pancRNA は研究代表者らが発見した長鎖 ncRNA（lncRNA）であり、下流遺伝子のエピジェネティクスを活性型に変換し下流遺伝子を特異的に発現上昇させることのできる ncRNA である。種を超えて保存されていない配列の獲得が、種特異的 ncRNA 産生／エピジェネティック変換を介して、遺伝子発現スイッチの獲得に至ると考え、本課題ではマウスとヒトの脳神経幹細胞における種特異的 pancRNA を有する遺伝子を網羅的にデータベース化し、機能的意義を明らかにすることとした。

【方法】イルミナ社の Hiseq2500 と HiseqX により、pancRNA と mRNA 発現情報を取得した。pancRNA がヒトにありマウスにない遺伝子として、*MEIS1*、*UCP2*、*NRSN2*、*CD63* を選択し、ヒト神経幹細胞におけるノックダウン（KD）実験と *in utero* エレクトロポレーションによるマウス脳への賦与実験を行った。

【結果】ほ乳類脳の未分化期は代謝経路として解糖系が優位である一方、分化後は酸化的リン酸化を用いる代謝リプログラミングが起こる。ヒトとマウスでは大脳皮質の機能や形態が大きく異なり、種差形成には代謝リプログラミング経路の適応が伴っていることが想定される。そこで、ヒト特異的 pancRNA 駆動型遺伝子として同定できたミトコンドリア内膜のタンパク質 Mitochondrial uncoupling protein 2（UCP2）について、ヒト神経幹細胞における KD によりマウス型遺伝子発現を模倣する解析を行った。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 抗体染色から、UCP2 あるいは pancRNA を KD すると、いずれも細胞増殖の有意な抑制と細胞死の増加傾向が認められ、この結果は KD サンプルの RNA-seq データにも支持された。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マウス Ucp2 過剰発現から神経幹・前駆細胞の増加傾向が認められた。同様に、 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を模倣すると、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（下図）。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差異形成に寄与してきたことが強く示唆された。

ヒト特異的 pancRNA を有する遺伝子 *CD63* の強制発現によるマウス大脳の拡大



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ひ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^{+}、$Prom1^{+}$、$Tubb3\text{-}GFP^{-}$の細胞を apical ragial glia（aRG）、DiI^{+}、$Prom1^{-}$、$Tubb3\text{-}GFP^{-}$の細胞を basal ragial glia（bRG）、DiI^{+}、$Tubb3\text{-}GFP^{+}$、$Prom1^{-}$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される*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の発現量が変化するかも調べた。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±0.250%発現量が低下し、UCP2-sh2では79.9±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。

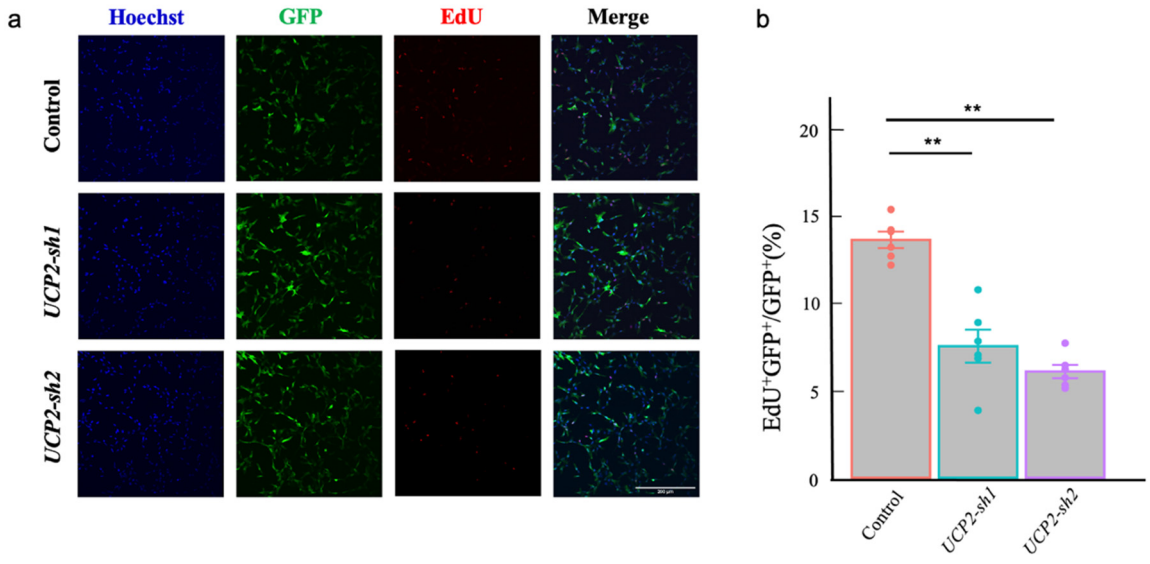


図1. UCP2 KDによる細胞増殖率の変化

a) 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：200μm。

b) 細胞増殖率のグラフ。Controlは13.6±0.43%、UCP2_sh1は7.52±5.31%、UCP2_sh2は6.07±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上昇した遺伝子は、

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*）などがあった。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（*CDT1*）、cell division and cycle associated 5（*CDCA5*）、DNA primase subunit 1（*PRIM1*）、cyclin dependent kinase inhibitor 3（*CDKN3*）などがあった。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。

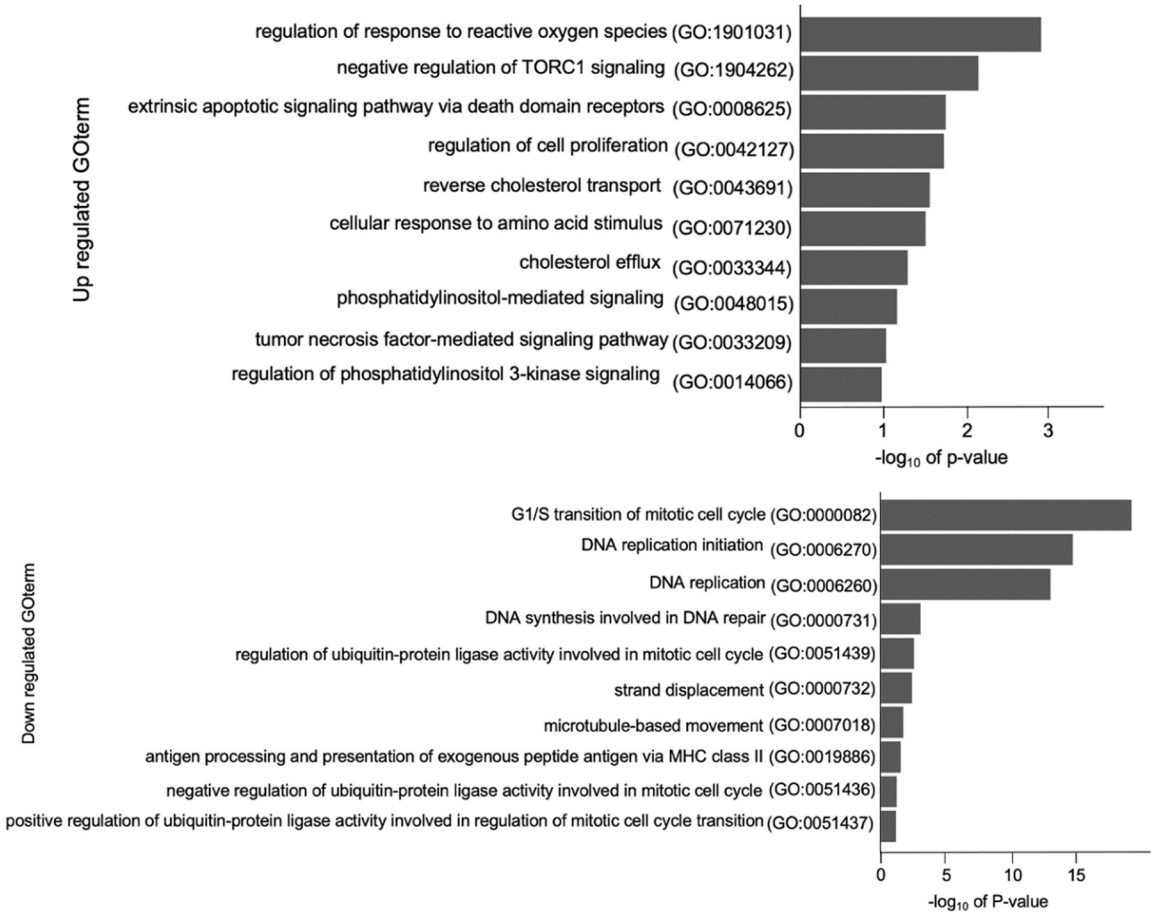


図 2. RNA-seq データの GO ターム解析

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―log10 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連関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作製した。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±12.5%、PFKFB2 では 120±16.9%、LDHA では 71.1±8.68%、GLS では 64.9±12.2%、GLUD1 は 88.1±9.36%となった（n=3）。標準誤差が大きいが、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。

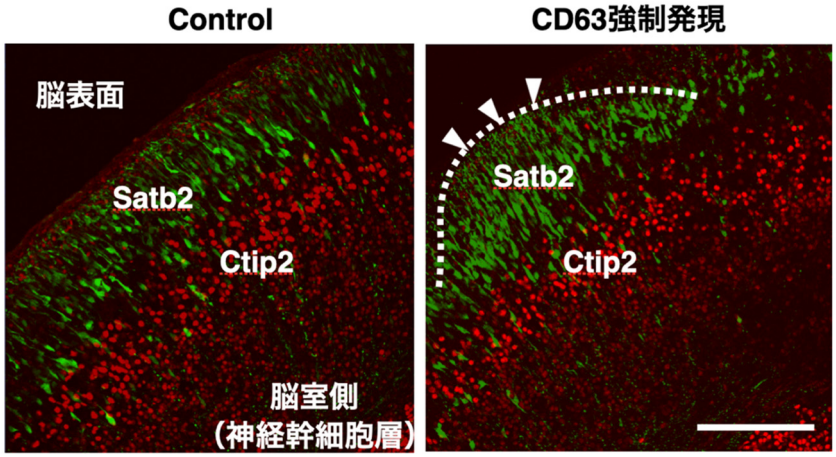


図3. マウス *in utero* エレクトロポレーションによるヒト型発現模倣の効果
マウスCD63を胎生13日齢の大脳神経幹細胞に強制発現すると、大脳の浅層ニューロンの数が増大する。スケールバー：200μm。

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。実際にがんにおいて、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リ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、代謝リ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、創薬技術の飛躍的発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. PMCID: 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. PMCID: 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. PMCID: 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. PMCID: 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. PMCID: PMC3836273 DOI: 10.1007/s10038-008-0302-2