

## RNA 干渉法 (RNAi) を用いた培養細胞の骨格筋細胞への分化阻害

芋川 浩\*

### Differentiation inhibition of cultured mononucleated myocytes by RNA interference (RNAi)

Yutaka IMOKAWA

#### 要 旨

**<目的>** mRNA は DNA より転写された 1 本鎖の構造をもち、タンパク質への遺伝情報の伝達役として、ゲノム中の数%のみが mRNA に転写されると考えられてきた。しかし、最近のゲノム解析から、70%以上のゲノム DNA が転写され、タンパク質には翻訳されないが、生命現象に重要な働きをもつことが明らかになってきた。その一つは RNA 干渉 (RNAi) と呼ばれ、現在医療・看護技術・医薬品への応用が大いに期待されているものである。そこで、イモリの培養細胞系を用いて、特定分子の遺伝子発現制御による細胞分化過程の制御を RNAi を利用し解析してみた。

**<結果>** 筋分化に重要な働きをされると考えられる長鎖ミオシンの二本鎖 RNA(dsRNA) を作成し、単核筋芽細胞が多核の筋管細胞へ分化する培養細胞系での RNAi 効果を解析した。その結果、長鎖ミオシンの二本鎖 RNA は培養細胞系において単核筋芽細胞の筋管細胞への分化を強く抑制できることがわかった。

**<考察>** イモリでは、これまで RNAi 解析がほとんどなされておらず、今回の研究により、イモリにおいても RNAi により遺伝子発現調節が哺乳動物など他の脊椎動物同様に行われていることが明らかとなった。これはイモリの再生機構のメカニズム解明に大いに役立つばかりではなく、今後の創傷治癒や再生医療への応用にも役立つものと思われる。

キーワード：分化 RNA 干渉法 培養細胞 遺伝子発現 医療への応用

#### 緒 言

ヒトゲノムの中で、タンパク質をコードする遺伝子は数%であり、残りは不要な DNA と考えられてきた。しかし、最近のゲノム解析から、この不要と考えられてきた DNA の大半もタンパク質には翻訳されないが、転写され、生命現象に重要な機能をもつ ncRNA(non-coding RNA) として機能していることが明らかになってきた(多比良ら, 2004; 塩見ら, 2004)。また、クリックにより唱えられた「セントラルドグマ」によっても、RNA は DNA 内にある遺伝情報をタンパク質に変換するための道具であり、1 本鎖として機能すると考えられていた。しかし、Fire, Xu, Montgomery

ほか(1998)によって、線虫で RNA 干渉 (RNAi) が発見され、その分子機構が解明されるにつれて、これまで全く注目されていなかった 21 ~ 24 塩基程度の小さな RNA(microRNA, mcRNA) は 2 本鎖構造をもち、ヒトをはじめとしたほとんどの生物において遺伝子発現制御の活性を持つことが明らかとなってきたのである(廣瀬哲郎ら, 2009)。この RNAi に関わる 21 ~ 24 塩基程度の小さな RNA には、これまでにマイクロ RNA(microRNA, miRNA)、パイ RNA(PIWI-interacting RNA, piRNA) などが見つかったが、どの種の RNA も 2 本鎖構造をしており、2 本鎖 RNA(double strand RNA, dsRNA) として遺伝子発

\*福岡県立大学看護学部基盤看護学系  
Faculty of Nursing, Fukuoka Prefectural University

連絡先: 〒825-8585 福岡県田川市伊田4395番地  
福岡県立大学 看護学部 基盤看護学系 芋川 浩  
E-mail: imokawa@fukuoka-pu.ac.jp

現制御に関わっている。

この RNAi のメカニズムを利用した核酸医薬である RNAi 医薬は、創薬・医薬品開発における新しい手法として注目されており、疾患の原因となるタンパク質を作り出す遺伝子 (mRNA) に直接かつ選択的に作用することにより、これら病原タンパク質の産生を副作用も少なく抑制できると考えられている。すなわち、RNAi 医薬は、これまでとは根本的に異なる方法で疾患を治療できるため、特に疾病や感染症などの治療に非常に有用であり、医療・看護技術への応用も大いに期待されており、現在臨床試験も含めた研究が活発に行われている。従って、大学病院などにおいては、看護の現場においても広く利用されうるものと思われる。

そこで、本研究では、培養細胞系を用いて (Imokawa, Gates, Chang, Simon, and Brockes, 2004), 特定の分子の発現制御による細胞の分化過程の制御を RNAi を用いて解析してみた。

## 方 法

### 1. 培養細胞

培養細胞としては、アメリカ産ブチイモリより確立した A1 細胞という単核筋芽細胞を使用した。A1 細胞の培養方法は過去文献に詳細に報告されている (Kumar, Velloso, Imokawa, and Brockes, 2000; Imokawa et al., 2004)。両生類用として 75% 希釈された 10% 牛胎児血清入り MEM 培地 (高血清培地, HS 培地) をもちいて維持し、3-5 日ごとに継代する。この A1 細胞を骨格筋細胞 (多核筋管細胞) への分化誘導させる場合は、牛胎児血清を 2% に下げた両生類用 MEM (低血清培地, LS 培地) をもちいた。また、細胞は常に 25°C, 2% CO<sub>2</sub> の環境下で培養された。

### 2. 対象遺伝子

使用した遺伝子は、イモリの長鎖ミオシン遺伝子であり、骨格筋細胞 (多核筋管細胞) の分化に重要な働きをする分子である (Kumar et al., 2000; Imokawa et al., 2004)。また、対照実験としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を使用した。どちらも、3' 非翻訳領域 (3' UTR 領域) の 200 塩基対の領域を利用した。

### 3. 2 本鎖 RNA の作成

2 本鎖 RNA (dsRNA) の作成は RNAi 専門雑誌にされた文献中の方法に従って行った (Shao-YaoYing ら, 2006)。dsRNA は、イモリの長鎖ミオシン遺伝子特異的な 3' UTR 領域の 200 塩基対の領域を利用した。

### 4. 細胞の免疫組織化学的染色

長鎖ミオシンの染色は以前の文献と全く同様に行った (Kumar et al., 2000; Imokawa et al., 2004)。

## 結 果

GFP の 2 本鎖 RNA (GFP dsRNA) を加えた LS 培地で A1 細胞を 3-4 日間培養したところ、A1 細胞は通常の LS 培地下で 3-4 日間培養されたときと同様に、多くの多核筋管細胞に分化していた (図 1 A)。さらに、その筋管細胞を長鎖ミオシン特異的な抗体で染色したところ、図 1 B で示されるように、GFP dsRNA 存在下で分化した A1 細胞から形成された筋管細胞には多量の長鎖ミオシンが発現しており、骨格筋細胞として終末分化していることが明らかとなった。それに対し、長鎖ミオシンの dsRNA を加えた LS 培地で A1 細胞を 3-4 日間培養したところ、A1 細胞は、骨格筋細胞への分化誘導培地である LS 培地下においても、2 本鎖 GFP RNA を加えた LS 培地での状態と比較して、有意に多核筋管細胞の数が少なくなっていた (図 1 C)。その上、2 本鎖長鎖ミオシン RNA 存在下で培養された A1 細胞を長鎖ミオシン特異的な抗体で染色した結果、赤く蛍光染色される筋管細胞が対照実験である 2 本鎖 GFP RNA 存在下で培養された A1 細胞と比較して非常に少なくなっていることもわかった (図 1 D)。

また、A1 細胞を HS 培地のまま 3-4 日間培養し、多核筋管細胞への分化誘導をかけなかった A1 細胞は、単核細胞が非常に込み合った状態にはなっているものの、2% 程度しか多核筋管細胞へ分化していなかった (図 1 E-F)。この状態は、図 1 C-D とよく似た状態であり、2 本鎖長鎖ミオシン RNA 存在下で培養された A1 細胞は多核筋管細胞への分化が dsRNA により抑制されていることを示している。

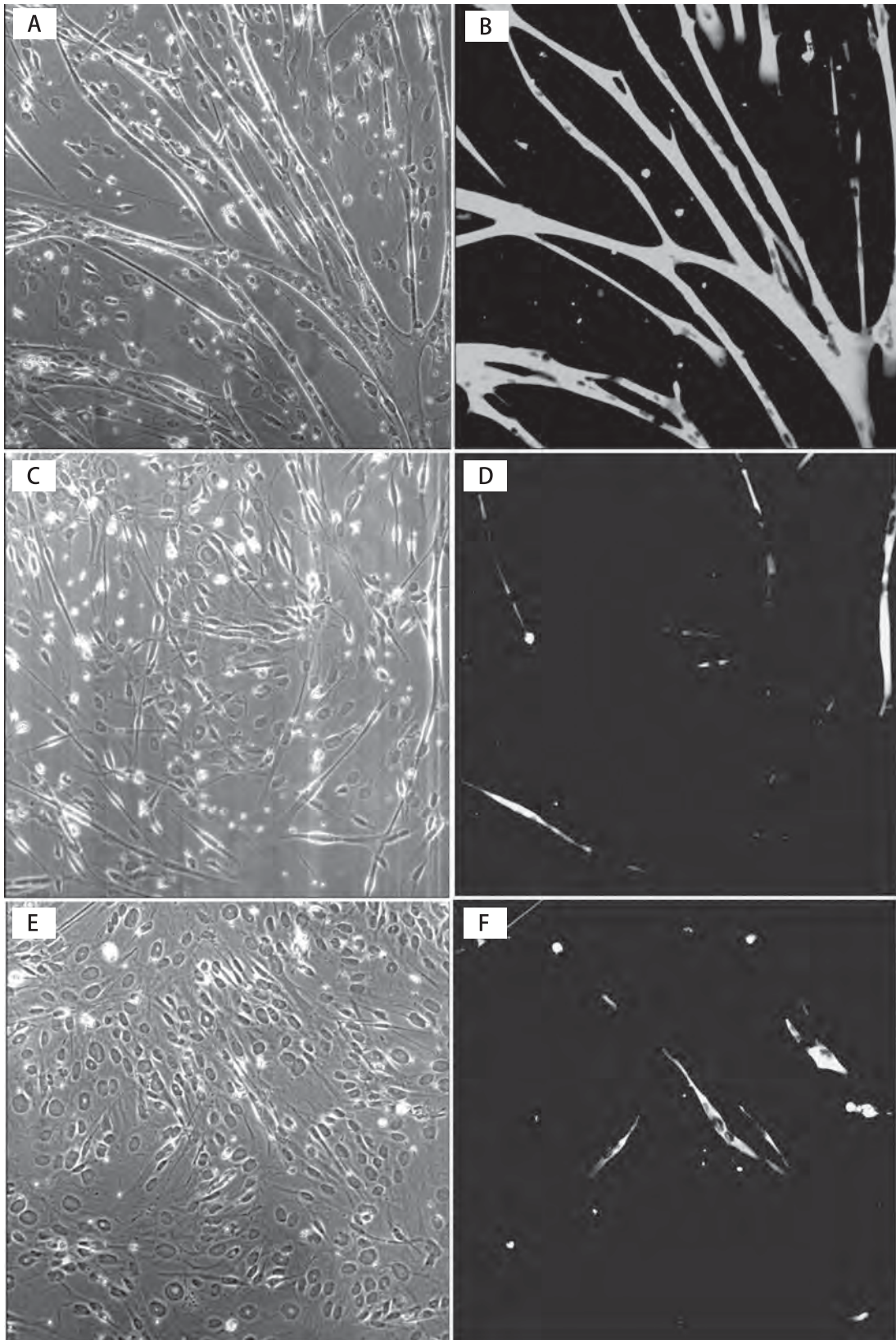


図1 長鎖ミオシン dsRNA による多核筋管細胞への分化抑制

A-B; GFPdsRNA が添加された LS 培地下で分化誘導された多核筋管細胞, C-D; 長鎖ミオシン dsRNA が添加された LS 培地下で培養された A1 細胞, E-F; HS 培地で培養された A1 細胞, A, C, E; 位相差顕微鏡像, B, D, F; 抗長鎖ミオシン抗体を用いた蛍光染色 (赤). 長鎖ミオシン dsRNA の添加により, LS 培地下でも A1 細胞の多核筋管細胞への分化が抑制されていることがわかる.

考 察・結 論

近年、世界中の研究者が協力して実施したヒトゲノムプロジェクトも終了し、ヒトの全ゲノム配列が解明された。それに伴い、ポストゲノムとして、ゲノム配列から推測される遺伝子の機能やタンパク質の改変が、新しい医療技術の開発として進んできている。そのひとつとして、タンパク質を翻訳していない non-coding RNA が非常に多くの生命現象を調節しており、かつゲノムの中の大半の遺伝情報がこの ncRNA として転写されており、2本鎖 RNA(dsRNA) となつて、多くの生命現象、特に遺伝子の発現制御に重要な働きをしていることが明らかとなりつつある。それに伴い、その dsRNA をもちいた創薬が21世紀の薬として非常に注目されており、世界中の製薬会社が効果的な新しい治療薬の開発を目指し研究を進めている上、すでに医療現場でも dsRNA を用いた治療薬の実用化に向けた臨床試験も行われ始めている。しかしながら、この RNA 研究はまだはじまったばかりであり、未知の部分も非常に多く、今後の本格的な臨床応用のためにはさらに多くの研究が行われなくてはならない状態でもある。その中で、今回の研究は、ヒトと同じ脊椎動物ではあるが、イモリという実験動物においては、まだ dsRNA の研究がほとんどなされていないため、現在言われている RNAi 効果などが未だ明らかとなっていない。さらに、イモリ培養細胞を用いた研究では、RNAi についての研究が全くなされていないのが現状であった。イモリは手足や眼球内の水晶体を再生できる唯一の脊椎動物であり、そのメカニズムの解明にも、この RNAi 法が有用であると考えられる。そこで、今回イモリ培養細胞の分化誘導現象を利用して、dsRNA の遺伝子発現抑制効果を調べてみた結果、イモリの場合においても、他の脊椎動物と同様に dsRNA が有効な遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかとなったのである(図 1A-D)。この研究は、トランスジェニックやノックアウトという技術が十分に使えないイモリにおいて、RNAi 法により遺伝子発現を部位特異的、時間特異的に調節できることを示している。つまり、この RNAi 法は手足を再生できるイモリ再生現象の調節メカニズムの解明に利用可能であることが示されたのである(吉里ら, 1996; Stocum, 2006; Carlson, 2007)。この RNAi 法を用いて、イ

モリの再生現象の分子的解析が大きく進むことは、創傷治療学など将来の再生医療の発展に大きく貢献できるものと期待できる。

文 献

Carlson, B.M. (2007). *Principles of regenerative biology*. London: Elsevier.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-11.

廣瀬哲郎編 (2009). *眠りから覚めた RNA*. 細胞工学. 28(2). 東京. 秀潤社.

Imokawa, Y. Gates, P. B. Chang, Y-T. Simon, H-G. and Brockes, J. P. (2004). Distinctive Expression of Myf-5 in Relation to Differentiation and Plasticity of Newt Muscle Cells. *International Journal of Developmental Biology*, 48, 285-291.

Kumar, A. Velloso, C. P. Imokawa, Y. and Brockes, J. P. (2000). Plasticity of Retrovirus-Labelled Myotubes in the Newt Limb Regeneration Blastema. *Developmental Biology*. 218, 125-136.

Shao-YaoYing 編 (2006). *microRNA 実験プロトコール*. 東京. 羊土社.

塩見春彦編 (2004). *RNAi のサイエンス*. 蛋白質核酸酵素. 49 (16). 東京. 共立出版.

Stocum, D.L. (2006). *Regenerative biology and medicine*. London: Elsevier.

多比良和誠編 (2004). *RNAi のサイエンス*. 実験医学. 22(4). 東京. 羊土社.

吉里勝利編 (1996) *再生-避るしくみ*, 東京, 羊土社.

受付 2009. 5. 25

採用 2009. 10. 29