

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	細胞分化に関与するノンコーディングRNAの全ゲノム解析
研究機関・部局・職名	独立行政法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 副センター長
氏名	カルニンチ・ピエロ

【研究目的】

ncRNA、解明されていないゲノムの主要部位 ハイスループットトランスクリプトミクス技術と、FANTOM や ENCODE プロジェクトによる大規模なコンソーシアムの努力により、哺乳動物のゲノム上では、様々な段階の転写が広範囲で重複して起こることが、今では広く受け入れられている。しかしながら、哺乳動物ゲノムが長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA) を大量に産生することと、その生物学的経路における意味については、完全には解明されていない。lncRNA には、intergenic ncRNA、アンチセンス ncRNA、レトロトランスポゾンエレメント (RE) から生じる ncRNA が含まれる。最近我々は、膨大な量の RE が ncRNA のプロモーター (>200,000)、または mRNA の選択的プロモーターとして使われていることを報告した (Faulkner et al., Nat. Genet., 2009)。重要なことに、RE の示す発現パターンは、組織と発生ステージに特異的であった。特定の RE から生じた ncRNA は、胚性幹 (ES) 細胞に多く発現し、分化とともに発現は見られなくなった (Cloonan et al., Nat. Meth., 2009)。RE の大量発現は、ES 細胞の顕著な特徴であるが (Santoni et al., Retrovirology, 2012; Macfarlan et al., Nature, 2012)、分化によって RE の発現は減少する (Friedli et al., Genome Res., 2014)。

細胞リプログラミングにおける ncRNA の機能解明 iPS 細胞樹立に代表される細胞リプログラミングや、それに続く分化は、大部分が未解明である「エピゲノム制御」によって制限される。これについては、一般的なエフェクター (ヒストン修飾やポリコムタンパク質など) や DNA 修飾 (CpG メチル化) しか知られていない。いくつかの ncRNA はエピゲノムの制御に関与しているが (Gupta et al., Nature, 2010)、ほとんどの ncRNA の役割は解明されていない。この研究課題は、RE エレメントから生じるものも含めた ncRNA の発見、これら ncRNA の細胞における役割と機能の解明、そして、これらをツールとして現代科学の新たな分野である再生医療に役立てるまでのギャップを埋めることを目的としている。

計画は以下のとおりである。

- (1) iPS/ES 細胞における、lncRNA 発現の網羅的なマッピング
- (2) これら lncRNA の、ノックダウンとノックイン手法を用いた実験による機能スクリーニング

【総合評価】	
	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】	
① 総合所見	
<p>本研究課題は、研究代表者らが独自に開発したトランスクリプトーム解析技術を活用して、ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞の多能性と増殖性、あるいは幹細胞からの分化過程に、ノンコーディング RNA (ncRNA) が寄与しているかどうかをゲノムワイドに解析しようとするものである。研究は順調に進んでおり、レトロトランスポゾン由来の ncRNA が幹細胞の維持や分化に関与するという非常に興味深い成果が得られている。また、ノックダウンおよび過剰発現による ncRNA の機能解析に関するデータの蓄積が進められ、興味深い成果も得られているが、これらについての因果関係の検証が今後重要になる。分化、脱分化における特定の ncRNA の発現の上昇あるいは減少が、分化、脱分化の原因であるのか結果であるのかを区別することは非常に重要な課題であり、確認のための方法の検討が必要である。</p> <p>この分野は、エピゲノム解析などを含めて国際的にめざましい発展を遂げている。他の競合相手に対する優位性を今後確保していくためにも、CAGE 解析に加えて、ncRNA の機能解析を深化させるためには、さらにもう一つの優位性のある研究手法を開発することが必要と考えられる。今後の更なる発展を期待したい。</p>	

② 目的の達成状況	
<p>・所期の目的が <input checked="" type="checkbox"/> 全て達成された ・ <input type="checkbox"/> 一部達成された ・ <input type="checkbox"/> 達成されなかった)</p>	
<p>本研究課題は、研究代表者らが独自に開発したトランスクリプトーム解析技術を活用して、ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞の多能性と増殖性、あるいは幹細胞からの分化過程に、ノンコーディング RNA (ncRNA) が寄与しているかどうかをゲノムワイドに解析しようとするものである。5つの具体的な目標を設定して取り組んだ。</p> <p>この内、幹細胞を材料とした網羅的な ncRNA のゲノムマッピングについては、データ生産と情報学的解析が完了し、幹細胞に特徴的な ncRNA として、レトロトランスポゾン由来のものが有意に多く含まれるという発見があった。</p> <p>ncRNA の解析方法の開発については十分な成果が得られている。Cap-Analysis Gene Expression (CAGE)法による ncRNA の解析法の標準化や自動化には顕著な進歩が見られた。CAGE 法を用いた転写開始位置情報のカタログ化、RNA-seq による発現プロファイリングのデータ蓄積は着実に進んできており、大きく同分野の研究開発に貢献することは間違いない。</p>	

次に、検出した ncRNA の機能解析という研究目標については、新規な幹細胞特異的な転写産物を、Non-Annotated-Stem-Transcript (NASTs)と定義して、siRNA によるマウス iPS 細胞を対象にしたノックダウン実験を行い、一部の ncRNA に幹細胞性の指標である Nanog 遺伝子の発現低下を引き起こす可能性が示された。極めて興味深く新規性の高いものであり、研究は高い成果を挙げたと言える。

今後の研究は、網羅的に獲得したトランスクリプトームデータから如何にして、幹細胞性の維持や幹細胞からの分化過程に働く ncRNA を効率良く抽出するかにかかっている。このためには、幹細胞や MEF への throughput の高い遺伝子導入法や信頼性の高いアッセイ系が重要であるが、そのための独自の的方法論については今後の課題である。また、ES 細胞と iPS 細胞の幹細胞性の違いや幹細胞の種差の問題も研究を進める上では、避けて通れない問題と思うが、その点についても留意すべきである。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

網羅的なトランスクリプトーム解析技術自体は、本研究課題の以前にすでに研究代表者らによって確立された技術であり、本研究課題の成果ではないが、研究代表者らの開発技術を用い、iPS および ES 細胞の網羅的な転写開始点の情報、RNA-seq による発現情報は、非常に優位性のあるデータ蓄積となることは間違いない。情報解析による幹細胞特異的な転写産物の同定も進んでおり、レトロトランスポゾンから転写された ncRNA が幹細胞で高頻度に見出されたことは、先進的な発見である。

ブレークスルーは、今後の ncRNA の機能解析の結果に依存すると考えられる。目標である ncRNA による細胞の多能性制御手法の確立に向けたデータの蓄積は進みつつあると考えられる。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

レトロトランスポゾン由来の ncRNA の機能解析の結果によっては、大きな進展が期待できる。本研究によるデータベースについては、iPS 細胞樹立への引き金になった例もあり、今後の関連分野の進展への寄与は大きい。

研究代表者らの目標が達成されるなら、特に医療分野におけるインパクトは大きいと期待される。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (■行われた ・ □行われなかった)

研究計画は概ね妥当である。実施体制についても、3つのチームと他の理研グループとの共同研究による実施体制は良く連携が取れており、マネジメントを含めて大きな問題は無い。助成金の活用についても大きな問題は無い。指摘事項についての対応状況は、全体的には適切と思われるが、この分野は国際的にも競争が一段と激しくなっており、他のグループに対しての優位性を如何に示すかについては、更に検討が必要である。

本研究課題によるオリジナルな研究成果については、Nature Genetics2014 に発表されており、今後の更なる発表が期待できる。

アウトリーチ活動については理化学研究所横浜研究所でのサイエンスカフェや近隣の高等学校での文化祭参加（展示）などで効果的に実施している。