

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19275

研究課題名（和文）非破壊的に生細胞のトランスクリプトームの経時変化を追跡する技術の開発

研究課題名（英文）Development of a non-destructive method to track the transcriptome of living cells across time

研究代表者

大川 恭行（Yasuyuki, Ohkawa）

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80448430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：個体の表現型は、発生、分化により成立し、老化や死に至る崩壊までダイナミックに変化する。トランスクリプトーム解析は、変化する表現型解析において最も状態を反映する情報としてこれまで汎用されてきた。一方で、現在のトランスクリプトーム解析は、細胞を破壊しRNAを抽出する必要があるため、同一の細胞の変化を追跡することはできない。そこで、本研究では、細胞が分泌するエクソソームに含まれる微量なRNAと内在性のRNAが相関する独自の先行知見に基づき、生細胞の非破壊的 RNAseq法の開発を進めた。プロジェクトを順調に終え、さまざまな検体による応用をすすめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が基盤とする技術は微量RNA操作技術である。現在単一細胞トランスクリプトームが注目を浴びる中、その多くはキット化された商用プラットフォームに依存しており汎用的な反面、微量RNAを操作する場面で研究者から奪っている一面が存在する。本研究が行うごく少量のRNAを扱う基礎技術のプロトコル化と普及は次の新たな解析技術の基盤となる基礎研究能力の喪失を防ぎ、今後のニーズに即した研究基盤の強化につながると考えている。

研究成果の概要（英文）：The phenotype of an individual is established through development and differentiation and changes dynamically until it decays, leading to aging and death. Transcriptome analysis has been widely used as the information that best reflects the state of the changing phenotype. On the other hand, current transcriptome analysis cannot follow changes in the same cell because it requires the destruction of the cell and extraction of RNA. In this study, we developed a non-destructive RNAseq method for living cells based on our own previous findings that endogenous RNA correlates with a small amount of RNA contained in exosomes secreted by cells. The project has been successfully completed and is now being applied to a variety of samples.

研究分野：トランスクリプトミクス

キーワード：トランスクリプトーム ライブセル 系譜追跡技術

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスクリプトーム解析の長年にして大きな欠点は、経時変化の解析ができないスナップショットであるという点である。RNA はタンパク質をコードする遺伝子発現の中間体として情報伝達分室としての側面と、ノンコーディング RNA として生体内のさまざまな機能をもつ側面が存在する。これら量的な変動は細胞の変動を表現型の変化に現れる前に評価できる有効な手段であった。一方で、細胞や個体の変化は、細胞あるいは個体によって“ゆらぎ”が存在しており、生体におけるトランスクリプトーム変化は統計的な手法による集団平均の解析が不可欠であった。

2. 研究の目的

個体の表現型は、発生、分化により成立し、老化や死に至る崩壊までダイナミックに変化する。トランスクリプトーム解析は、変化する表現型解析において最も状態を反映する情報としてこれまで汎用されてきた。特に次世代シーケンサー技術の発展により、トランスクリプトーム解析が組織レベルから単一細胞レベルまで解析が可能となり生体の表現型を細胞レベルまで明らかにすることが可能となった。一方で、現在のトランスクリプトーム解析は、細胞を破壊し RNA を抽出する必要があるため、同一の細胞の変化を追跡することはできないすなわち、トランスクリプトームに基づく表現型の変化は集団を用いた統計的な推測であり、実追跡に基づいた解析はほとんどなされていない。そこで、本研究では、細胞が分泌するエクソソームに含まれる微量な RNA と内在性の RNA が相関する独自の先行知見に基づき、生細胞の非破壊的 RNAseq 法 (ライブセル RNAseq 法) を開発する。バルクでの解析を端緒として最終的には単一細胞レベル技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

Goal: 生細胞を非破壊的にトランスクリプトーム解析し、真の経時変化を明らかにする。

細胞は、エクソソームと呼ばれる細胞外分泌小胞を産生する。特に、エクソソームは細胞質の様々な物質を含んでおり微量に RNA を含有していることが知られているが、その解明はほとんど進んでいない。申請者はエクソソームの専門家である星野歩子 (東工大・研究協力者) との連携でエクソソームに含まれる RNA の解析を行ってきた。驚くべきことに、細胞外に分泌されたエクソソームに含有される RNA と内在性の RNA はほぼ同一であり、miRNA のような小分子からタンパク質をコードする長鎖の RNA まで極めて高い量的相関まで認められた (未発表、発表準備中)。これまでに、生体のほぼすべての細胞がすべからくある一定の割合のエクソソームを分泌することが明らかとなっている。そこで、申請者は先行知見を基に、細胞外のエクソソームに含まれる極微量の RNA を安定的に解析する手法を確立することで生細胞の非破壊的 RNAseq 法 (ライブセル RNAseq 法) を開発する。培養細胞レベルで細胞集団の解析をする手法を Aim1 として開発し、Aim2 では、個々の細胞をバーコード技術で識別し、分泌した個々のエクソソームを単一エクソソーム RNA 解析することで、単一細胞レベルのライブセル RNAseq 法の開発を行う。これら技術が完成された場合、マウスを用いた個体レベルの解析にも挑戦する。

4. 研究成果

個体の表現型は、発生、分化により成立し、老化や死に至る崩壊までダイナミックに変化する。トランスクリプトーム解析は、変化する表現型解析において最も状態を反映する情報としてこれまで汎用されてきた。一方で、現在のトランスクリプトーム解析は、細胞を破壊し RNA を抽出する必要があるため、同一の細胞の変化を追跡することはできない。すなわち、トランスクリプトームに基づく表現型の変化は集団を用いた統計的な推測であり、実追跡に基づいた解析はほとんどなされていない。そこで、本研究では、細胞が分泌するエクソソームに含まれる微量な RNA と内在性の RNA が相関する独自の先行知見に基づき、生細胞の非破壊的 RNAseq 法の開発を進めた。培養細胞 C2C12 マウス筋芽細胞は 5 日間の分化刺激条件の下、形態的およびトランスクリプトーム変化を経て分化する。既に蓄積している本細胞を用いた多くのトランスクリプトーム解析データを活かして、ライブセル RNAseq 法の樹立を進めた。細胞の分化刺激後、培養上清からエクソソーム分画を回収し、分画ごとの RNAseq を行った。RNAseq は全 RNA を解析する total RNAseq 法で行い、内在性の RNA を用いた RNAseq データと比較し、相関性を検証した。また C2C12 細胞以外にマウス ES 細胞、K562 細胞を用いて多角的な検証を行った。更に、単一細胞レベルでのライブセル RNAseq 法の開発を進めた。C2C12 マウス筋芽細胞をモデルとして開発を行い、エクソソームを個別に解析する技術開発の原理実証に成功した。細胞一つ当たり 1000 個のエクソソームが分泌されるため、10x とした単一細胞トランスクリプトーム解析プラットフォームでは単一エクソソーム解析は不可能である。そこで、空間オミクス技術の着想より網羅的な

解析法を確立した。プロジェクトを順調に終え、さまざまな検体による応用をすすめている。本研究が基盤とする技術は微量 RNA 操作技術である。現在単一細胞トランスクリプトームが注目を浴びる中、その多くはキット化された商用プラットフォームに依存しており汎用的な反面、微量 RNA を操作する場면을研究者から奪っている一面が存在する。本研究が行うごく少量の RNA を扱う基礎技術のプロトコル化と普及は次の新たな解析技術の基盤となる基礎研究能力の喪失を防ぎ、今後のニーズに即した研究基盤の強化につながると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Masao Nagasaki, Yayoi Sekiya, Akihiro Asakura, Ryo Teraoka, Ryoko Otokozawa, Hiroki Hashimoto, Takahisa Kawaguchi, Keiichiro Fukazawa, Yuichi Inadomi, Ken T Murata, Yasuyuki Ohkawa, Izumi Yamaguchi, Takamichi Mizuhara, Katsushi Tokunaga, Yuji Sekiya, Toshihiro Hanawa, Ryo Yamada, Fumihiko Matsuda.	4. 巻 10
2. 論文標題 Design and implementation of a hybrid cloud system for large-scale human genomic research.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hum Genome Var.	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-023-00231-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Moiseeva V, Cisneros A, Sica V, Deryagin O, Lai Y, Jung S, Andres E, An J, Segales J, Ortet L, Lukesova V, Volpe G, Benguria A, Dopazo A, Benitah SA, Urano Y, Del Sol A, Esteban MA, Ohkawa Y, Serrano AL, Perdiguerro E, Munoz-Canoves P.	4. 巻 613
2. 論文標題 Senescence atlas reveals an aged-like inflamed niche that blunts muscle regeneration.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 169-178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-022-05535-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiroaki Ohishi, Seiru Shimada, Satoshi Uchino, Jieru Li, Yuko Sato, Manabu Shintani, Hitoshi Owada, Yasuyuki Ohkawa, Alexandros Pertsinidis, Takashi Yamamoto, Hiroshi Kimura, Hiroshi Ochiai.	4. 巻 13
2. 論文標題 TREAMING-tag system reveals spatiotemporal relationships between transcriptional regulatory factors and transcriptional activity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 7672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-35286-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Thomas Fleming, Yukiko Kikuchi, Mikoto Nakajo, Masaya Tachizawa, Tomoaki Inazumi, Soken Tsuchiya, Yukihiko Sugimoto, Daisuke Saito, Mikita Suyama, Yasuyuki Ohkawa, Takashi Baba, Ken-Ichirou Morohashi, Kataaki Okubo.	4. 巻 5
2. 論文標題 Prostaglandin E2 receptor Ptger4b regulates female-specific peptidergic neurons and female sexual receptivity in medaka.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 1215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04195-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhide Yoshioka, Keisuke Anzai, Ryosuke Kowada, Ken Hiratsuka, Teppei Hirayabu, Masashi Yasuda, Yasuyuki Ohkawa, Tetsuya Sato, Mikita Suyama, Hideki Yoshida, Masamitsu Yamaguchi.	4. 巻 420
2. 論文標題 Drosophila transcription factor NF-Y suppresses transcription of the lipase 4 gene, a key gene for lipid storage.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Exp Cell Res.	6. 最初と最後の頁 113307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2022.113307.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miki Inoue, Takashi Baba, Fumiya Takahashi, Miho Terao, Shogo Yanai, Yuichi Shima, Daisuke Saito, Kei Sugihara, Takashi Miura, Shuji Takada, Mikita Suyama, Yasuyuki Ohkawa, Ken-Ichirou Morohashi.	4. 巻 5
2. 論文標題 Tmsb10 triggers fetal Leydig differentiation by suppressing the RAS/ERK pathway.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03941-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toru Masuda, Shojiro Haji, Yasuhiro Nakashima, Mariko Tsuda, Daisaku Kimura, Akiko Takamatsu, Norifusa Iwahashi, Hironobu Umakoshi, Motoaki Shiratsuchi, Chie Kikutake, Mikita Suyama, Yasuyuki Ohkawa, Yoshihiro Ogawa.	4. 巻 25
2. 論文標題 Identification of a drug-response gene in multiple myeloma through longitudinal single-cell transcriptome sequencing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104781.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Satoshi Ishishita, Shumpei Kitahara, Mayuko Takahashi, Sakura Iwasaki, Shoji Tatsumoto, Izumi Hara, Yoshiki Kaneko, Keiji Kinoshita, Katsushi Yamaguchi, Akihito Harada, Yasushige Ohmori, Yasuyuki Ohkawa, Yasuhiro Go, Shuji Shigenobu, Yoichi Matsuda, Takayuki Suzuki.	4. 巻 17
2. 論文標題 Uterus-specific transcriptional regulation underlies eggshell pigment production in Japanese quail.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0265008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0265008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuki Honda, Ryuichi Kimura, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Kaori Tanaka, Yasuyuki Ohkawa, Shinya Oki.	4. 巻 3
2. 論文標題 Photo-isolation chemistry for high-resolution and deep spatial transcriptome with mouse tissue sections.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protoc.	6. 最初と最後の頁 101346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101346.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Keita Kohno, Ryoji Shirasaka, Kohei Yoshihara, Satsuki Mikuriya, Kaori Tanaka, Keiko Takanami, Kazuhide Inoue, Hirotaka Sakamoto, Yasuyuki Ohkawa, Takahiro Masuda, Makoto Tsuda.	4. 巻 376
2. 論文標題 A spinal microglia population involved in remitting and relapsing neuropathic pain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 86-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abf6805.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Yoshimoto, Akiyoshi Uezumi, Madoka Ikemoto-Uezumi, Kaori Tanaka, Xinyi Yu, Tamaki Kurosawa, Shinsei Yambe, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Yusuke Sotomaru, Chisa Shukunami.	4. 巻 10
2. 論文標題 Tenogenic Induction From Induced Pluripotent Stem Cells Unveils the Trajectory Towards Tenocyte Differentiation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 780038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.780038.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Goya, Kenichi Horisawa, Miyako Uono, Yasuyuki Ohkawa, Yoshihiro Ogawa, Sayaka Sekiya, Atsushi Suzuki.	4. 巻 6
2. 論文標題 Direct Conversion of Human Endothelial Cells Into Liver Cancer-Forming Cells Using Nonintegrative Episomal Vectors.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatol Commun.	6. 最初と最後の頁 1725-1740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1911.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 単一細胞マルチオミクスによる骨格筋分化制御機構の解明
3. 学会等名 第6回運動器と健康研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 Spatial multi-omics for understanding chromatin dynamics
3. 学会等名 2023年度高深度オミクスシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 データから変化を取り出す新たな単一細胞解析技術
3. 学会等名 【富士フィルム】講演 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasuyuki Ohkawa
2. 発表標題 Single-cell multi-targeted chromatin integration labeling technology for understanding chromatin dynamics
3. 学会等名 CSHA meeting on Integrative Epigenetics in Plants (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 空間オミクス技術によるクロマチン構造制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 細胞恒常性を担うシグナルと遺伝子発現の制御
3. 学会等名 第16回日本臨床ストレス応答学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 高深度解析による全ゲノムレベルの単一細胞オミクスへの挑戦
3. 学会等名 NGS EXPO 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 単一細胞軌跡追跡によるクロマチンダイナミクスの解明
3. 学会等名 2022年度国立遺伝学研究所クロマチン研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuyuki Ohkawa
2. 発表標題 Chromatin regulation during skeletal muscle regeneration
3. 学会等名 第17回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 骨格筋分化のクロマチンダイナミクス
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 トランスクリプトミクスで迫る細胞分化能
3. 学会等名 大阪大学産業科学研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuyuki Ohkawa
2. 発表標題 Spatial multi-omics for understanding gene expression regulated by cell-cell interaction.
3. 学会等名 Japan-UK Regulation through Chromatin Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 空間オミクスによる骨格筋組織老化機序の解明
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 クロマチン解析のための新技術開発の現状と今後の展開
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野HP https://tx.bioreg.kyushu-u.ac.jp/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------