

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810100

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた次世代環境センシングシステムの開発

研究課題名(英文) Development of next generation environmental sensing system using human iPS cells

研究代表者

谷 英典 (TANI, HIDENORI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・研究員

研究者番号：10635329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトiPS細胞、及び、タンパク質に翻訳されない長鎖ノンコーディングRNAに着目することで、化学物質等のヒトへの直接的影響評価を可能とする、次世代環境センシングシステムの開発を目的として研究を進めた。まず我々は、フィーダー細胞を用いないヒトiPS細胞の安定的な培養法を確立した後、本細胞にモデル環境ストレスとして、複数の化学物質を24時間暴露することで、暴露後RNA発現量が著しく増加する長鎖ノンコーディングRNAとして、6つの新規RNAを同定した。以上より、ヒトiPS細胞において、長鎖ノンコーディングRNAが環境ストレスに対するサロゲート分子として有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on two biological products as ideal tools for toxicological assessment: long non-coding RNAs (lncRNAs) and human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs). lncRNAs are an important class of pervasive non-protein-coding transcripts involved in the molecular mechanisms associated with responses to cellular stresses. hiPSCs possess the capabilities of self-renewal and differentiation into multiple cell types, and they are free of the ethical issues associated with human embryonic stem cells. Here, we identified six novel lncRNAs that respond to model chemical stresses in hiPSCs. Our results indicated that the lncRNAs responded to general and specific chemical stresses. We propose that these lncRNAs have the potential to be surrogate indicators of chemical stress responses in hiPSCs.

研究分野：分析化学

キーワード：ヒトiPS細胞 ノンコーディングRNA 化学物質 環境センシング

1. 研究開始当初の背景

我々の身の回りには数十万を超える膨大な種類の化学物質が存在し、さらに日々、新規化学物質が発見・開発され続けている。従って、迅速かつ安価な化学物質の生体影響評価手法が求められており、特にヒトへの有害性を高感度にセンシングする技術の開発が国際的な課題となっている。

現在、化学物質の生体影響評価には、マウス等の実験動物を用いた試験が行われている。しかしながら、本試験法は、動物の飼育費用が非常に高価であることから、試験数に制限が生じるため、複数化学物質の膨大な組み合わせによる複合的影響評価を行うことは現実的に困難である。さらに、実験動物とヒトとの種差という本質的な問題や動物愛護の問題が存在する。一方、近年の国際的な動向として、複数の化学物質を含む環境サンプルの生態影響を総合的に評価する方法が注目されている。特に、ゼブラフィッシュ等の水生生物に直接排水を曝露して、排水毒性を評価する Whole Effluent Toxicity (WET) 法はその代表例であり、欧米を中心に広く利用されている。しかしながら、本試験法はそもそも環境中の生態影響に主眼を置いた手法であり、ヒトへの直接的な生体影響は考慮されていない。

従来技術の問題点を解決するため、申請者はヒト iPS 細胞に着目した。ヒト iPS 細胞は、様々な臓器の細胞に分化できる分化万能性を持ち、未分化の状態でも無限増殖が可能な細胞であり、本細胞を用いることで従来技術の問題点をすべて回避出来る。すなわち、(1) 細胞培養であるため飼育費用が安価であり (2) ヒト細胞を用いるためヒトへの予測性が極めて高く、(3) 動物愛護の問題を回避でき、(4) 複数種類の化学物質による複合的影響を容易に評価可能である。さらには、(5) 未分化細胞を各種細胞に分化させることで、様々な臓器への評価を実現できる。

上記の利点に加え、これまで申請者が研究を進めてきたノンコーディング RNA の研究成果から、ヒト細胞が飢餓ストレス等の外的刺激にさらされると、細胞内に存在するある特定のノンコーディング RNA 量が増加し、結果、細胞死 (アポトーシス) を起こしやすくなることを見い出している (。以上より、これらの外的刺激に反応するノンコーディング RNA を人工的に過剰発現させたヒト iPS 細胞株を樹立することで、通常のヒト iPS 細胞よりも化学物質に対して迅速かつ高感度に反応する「機能性ヒト iPS 細胞」を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、外的刺激に反応して顕著に発現量が変化するノンコーディング RNA を発見し、ノンコーディング RNA を細胞内で人工的に過剰発現させることで、化学物質に対して迅速かつ高感度に反応する「機能性ヒト

iPS 細胞」を開発する。さらに、発見したノンコーディング RNA の応答メカニズムを明らかにすることを通して、ヒト iPS 細胞を用いた次世代環境センシングシステムの基盤技術の確立を目指す。

申請者によるこれまでの予備的な解析から、ヒトのガン細胞株において、外的刺激応答性のノンコーディング RNA を人工的に細胞内で過剰発現させた細胞株を作製し、この細胞に代表的な環境負荷物質である塩化水銀を 24 時間曝露した結果、通常の細胞に比べて、外的刺激応答性のノンコーディング RNA を 66 倍に増加させた細胞では、その生存率が著しく減少することを見い出している。本知見をもとに研究期間内に以下のことを明らかにする。

(1) ヒト iPS 細胞内に、上記の外的刺激応答性のノンコーディング RNA を過剰発現させ、本細胞に代表的な環境負荷物質として塩化水銀、カドミウム、ヒ素等や、これら複数の物質を混合したサンプルを曝露した際に、細胞の生存率の減少、及び、その細胞死の速度を明らかにする。

(2) (1) と同等もしくはそれ以上の効果を示すノンコーディング RNA を見出すため、ヒト iPS 細胞に様々な化学物質を曝露し、発現量が増加するノンコーディング RNA を網羅的にスクリーニングする。

(3) (2) で見い出したノンコーディング RNA をヒト iPS 細胞で過剰発現させ、細胞に複数の化学物質を曝露した際、細胞の生存率の減少、及び、その細胞死の速度を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞を用いた次世代環境センシングシステムの基盤技術の確立を目指し、2 つのテーマとして、(1) ノンコーディング RNA を利用した化学物質高応答性を有する機能性 iPS 細胞の開発、及び、(2) iPS 細胞を化学物質高応答性に变化させる新規ノンコーディング RNA の探索および機能解明、を柱として研究を進めた。

申請者は、これまでの予備的な解析から、ヒトのガン細胞株において、外的刺激応答性のノンコーディング RNA を細胞内で人工的に過剰発現させることで、細胞が化学物質に対して迅速かつ高感度に反応できるように変化することを見い出している。本知見をもとに、ノンコーディング RNA を利用して化学物質に高い応答性を有する「機能性ヒト iPS 細胞」を開発し、さらに、同様の機能を示す新規ノンコーディング RNA を見出し、その応答メカニズムの解明を行った。

まず、化学物質による外的刺激に反応して、細胞内で顕著に発現量が変化するノンコーディング RNA に着目し、これを細胞内で人工的に過剰発現させた iPS 細胞株を樹立することで、通常の iPS 細胞よりも、化学物質に迅速かつ高感度に反応する「機能性 iPS 細胞」

の開発方法を確立した。

(1) CiRA のプロトコルに従い、京都大学の山中伸弥教授が樹立したヒト iPS 細胞株 (201B7) の培養を開始した。フィーダー細胞としてマウス細胞株 (SNL 76/7) を用いた。その後、WiCell Research Institute のプロトコルに従い、フィーダー細胞を用いない培養法に切り替え、継体培養を 2 回行った細胞を以降の実験に使用した。

(2) トランスフェクション試薬を用いて、ある特定のノンコーディング RNA 配列を含むプラスミドベクターを細胞内に導入した。この時、目的のノンコーディング RNA が過剰発現しているかどうかをリアルタイム PCR で確認すると同時に、iPS 細胞に分化等の変化が生じていないかを、蛍光顕微鏡観察もしくはマーカー遺伝子を対象としたリアルタイム PCR により調べた。

(3) iPS 細胞内でのノンコーディング RNA の過剰発現を確認した後、代表的な環境負荷物質である塩化水銀塩化水銀、カドミウム、ヒ素や、これら複数の化学物質を混合した模擬サンプル等を 24 時間曝露した後、生細胞カウント試薬を用いて、プレートリーダーにより細胞生存率を測定した。この時、コントロール細胞に対して、生存率が著しく減少するものを、機能性 iPS 細胞の候補とした。

次に、iPS 細胞に様々な化学物質を曝露し、発現量が顕著に増加するノンコーディング RNA を網羅的にスクリーニングし、得られたノンコーディング RNA を細胞内で人工的に過剰発現させた iPS 細胞株を樹立し、機能性 iPS 細胞の改良を行うと同時に、新規ノンコーディング RNA の化学物質に対する応答メカニズムの解明を行った。

申請者によるこれまでの予備的な解析から、ヒトのガン細胞株において、塩化水銀およびシクロヘキシミドを 24 時間曝露した結果、発現量が 20 倍以上に増加するノンコーディング RNA を複数見出し出している。これらの知見をもとに、ヒト iPS 細胞で以下の研究を進めた。

(1) ヒト iPS 細胞株 (201B7) の培養を開始し、その後、フィーダー細胞を用いない培養法に切り替え、継体培養を 2 回行った細胞を以降の実験に使用した。

(2) (1) の iPS 細胞に、代表的な環境負荷物質である塩化水銀塩化水銀、カドミウム、ヒ素や、これら複数の化学物質を混合した模擬サンプル等を 24 時間曝露した後、細胞から全 RNA を抽出し、次世代シーケンサ等により、何も添加していないコントロール細胞系に対して、顕著に発現量が増加するノンコーディング RNA を同定した。

(3) 次世代シーケンサ等のデータの確認として、リアルタイム PCR を行い、実験の再現性を確認した。

(4) (2, 3) で見出したノンコーディング RNA について、ノンコーディング配列を含むプラスミドベクターを iPS 細胞に導入し、化

学物質高応答性の RNA を選抜した。

4. 研究成果

本研究では、ヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) 及び、タンパク質に翻訳されない長鎖ノンコーディング RNA に着目することで、化学物質等のヒトへの直接的影響評価を可能とする、次世代環境センシングシステムの開発を目的として研究を進めた。ヒト iPS 細胞は、多くの細胞に分化できる分化万能性と、分裂増殖を経ても維持が可能な自己複製能を有する細胞であり、胚性幹細胞 (ES 細胞) の有する倫理的な問題をクリアしており、さらに元の細胞の性質・機能を維持しているという利点を有する。また、長鎖ノンコーディング RNA はタンパク質に翻訳されない RNA であり、細胞のストレス応答においてダイナミックな制御機構を担うことが近年報告され始めている。

まず我々は、フィーダー細胞を用いないヒト iPS 細胞の安定的な培養法を確立した後、本細胞にモデル環境ストレスとして、過酸化水素、カドミウム、ヒ素、シクロヘキシミド等を 24 時間曝露することで、曝露後 RNA 発現量が著しく増加する長鎖ノンコーディング RNA として、6 つの新規分子 (CDKN2B-AS1、MIR22HG、GABPB1-AS1、FLJ33630、LINC00152、LINC0541471_v2) を同定した。本結果より、長鎖ノンコーディング RNA には、環境ストレス全般に反応するものと、特異的に反応するものが存在することを見出した。また、従来のバイオマーカーとして p53 関連遺伝子と比較した結果、長鎖ノンコーディング RNA の方が高感度かつ迅速に環境ストレスに反応することを見出した。さらに、ヒト iPS 細胞を顕微鏡で観察することで、環境ストレスにより、細胞形態が変形していくことを見出した。以上より、ヒト iPS 細胞において、長鎖ノンコーディング RNA が環境ストレスに対するサロゲート分子として有用であることが示された。

続いて我々は、ヒト iPS 細胞に化学物質に反応して発現量が著しく増加した長鎖ノンコーディング RNA を人工的に過剰発現させ、環境ストレスに対して迅速かつ高感度に反応する機能性ヒト細胞を試みたが、未分化状態を維持したまま発現ベクターを導入することは困難を極めた。そこで打開策として、発現ベクターの導入が容易なヒト胎児腎細胞 (HEK293) を用いて実験を行った。その結果、3 つの長鎖ノンコーディング RNA (GAS5、ID12-AS1、SNHG15) の発現ベクターを HEK293 細胞に導入した場合、通常よりもそれぞれ数十倍に発現量が増加し、さらに、発現量が増加した細胞では、通常の細胞に比べて、生細胞数が著しく減少していることがわかった。以上より、長鎖ノンコーディング RNA を細胞内で人工的に増加させることで、環境ストレスに対して細胞死を起こしやすい機能性細胞を作製して、世界で初めて環境ストレス評

価用の機能性ヒト細胞の開発に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

・Tani H, Takeshita J, Aoki H, Abe R, Toyoda A, Endo Y, Miyamoto S, Gamo M, Torimura M. "Genome-wide gene expression analysis of mouse embryonic stem cells exposed to p-dichlorobenzene" *J Biosci Bioeng*, in press. doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.02.007. (査読有り)

・Furuta A, Tsubuki M, Endoh M, Miyamoto T, Tanaka J, Salam KA, Akimitsu N, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N. "Identification of hydroxyanthraquinones as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase" *Int J Mol Sci*, 16, 18439-18453, 2015. doi: 10.3390/ijms160818439. (査読有り)

・Maekawa S, Imachi N, Irie T, Tani H, Matsumoto K, Mizutani R, Imamura K, Kakeda M, Yada T, Sugano S, Suzuki Y, Akimitsu N. "Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance" *BMC Genomics*, 16, 154, 2015. doi: 10.1186/s12864-015-1358-y. (査読有り)

・Tani H, Torimura M. "Development of cytotoxicity-sensitive human cells using overexpression of long non-coding RNAs" *J Biosci Bioeng*, 119, 604-608, 2015. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.012. (査読有り)

・Tani H, Imachi N, Mizutani R, Imamura K, Kwon Y, Miyazaki S, Maekawa S, Suzuki Y, Akimitsu N. "Genome-wide analysis of long noncoding RNA turnover" *Methods Mol Biol*, 1262, 305-320, 2015. doi: 10.1007/978-1-4939-2253-6_19. (査読有り)

・Furuta A, Salam KA, Tani H, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Akimitsu N, Noda N. "A fluorescence-based screening assay for identification of hepatitis C virus NS3 helicase inhibitors and characterization of their inhibitory mechanism" *Methods Mol Biol*, 1259, 211-228, 2015. doi: 10.1007/978-1-4939-2214-7_14. (査読有り)

・Tani H, Onuma Y, Ito Y, Torimura M. "Long non-coding RNAs as surrogate indicators for chemical stress responses in human-induced pluripotent stem cells" *PLoS One*, 9, e106282, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0106282. (査読有り)

・Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S,

Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N. "PBDE: Structure-activity studies for the inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase" *Molecules*, 19, 4006-4020, 2014. doi: 10.3390/molecules19044006. (査読有り)

[学会発表](計11件)

・Tani H. "Long non-coding RNAs as surrogate indicators for environmental stress response in human cells" Workshop on Advanced Technologies for Wastewater Reclamation and Reuse, Beijing, China, August 19, 2014.

・Tani H, Torimura M. "Identification of short-lived long non-coding RNAs as surrogate indicators for chemical stress response" Cell Symposium: Regulatory RNAs 2014, Berkeley, USA, October 20, 2014.

・Tani H, Takeshita J, Aoki H, Gamo M, Torimura M. "Genome-wide gene expression analysis by RNA-seq in murine embryonic stem cells" 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech, August 27, 2014.

・Imachi N, Tani H, Mizutani R, Imamura K, Irie T, Suzuki Y, Akimitsu N. "Identification of cis-regulatory elements within UPF1 target transcripts" The 9th FASEB meeting, Montana, USA, July 8, 2014.

・Imachi N, Tani H, Mizutani R, Imamura K, Irie T, Suzuki Y, Akimitsu N. "Identification of cis-regulatory element within UPF1 target transcripts" RNA 2014, Canada, June 7, 2014.

・谷 英典 "ヒト iPS 細胞を用いた次世代型水環境診断システムの開発" InterAqua2016、東京都・港区、2016年1月28日

・谷 英典 "哺乳動物細胞を用いた化学物質の生体影響評価技術の開発" 第2回 E&E フォーラム、茨城県・つくば市、2015年9月2日

・谷 英典、小沼 泰子、伊藤 弓弦、竹下 潤一、蒲生 昌志、青木 寛、鳥村 政基、佐藤 浩昭 "哺乳動物細胞を用いた化学物質の生体影響評価技術の開発" 第1回 E&E フォーラム、茨城県・つくば市、2015年6月25日

・谷 英典、小沼 泰子、伊藤 弓弦、鳥村 政基 "ヒト iPS 細胞におけるストレスマーカーとしての長鎖ノンコーディング RNA の解析" 第14回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、P99、茨城県・つくば市、2015年2月3日

・谷 英典、小沼 泰子、伊藤 弓弦、鳥村 政基 "ヒト iPS 細胞におけるストレスマーカーとしての長鎖ノンコーディング RNA の解析" 第37回日本分子生物学会、神奈川県・横浜市、2014年11月27日

・谷 英典、小沼 泰子、伊藤 弓弦、竹下 潤
一、蒲生 昌志、青木 寛、鳥村 政基 “ヒト
iPS 細胞を用いた化学物質の安全性評価及び
迅速計測技術の開発” 第 21 回 E&E フォーラ
ム、茨城県・つくば市、2014 年 6 月 18 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：細胞内 RNA 分解酵素の in vivo 阻害測
定方法

発明者：谷 英典、鳥村 政基、佐藤 浩昭

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究
所

種類：特許権

番号：特願 2015-147125

出願年月日：2015 年 7 月 24 日

国内外の別：国内

名称：核酸を用いたストレス高感受性細胞の
作製方法

発明者：谷 英典、鳥村 政基

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究
所

種類：特許権

番号：特願 2014-125587

出願年月日：2014 年 6 月 18 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ：

<http://staff.aist.go.jp/h.tani/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 英典 (Hidenori TANI)・国立研究開発法
人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・
研究員

研究者番号：10635329