

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14525

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来の分化細胞を用いた次世代環境診断システムの開発

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・エネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：10635329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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、8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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞由来の分化細胞を用いた化学物質の生体影響評価において、新規生体分子である長鎖ノンコーディングRNAが毒性バイオマーカー、すなわち、サロゲート分子として有用であることを世界で初めて明らかにした。

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 eight 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：分子生物学

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

我々の身の回りでは、数十万種を超える化学物質が存在しており、これら環境中の化学物質が生体に与える影響性を十分に理解した上で安全に利用することが求められている。化学物質の生体影響評価には動物試験が使用されてきたが、コスト・スピード・倫理面で問題があり、2013年に始まった EU 諸国における化粧品規制では、動物試験に基づいて開発された製品の販売が全面的に禁止されている。そのため、動物試験を低減する新規技術の開発が国内外で急務となっており、世界中で細胞試験が開発され始めている (Nature, 518, 285-286, 2015)。細胞試験は、コストが安く、迅速かつ多検体処理が可能で、動物に苦痛を与えることもないため、非常に期待されている技術である。しかしながら、適切な細胞試験系は確立されておらず、動物試験を低減するには程遠いのが現状である。というのも、これまでの細胞試験では、ガン細胞をはじめとする樹立細胞株、もしくは、受精卵由来のヒト ES 細胞が用いられているのだが、ガン細胞では遺伝的な異常があるため正確な評価が困難であり、ヒト ES 細胞では倫理面で問題があるためである。

このような状況を打破すべく、申請者はヒト iPS 細胞に着目した。ヒト iPS 細胞は、無限に増殖することが可能であるため、大量の細胞供給が可能であり、どのような臓器の細胞にでも変化できる分化万能性を持つため、各組織・器官への影響評価が可能であり、従来用いられてきたガン細胞等とは異なり、元の細胞の性質・機能を維持していることから、ヒト iPS 細胞は細胞試験用として非常に理想的なリソースであるといえる (Cell, 131, 861-872, 2007)。

上記の利点に加え、申請者は、細胞内マーカーの新規分子として、そのユニークな特性から近年注目を集めている、タンパク質に翻訳されない RNA: ノンコーディング RNA に着目した。ノンコーディング RNA は、タンパク質に翻訳される RNA: メッセンジャー RNA を含む生体分子を制御する分子である証拠を示す報告がなされ始めており、ノンコーディング RNA はこれら生体分子の上流に位置するものと考えられている (Nature, 482, 229-246, 2012)。これまでの申請者の研究成果から、未分化のヒト iPS 細胞等が環境中の化学物質に暴露されると、細胞内に存在する特定のノンコーディング RNA 量が顕著に増加することを見出している (谷, 科研費・若手 B, H26~H27, Tani et al., J Biosci Bioeng, 2016, Tani et al., PLoS One, 2014)。以上より、ヒト iPS 細胞を神経細胞等に分化させた後、化学物質を暴露した際、どのようなノンコーディング RNA が顕著に増加するかを網羅的に調査することを通して、化学物質応答データベースを作成することで、「次世代環境診断システム」の構築を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、分化させたヒト iPS 細胞に化学物質を暴露した際に、化学物質に応答して顕著に発現量が増加するノンコーディング RNA を網羅的に同定し、増加したノンコーディング RNA について、その化学物質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「次世代環境診断システム」の確立を目指す。

申請者のよるこれまでの解析から、未分化のヒト iPS 細胞に、モデル化学物質として、抗菌剤として使用され、生殖への影響が懸念されているシクロヘキシミドを 24 時間暴露した後、細胞から全 RNA を抽出し、定量 PCR 法により細胞内に発現している複数の RNA を定量した結果、シクロヘキシミドを暴露しなかった時に比べて、5~10 倍に発現量が増加するノンコーディング RNA を見出している (Tani et al., PLoS One, 2014)。大変興味深いことに、従来マーカーとして用いられている複数のメッセンジャー RNA に比べて、ノンコーディング RNA の方が強い増加が見られた。これは、ノンコーディング RNA はメッセンジャー RNA よりも化学物質に対して鋭敏に存在量が増加することを示しており、ノンコーディング RNA が有用なバイオマーカーであることを示している。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 細胞を神経幹細胞、肝細胞に分化させた後、代表的な環境負荷物質として、塩化水銀 (重金属ストレス) 過酸化水素 (酸化ストレス) 等を細胞に暴露した際に、発現量が増加するノンコーディング RNA をスクリーニングする。並行して、肝細胞への分化が困難であったことを想定して、毒性評価用細胞として有用なヒト肝がん細胞 HepG2 を用いて、同様な検討を行う。

(2)(1) で見出したノンコーディング RNA について、RNA 生成速度および分解速度の両方を測定することで、RNA 増加メカニズムを明らかにする。

(3)(2) に続いて、ノンコーディング RNA の細胞内での局在場所、RNA 結合タンパク質等を同定することで、化学物質に対するノンコーディング RNA の応答メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞を分化させた後、代表的な環境負荷物質を暴露して、次世代シーケンサを用いることで、細胞内で顕著に発現量が増加するノンコーディング RNA を網羅的に同定する。

(1) 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) のプロトコールに従い、京都大学の山中伸弥教授らが確立したヒト iPS 細胞株 (201B7) (Nat Biotechnol, 26, 101-106, 2008) の培養を開始する。フィーダー細胞としてマウス細胞株 (SNL 76/7) を用いる。その後、WiCell Research Institute

のプロトコールに従い、フィーダー細胞を用いない培養法に切り替え、継代培養を2回行った細胞に対し、各種臓器細胞に分化誘導する。テストケースとして、平成29年度では神経幹細胞に分化させ、平成30年度以降に肝細胞に分化させたものを用意する。

(2) 分化誘導した神経幹細胞について、神経幹細胞特異的なバイオマーカーを測定し、細胞が確実に神経幹細胞に分化していることを確認した後、細胞に代表的な環境負荷物質である塩化水銀、過酸化水素等を24時間暴露した後、細胞から全RNAを抽出し、定量PCRにより、化学物質を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、データベース化する。

(3) 同定・選抜したノンコーディングRNAについて、申請者らが世界に先駆けて開発した、RNAの生成及び分解速度を求めることが可能な、BRIC法(Tani et al., Genome Res, 2012)を用いて、RNA生成速度および分解速度の両方を測定することで、RNA増加メカニズムを明らかにする。もし、BRIC法が有効に働かない場合には、測定原理の異なる4sU法やEU法を用いる(Tani et al., RNA Biol, 2012)。

(4) (3)において、細胞核内のRNA分解酵素をRNAi法でノックダウンし、それぞれのノンコーディングRNAの分解速度に影響があるかどうかを調査する。

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、本細胞を神経幹細胞に分化させ(並行してヒト肝がん細胞HepG2を用いて)にモデル環境ストレスとして、過酸化水素、塩化水銀、シクロヘキシミド、塩化亜鉛、エトポシド等を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、ヒトiPS細胞由来の神経幹細胞から4つの新規分子(TUG1、GAS5、FAM222-AS1、CNHG15)ヒト肝がん細胞HepG2から4つの新規分子(OIP5-AS1、FLJ46906、LINC01137、GABPB1-AS1)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応答するものと、特異的に応答するものが存在することを見出した。以上より、ヒトiPS細胞・HepG2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、同定した長鎖ノンコーディングRNAについて、化学物質暴露の有無の条件において、細胞内生成・分解速度を測定した。その結果、RNA生成速度は変化しなかったが、RNA分解速度は抑制されることを見出した。これは、化学物質暴露により、RNA分解速度が抑制されることにより、細胞内RNA発現量、すなわち、細胞内RNA存在量が増加するメカニズムの解明に成功した。さらに、これら長鎖ノンコーディングRNAはすべて細胞核内に存在することから、既知の核内RNA分解関連酵素である、Exosome、XRN2、MTR4をRNAi法によりノックダウンして、RNAの分解速度を測定した。その結果、Exosome、XRN2をノックダウンした場合、長鎖ノンコーディングRNAの分解が抑制されることを見いだした。本結果より、同定した長鎖ノンコーディングRNAは核内分解酵素により分解を受けており、化学物質暴露時には、RNA分解酵素が阻害を受けることによって、結果として、長鎖ノンコーディングRNAの発現量が増加するというメカニズムを世界で初めて明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tani H, Matsutani T, Aoki H, Nakamura K, Hamaguchi Y, Nakazato T, Hamada M.	4. 巻 512
2. 論文標題 Identification of RNA biomarkers for chemical safety screening in neural cells derived from mouse embryonic stem cells using RNA deep sequencing analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 641-646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.141.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurokara R, Komiya R, Oyoshi T, Matsuno Y, Tani H, Katahira M, Hitachi K, Iwashita Y, Yamashita T, Kondo K, Yoneda R, Yamaoki Y, Ueda N, Mashima T, Kobayashi N, Nagata T, Kiyoshi A, Miyake M, Kano F, Murata M, Hamad N, Sasaki K, Shoji N.	4. 巻 4
2. 論文標題 Multiplicity in long noncoding RNA in living cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 18-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 谷英典	4. 巻 5
2. 論文標題 ノンコーディングRNAから生命の謎を解き明かす	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PHARM TECH JAPAN	6. 最初と最後の頁 18-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 谷英典	4. 巻 8
2. 論文標題 蛍光色素及び修飾核酸を利用した生体分子解析技術の開発とその応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ぶんせき	6. 最初と最後の頁 342-342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 谷英典	4. 巻 2
2. 論文標題 蛍光色素及び修飾核酸を利用した生体分子解析技術の開発とその応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 蛍光色素及び修飾核酸を利用した生体分子解析技術の開発とその応用 ” 分析化学	6. 最初と最後の頁 109-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani H, Sato H, Torimura M.	4. 巻 123
2. 論文標題 Rapid monitoring of RNA degradation activity in vivo for mammalian cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 523-527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2016.11.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hermawan I, Furuta A, Higashi M, Fujita Y, Akimitsu N, Yamashita A, Moriishi K, Tsuneda S, Tani H, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Noda N, Tanaka J.	4. 巻 15
2. 論文標題 Four Aromatic Sulfates with an Inhibitory Effect against HCV NS3 Helicase from the Crinoid <i>Alloeocomatella polycladia</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 E117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2016.11.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani H, Okuda S, Nakamura K, Aoki M, Umemura T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Short-lived long non-coding RNAs as surrogate indicators for chemical exposure and LINC00152 and MALAT1 modulate their neighboring genes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0181628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0181628.	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 Tani H, Takeshita J, Aoki H, Nakamura K, Abe R, Toyoda A, Endo Y, Miyamoto S, Gamo M, Sato H, Torimura M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of RNA biomarkers for chemical safety screening in mouse embryonic stem cells using RNA deep sequencing analysis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0182032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0182032.	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 Tani H, Takeshita J, Aoki H, Nakamura K, Abe R, Toyoda A, Endo Y, Miyamoto S, Gamo M, Torimura M, Sato H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of methyl p-hydroxybenzoate on the culture of mammalian cell.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 276-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2017.01054.	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 Aoki Hiroshi, Tani Hidenori, Nakamura Kaoru, Sato Hiroaki, Torimura Masaki, Nakazato Tetsuya	4. 巻 392
2. 論文標題 MicroRNA biomarkers for chemical hazard screening identified by RNA deep sequencing analysis in mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114929 ~ 114929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2020.114929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani Hidenori, Numajiri Ayaka, Aoki Motohide, Umemura Tomonari, Nakazato Tetsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Short-lived long noncoding RNAs as surrogate indicators for chemical stress in HepG2 cells and their degradation by nuclear RNases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56869-y	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 Tani Hidenori	4. 巻 11
2. 論文標題 Short-lived non-coding transcripts (SLiTs): Clues to regulatory long non-coding RNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 20-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2017.01002	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 谷英典	4. 巻 3
2. 論文標題 ヒトiPS細胞を用いた水質安全性評価のシステム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PHARM TECH JAPAN	6. 最初と最後の頁 125-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 谷英典	4. 巻 10
2. 論文標題 次世代シーケンサーによるノンコーディングRNAの解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ぶんせき	6. 最初と最後の頁 456-458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 谷英典	4. 巻 8
2. 論文標題 ヒト細胞を用いた化学物質の安全性評価	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 製品含有化学物質のリスク管理、情報伝達の効率化	6. 最初と最後の頁 239-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 谷 英典
2. 発表標題 蛍光色素及び修飾核酸を利用した生体分子解析技術の開発とその応用
3. 学会等名 第67回日本分析化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷 英典
2. 発表標題 長鎖ノンコーディングRNAに関するRNA分解からのアプローチ
3. 学会等名 第2回長鎖非コードRNA勉強会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷 英典
2. 発表標題 ノンコーディングRNAに着目した化学物質の生体影響評価技術の開発
3. 学会等名 京都大学iPS細胞研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 谷 英典
2. 発表標題 長鎖ノンコーディングRNAに関するRNA分解からのアプローチ
3. 学会等名 第1回長鎖非コードRNA勉強会（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Tani H.
2. 発表標題 BRIC-seq: Genome-wide analysis of RNA turnover.
3. 学会等名 Eukaryotic RNA turnover (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 谷 英典、奥田 彩也夏、中村 薫、青木 元秀、梅村 知也
2. 発表標題 LINC00152及びMALAT1は近傍の遺伝子発現を制御する
3. 学会等名 第19回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Hidenori TANI's Homepage https://staff.aist.go.jp/h.tani/

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