



## 幹細胞とノンコーディング RNA (ncRNA)

2005年に哺乳類の細胞で報告された“RNA 新大陸”<sup>1)</sup>により、ncRNAがジャンクではなく生物学上重要な意味を持つ可能性が示され、近年ではmiRNAや長鎖ncRNA (lncRNA)の役割が広く知られるようになってきました。マウスやヒトの多能性幹細胞については、細胞周期の調節<sup>2)</sup>、様々なmiRNAによるiPS細胞リプログラミング過程のmicro-management<sup>4)</sup>、分化の過程 (patterning)におけるlncRNAの関わり<sup>5)</sup>など、ncRNAに関する論文が次々と報告されています。さらに、ncRNAの発現がiPS細胞とES細胞との違いを決める<sup>6)</sup>、SOX2OT (OT: overlapping transcript)といった特定の山中因子やリプログラミング因子に関連するノンコーディングの転写産物が多能性のみならず癌化に関与する<sup>7)</sup>ことも知られるようになりました。このような新たな知見に基づいて、再生医療への応用に向けた幹細胞の品質評価法も改めて見直されると考えられます。

さらには、最近の次世代シーケンサの活用により、心臓再生におけるelncRNA (enhancer-associated lncRNA)の関与<sup>8)</sup>や、pancRNA (promoter-associated ncRNA)によって幹細胞が正常に機能する<sup>9)</sup>等、エンハンサーやプロモータ領域に関するlncRNAの役割も知られるようになり、多能性のみならず様々な組織幹細胞を用いた研究においてncRNAに着目した論文報告は今後も増加の一途を辿ると予想されます(右図)。

アジレント社は、比較的最新のmiRNAやlncRNAのデータベースに対応させた高密度カタログアレイや、オリジナリティの高い基礎研究を進めていただくためのカスタムアレイやオリゴライブラリの提供を行っています。今回は、幹細胞とncRNAとの様々な関わりの中から、アジレント社の製品を使用した例を中心に、これらの解析結果を報告した論文を御紹介します。

1) *Science*. 2005 Sep 2; **309**(5740): 1559-63. Carninci P, et al.,

2) *Front Genet*. 2014 May 14; **5**: 132. Lukovic D, et al.,

3) *Front Genet*. 2015 Feb 27; **6**: 72. Tordonato C, et al.,

4) *Protein Cell* 2014 Jan; **5**(1): 36-47. Guo WT, et al.,

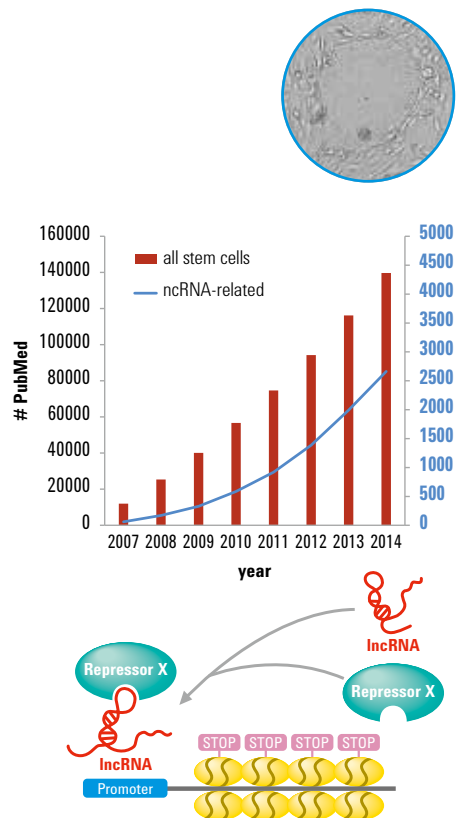
5) *Cell Stem Cell* 2014 Jun 5; **14**(6): 752-61. Flynn RA, et al.,

6) *Cell Cycle*. 2015; **14**(8): 1148-55. Fort A, et al.,

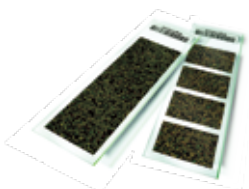
7) *Front Genet*. 2015 Jun 17; **6**: 196. Shahryari A, et al.,

8) *Trends Cardiovasc Med*. 2015 Feb 7. pii: S1050-1738. Ounzain S, et al.,

9) *Development*. 2015 Mar 1; **142**(5): 910-20. Hamazaki N, et al.,



## 新たな神経膠腫細胞株 (A2B5 陽性幹細胞) の樹立とマイクロアレイによる解析



神経膠腫細胞病理学において網羅的なゲノミクス解析のアプローチを取り入れることは疾病を克服するための有望な方法の一つと考えられます。今回、新たな神経膠腫細胞株 SHG-139 が樹立され、その細胞ならびに由来細胞である SHG-139S の表現型・腫瘍形成能・病理学的特徴がマイクロアレイの結果と共に報告されました。Li Y et al. は以前、中国で最初のヒト神経膠腫細胞株 SHG-44 を樹立していますが、今回の研究では神経膠腫をさらに特徴づけるため、神経膠腫幹細胞に似た A2B5 陽性の特性を持った細胞に誘導

できる神経膠腫細胞株が確立されています。SHG-139 細胞についての G バンド核型分析においては染色体の合計数は 68 (継代数 20) であり、それらの形状には不規則な歪みが見られました。続けて SHG-139 と SHG-139S から抽出した RNA を用いて、アジレント **miRNA マイクロアレイ** と lncRNA を搭載した **遺伝子発現カスタムマイクロアレイ** の解析を行い、SHG-139 と SHG-139S の間で miRNA と lncRNA についての発現差データが得られました。いくつかの miRNA と lncRNA の発現は 2 つの細胞間で異なっており、神経膠腫上で同定した miRNA と lncRNA の影響を明らかにするために更なる研究を進めています。今後、神経膠腫細胞の培養技術の改善、神経膠腫モデルの最適化、生化学的研究ツールの進歩、バイオインフォマティクス、マルチレベルの網羅的研究ツールの解析の進展が期待されます。

“Biological characteristics of a new human glioma cell line transformed into A2B5(+) stem cells.” *Mol Cancer*. 2015 Apr 2; **14**(1): 75. Li Y et al.,





## 分化過程の lncRNA の発現挙動をアジレント遺伝子発現カスタムアレイで検出



精子形成は精原幹細胞から減数分裂した精原細胞などを経て精細胞となります。その過程では、antisense RNA や miRNA などの ncRNA を含め、転写あるいは転写後のレベルで複雑な遺伝子制御がなされています。しかし精子形成における lncRNA の転写や機能ははまだ解明されていません。そこで Meng *et al.* はアジレント遺伝子発現カスタムマイクロアレイを用い、マウスの精原幹細胞(SCC)、タイプ A 精母細胞(A)、パキテン期の精母細胞(PS) および丸い精子 (RS) の lncRNA/mRNA の発現プロファイルを取得しました。また定量 PCR でもマイクロアレイデータ同様、組織特異的な lncRNA の発現を確認しました。各生殖細胞での lncRNA と mRNA の検出数は

同程度であり、これらは同等に転写されている可能性が示されました。また mRNA のエクソンと同鎖で重複する lncRNA、アンチセンス鎖で重複する lncRNA、1000 bp 以内にセンス・アンチセンス鎖の両鎖から転写される lncRNA、遺伝子間 lncRNA (lincRNA) の数を比較すると、全 lncRNA のほとんどを lincRNA が占め生殖細胞間の変動も大きいことから、精子形成において lincRNA は組織特異的、その他の lncRNA はハウスキーピングのような役割を持つことが示唆されました。さらに連続する 2 種の生殖細胞間 (SSC から A、A から PS、PS から RS) で発現差のある lncRNA は、30 kb 以内に隣接する mRNA と発現挙動が一致するものが多く、それらの mRNA は Gene Ontology 解析の結果、精子形成や配偶子形成などに関与していました。

“Sequential expression of long noncoding RNA as mRNA gene expression in specific stages of mouse spermatogenesis.” *Sci Rep.* 2014 Aug 6; 4: 5966 Liang M. *et al.*,

## iPS 細胞選別の候補 miRNA をアジレントマイクロアレイで探索

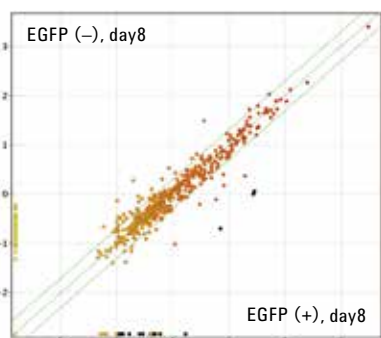


Fig. miRNA マイクロアレイによるスイッチ miRNA の候補探索

GSE60633 を弊社 GeneSpring GX にて表示。軸: log<sub>10</sub> normalized signal intensity、黒い dot: 14 個のスイッチ候補 miRNA。著者らは day 20 での miRNA マイクロアレイデータと合わせ最終的に 14 個の miRNA を同定。

心血管疾患の治療法の一つとして、iPS 細胞を含め幹細胞の利用が期待されています。ヒト胚性幹細胞から心筋細胞へ分化させる研究もなされていますが、心筋細胞のみを効率的に選別する方法はありませんでした。今回 Miki K. *et al.* は、内在 miRNA のターゲット部位と蛍光タンパクをコードする合成 RNA (miRNA スイッチ) を用い、効率的で安全性の高い目的細胞の選別方法を開発しました。まず miR-21-5p-EGFP-switch (miR-21-5p のターゲット配列と EGFP 配列の結合 RNA) を用い HeLa 細胞を 293FT 細胞から区別できることを確認しました。次にアジレント miRNA マイクロアレイを用い心筋細胞特異的な 14 個の miRNA を同定しました。それらのうち miR-1 および miR-208a、miR-499a-5p を用いたそれぞれの miRNA スイッチは、ヒト幹細胞から分化した心筋細胞を 95% 以上の高効率で選別でき、また偽陰性は低いことが示されました。miR-1-switch で選別した心筋細胞は心臓マーカー遺伝子を発現しており、アジレント遺伝子発現マイクロアレイを用いた発現プロファイルでは、miR-1-switch の有無で miR-1 のターゲット遺伝子の発現に変化がないことが確認されました。さらに著者らは選別されなかった細胞を特異的にアポトーシスに導く miR-Bim-switch を開発し、セルソーティングなしに心筋細胞に分化していない細胞を排除することに成功しました。アジレント遺伝子発現マイクロアレイを利用し、選別された細胞に miR-Bim-switch の影響がないことも確認しています。心筋細胞以外にもヒト幹細胞から分化させた内皮細胞、肝細胞およびインシュリン産生細胞に

おいても miRNA スイッチによる選別が有効であることが併せて報告されました。miRNA スイッチで目的細胞を選別することにより、治療や創薬に役立つことが期待されます。

“Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches.” *Cell Stem Cell.* 2015 Jun 4; 16(6) : 699-711 Miki K. *et al.*,

アジレントゲノミクス関連製品サイト : <http://AgilentGenomics.jp>

販売店

[ お問い合わせ窓口 ]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : [email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品は全て研究用です。

その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://AgilentGenomics.jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, Feb. 26, 2016

