

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06951

研究課題名(和文) PDGFR 陽性間葉系細胞による表皮水疱症治療メカニズムの解明

研究課題名(英文) Functions of PDGFRa positive mesenchymal stem cells during the treatment of epidermolysis bullosa

研究代表者

新保 敬史 (Shimbo, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：70780609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：表皮水疱症は、現在根治的治療のない皮膚遺伝性疾患である。我々はこれまでの研究で骨髄Pdgfra陽性間葉系幹細胞の動員がその病態を改善しうることを発見した。本研究計画では、その骨髄Pdgfra陽性間葉系幹細胞を単一細胞レベルで網羅的遺伝子発現解析に供した。本研究により、Pdgfra陽性間葉系幹細胞集団には複数の機能的亜集団が存在することになり、その組織再生メカニズムの一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Epidermolysis bullosa (EB) is an intractable skin genetic disorder. Previously, we found that bone marrow Pdgfra positive cells have important roles in effective tissue regeneration in EB. Here, we performed whole transcriptome analysis on bone marrow Pdgfra positive cells at a single cell level and clarified that the cells contained multiple functionally distinct cell populations. Our data will serve as a foundation for identification of the complexed tissue regeneration mechanism in EB.

研究分野：再生医学、エピジェネティクス

キーワード：表皮水疱症 間葉系幹細胞 網羅的遺伝子発現解析 単一細胞

1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症は、表皮基底膜を構成する分子の異常によって起こる遺伝性疾患である。申請者らが着目するVII型コラーゲンの遺伝子変異が原因となる栄養障害型表皮水疱症は、表皮と真皮をつなぎとめるanchoring fibrilの異常により表皮下に反復性の水疱を生じる根治困難な疾患である。申請者らのグループは早期から骨髄由来PDGFR(血小板増殖因子受容体)陽性間葉系細胞に着目し、表皮水疱症の治療法開発を行っている。信頼性の高い効果的な新規治療法を確立するためには、PDGFR陽性間葉系細胞が病的皮膚を再構築するメカニズムの分子基盤の解明が必須である。我々は今までに、損傷組織に動員された骨髄由来間葉系幹細胞が組織実質を構成する細胞に分化し、損傷組織に動員された骨髄由来間葉系幹細胞が抗炎症作用を有することを明らかにしてきた。PDGFRは様々な間葉系の細胞に発現していることに加え、これまでの検討で明らかになった役割の多様性から申請者は、PDGFR陽性間葉系細胞集団は異なった性質を持ったいくつかの亜集団(上皮細胞への分化や炎症抑制に特化した細胞集団)を含んでいるとの仮説をたてるに至った。亜集団を同定しそれぞれの機能を解析することで、PDGFR陽性間葉系細胞がいかに治療効果を発揮するか、その分子基盤の一端を明らかにできると考え、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では骨髄由来PDGFR陽性間葉系細胞集団には様々な機能を持った複数の亜集団が含まれているとの着想を元に、PDGFR陽性間葉系細胞による組織再生の分子メカニズム解明を目指した。具体的には、皮膚に動員されるPDGFR陽性間葉系細胞集団を形成する亜集団を同定しその役割を解明すること、高い治療効果を有する亜集団を同定し高効率治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞の機能や性質は、遺伝子発現パターンによって規定される。遺伝子発現を詳細に検討することで性質不明の細胞の機能などを推定できることになる。細胞の性質の詳細を明らかにすることのできる網羅的遺伝子発現解析の手法として、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法が注目されている。近年の技術的革新により、単一細胞レベルでのRNA-seq法が可能となった。そこで本研究では、組織損傷モデルとして皮膚移植モデルを用いて表皮水疱症における組織再生に関わる細胞を単一細胞レベルで網羅的遺伝子発現解析した。また得られたデータをバイオインフォマティクス解析し、幹細胞の同定、性

状解析を試みた。

4. 研究成果

(1) マウス体内に存在する間葉系幹細胞を単一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析法の確立:

近年単一細胞レベル解析について多くの論文が発表されているが、いまだどのような細胞にも対応できる実験手法の確立はなされておらず、個々の研究者によるターゲット細胞に応じた条件検討が必須である。そこで生体に存在するマウス間葉系幹細胞を信頼性高く、効率的に単一細胞レベルで解析する技術の確立を試みた。まず2015年に発表されたDrop-seq法(Macosko et al., Cell, 2015)を検討した。Drop-seq法は、微小液滴内に単一細胞とその単一細胞をユニークにラベルするためのバーコードを封入し網羅的遺伝子発現解析を可能にした、ハイスループット単一細胞網羅的遺伝子発現解析法の先駆的技術である。本法によるデータ取得は可能であったが、Droplet法と不可分であるDoublet問題(一つの微小液滴に二つの細胞が封入されてしまう)が生じ、以降の解析に支障をきたすと判断し検討を中止した。次にDroplet法に基づいた単一細胞網羅的遺伝子発現解析法を可能にした市販キットであるddSeq/SureCellを用いた解析法を検討した。本法は、条件検討として試した培養細胞には有効であったが、生体内の間葉系幹細胞のデータを再現性よく取得することが困難であり断念した。最後に古くから用いられているFACSソーティングにより細胞を一つずつ独立してマルチウェルにソートし、ウェルの中で独立に網羅的遺伝子発現解析ライブラリを作製する方法を試した。本法は当初効率よく遺伝子を検出することが困難であったが、細胞調製方法、ソーティングプロトコル、遺伝子発現解析ライブラリ作製法の細部を詳細に検討し、信頼性高く単一細胞網羅的遺伝子発現解析データを取得することに成功した。本実験計画では、確立されたFACSソーティングを用いた単一細胞網羅的遺伝子発現解析法を用いた。

(2) 単一細胞レベル遺伝子発現解析データを用いたバイオインフォマティクス解析法の検討:

次に単一細胞網羅的遺伝子発現解析データの解析法について検討した。まずは本実験法において標準法の一つとなりつつある、Drop-tools(Drop-seq法を開発したグループが公開している解析ツール群)を用いた手法を検討した。Drop-toolsは、次世代シーケンスの生データから各細胞における遺伝子発現レベルをシームレスに定量できることを確認した。さらに詳細に細胞集団中に存在する亜集団を検出するために有用なアルゴリズムICGS(Iterative Clustering and

Guide-gene Selection) を実装した AltAnalyze (Olsson et al., Nature 2016) を検討した。AltAnalyze を用いることにより感度良く細胞集団に存在する亜集団を、その亜集団に特徴的に発現する遺伝子、また有意に見いだされる Gene ontology とともに同定できることを確認した。Drop-tools は有用であるが最終結果を取得するまでに数日の時間を要し、迅速な条件検討には不向きであることも確認した。そこで最近発表された zUMI (doi:

<https://doi.org/10.1101/153940>) と Seurat (<https://github.com/satijalab/seu-seu>) を組み合わせることにより、数時間以内に単一細胞網羅的遺伝子発現解析のデータの品質確認ができる系も同時に確立した。両手法を組み合わせることで迅速な単一細胞網羅的遺伝子発現解析が可能となった。

(3) 損傷モデル皮膚に集積する末梢循環細胞の単一細胞レベル網羅的遺伝子発現解析:

前項において検討した単一細胞網羅的遺伝子発現解析にかかる実験法、解析法を用いてマウス生体内に存在する幹細胞の解析を試みた。具体的には損傷皮膚に集積する末梢循環間葉系幹細胞解析するために、末梢循環間葉系幹細胞のソースである骨髓中存在する Pdgfra 陽性間葉系幹細胞の単一細胞網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果骨髓中に複数の亜集団を検出した。それぞれの亜集団ごとに特徴的な機能を有することが示唆された。これは Pdgfra 陽性間葉系幹細胞が骨髓中に存在する時から、複数の機能的亜集団を有することを意味し、その機能の多様性を説明するメカニズムの一端を解明できた。次に損傷皮膚モデルとして皮膚移植を行い、移植皮膚片に集積する骨髓由来 Pdgfra 陽性間葉系幹細胞の解析を行った。しかし解析に十分な数の Pdgfra 陽性間葉系幹細胞を得ることができず解析を断念した。Pdgfra 陽性間葉系幹細胞は、植皮片において他の細胞に分化するなどの理由で、Pdgfra の発現を失うことがあるのではないかと推察した。この問題を解決するためには、Pdgfra-Cre マウスなどと用いて細胞系譜解析を行う必要があるが、本年度はマウスの準備が整わなかった。そこで全身が緑色蛍光色素である GFP を発現する GFP マウスを用いて、同様の植皮実験を行った。植皮片にあつまる末梢循環を介して供給された GFP 陽性細胞を単一細胞網羅的遺伝子発現解析に供した。その結果、組織再生時に植皮片に供給される末梢循環細胞は、血球系細胞と非血球系細胞を含むことが分かった。さらにそれぞれの細胞系譜の中には、機能的亜集団が存在し、多くの細胞種が末梢循環から供給され協調的に組織再生を誘導していることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

1, 新保敬史, 佐々木英嗣, 北山智美, 西田真実, 山崎翔, 大内雄矢, 山本龍馬, Edward Wijaya, 菊池康, 金田安史, 玉井克人: 網羅的遺伝子発現解析による末梢循環 PDGFR 陽性間葉系幹細胞の性状解析 (口演) 第 17 回日本再生医療学会総会、2018.3.21、横浜

2, Takashi Shimbo, Eiji Sasaki, Tomomi Kitayama, Mami Nishida, Sho Yamazaki, Yuya Ouchi, Sachiko Yamaoka, Yasushi Kikuchi, Yasufumi Kaneda, Katsuto Tamai: Characterization of circulating stem/progenitor cells during fatal skin injury regeneration (ポスター) 日本研究皮膚科学会、2017.12.15-17、高知

3, Takashi Shimbo, Mami Nishida, Tomomi Kitayama, Ryoma Yamamoto, Eiichi Takaki, Yasushi Kikuchi, Yasufumi Kaneda, and Katsuto Tamai: Comprehensive analysis on HMGB1-induced circulating cells during cutaneous tissue regeneration (口演) The 47th European Society for Dermatology Research、2017.9.30、Salzburg

4, Takashi Shimbo, Sho Yamazaki, Xin Wang, Yasushi Kikuchi, Leena Bruckner-Tuderman, Yasufumi Kaneda, Katsuto Tamai: HMGB1 ADMINISTRATION AMELIORATES CUTANEOUS AND NON-CUTANEOUS MANIFESTATIONS IN THE MOUSE MODEL FOR AN INHERITED CONNECTIVE TISSUE DISEASE, DYSTROPHIC EPIDERMOLYSIS BULLOSA (ポスター) The International Society for Stem Cell Research、2017.6.14-17、Boston

5, Takashi Shimbo, Sho Yamazaki, Xin Wang, Yasushi Kikuchi, Leena Bruckner-Tuderman, Yasufumi Kaneda, Katsuto Tamai: Systemic HMGB1 administration ameliorates cutaneous and non-cutaneous manifestations in a dystrophic epidermolysis bullosa model mouse (ポスター) Society for Investigative Dermatology、2017.4.26-29、Portland

6, 新保 敬史: 末梢循環間葉系幹細胞による組織再生制御 (シンポジウム) 日本炎症・再生医学会、2017.7.18、大阪

7, Takashi Shimbo, Sho Yamazaki, Xin Wang, Yasushi Kikuchi, Leena Bruckner-Tuderman, Yasufumi Kaneda, Katsuto Tamai: Systemic delivery of HMGB1 ameliorates cutaneous

and non-cutaneous manifestations in a dystrophic epidermolysis bullosa model mouse (口演) 日本遺伝子細胞治療学会、2017.7.20、岡山

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新保 敬史 (SHIMBO, Takashi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：70780609

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし