

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07053

研究課題名(和文) 酸化傷害後に長期に遺残する造血前駆細胞機能不全を反映するエクソソーム核酸の探索

研究課題名(英文) Exosomal Nucleic Acids Reflecting Hematopoietic Progenitor Cell Dysfunction Remaining Long-Term after Oxidative Injury

研究代表者

平林 容子 (Hirabayashi, Yoko)

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・センター長

研究者番号：30291115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、若年期に受けた線照射からの回復後に惹き起こされる白血病を含む遷延性病変の発症機序をなすと考えられる、ほぼ生涯にわたり、特に造血幹・前駆細胞分画に限局して遺残する回復不全の分子基盤の解明を企図していた。ここでは若齢期に照射し、加齢させたマウス骨髄細胞から分離したエクソソームに含まれるsmall RNAを解析し、照射群で明らかに発現量の低下するものを同定した。さらに、その予測される標的遺伝子にはいわゆる癌遺伝子が多数含まれていたことから、照射によって、これらの標的遺伝子の抑制がはずれて活性化し、発がんやその後の増殖に寄与することが示唆される結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームRNAは、がん診断のバイオマーカーのみならず、炎症のマーカーとしての有用性なども示唆されている。末梢血からも分離可能であり、本研究結果においては具体的なマーカー遺伝子の提言には至らなかったが、今後、研究成果を踏まえ分子機序に根ざした有用なマーカー遺伝子を同定することで、長期にわたり遷延する異常を定期的な血液検査によってモニター可能となることが期待される

研究成果の概要(英文)：This study was planned to elucidate the molecular basis of the failure of recovery that remains almost throughout life, especially in the hematopoietic stem/progenitor cell fraction, which is considered to be the pathogenic mechanism of prolonged disorders, including leukemia, induced after recovery from γ -irradiation received at a young age. Here, we analyzed small RNAs in exosomes isolated from bone marrow cells of aged mice irradiated with γ -rays at a young age and non-irradiated mice equivalent in age, and identified those that were clearly down-regulated in the irradiated group compared to the non-irradiated group. Furthermore, since many of the predicted target genes included so-called oncogenes, the results suggest that irradiation disrupts the repression of these target genes and activates them, contributing to carcinogenesis and subsequent proliferation.

研究分野：基礎医学

キーワード：エクソソームRNA 造血幹・前駆細胞 線照射

1. 研究開始当初の背景

本研究は、若年期に受けた 2Gy の照射による急性期の障害性からの回復後に惹き起こされる白血病を含む遷延性病変の発症機序をなすと考えられる、ほぼ生涯にわたり、特に造血幹・前駆細胞分画に局限して遺残する回復不全の分子基盤の解明を企図していた。即ち、同じ線量の照射を受けたマウスのうち、比較的早期に白血病が発生する個体は 30%程度に留まるものの、これを免れた個体であっても、加齢と共に非照射マウスにも発生する造血器腫瘍の発症の早期化がみられるなど、単回の全身照射が生涯にわたって影響し続ける背景基盤は未解明の課題である。このことを解決するためには、造血幹前駆細胞側のみならず、造血を支えるニッチ (niche) の生理機能やその障害による不全状態に対する理解も不可欠と考えられる。ここでは、照射後経時的に変化してゆく両者の相互作用をも包含する指標として、病態や組織傷害の指標への適用の可能性についても期待される末梢血中のエクソソーム RNA に着目した。エクソソームは、様々な細胞から分泌され、細胞特異的な miRNA や mRNA などを含む数十から百ナノメートル程度の脂質二重膜の小胞からなる。200 μ L 程度の末梢血で解析でき、同一個体での経時的な検討も行えることから、確率的な事象に対する、前向き研究が可能となる。結果として、特に、未分化な造血幹前駆細胞の長期にわたる遷延性の回復遅延のマーカー遺伝子が得られれば、白血病発症につながる機構解明の手がかりを得る上でも有効と考えた。

生体は高用量の活性酸素を速やかに消去する機構を備えることによって初めて酸素を活用した生存形式を確立した。一方、低用量の酸化的ストレスに対する生体応答は、種々の遺伝子発現調節に関わり、生体の維持調節機構として必須の役割を担っていることがわかってきた。また、組織幹細胞としての造血幹・前駆細胞は細胞治療や遺伝子治療の中心を担うが、幹細胞とこれを支えるニッチは、前者に幹細胞特異的薬物代謝関連因子 (例えば ABC トランスポーターや異物受容体 [aryl hydrocarbon 受容体, AhR] など) の発現がみられ、後者が酸化的ストレスに対する造血維持センサーとなっているなど、生体異物相互作用の中心ともなっている。

2 Gy のガンマ線の単回全身照射を受けたマウスの造血細胞数は、照射直後には急激に減少するが、その後の回復の速度は、おおむねその分化度に従い、分化型の血球ほどより早く年齢相応の非照射対照群と同じレベルに到達する。即ち、末梢血や骨髓細胞の数は 4~6 週間には回復し、その後は年齢相応の非照射対照群と同程度の数で推移する。一方、分化型の前駆細胞は、数的には一度回復した後も増減を繰り返し、徐々に年齢相応の非照射対照群レベルに収束する。更により未分化な造血幹・前駆細胞では、ほぼ生涯にわたって数が少ない状態が持続し、併せて細胞内酸化的ストレスの指標としての 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) の蛍光強度や、PiK3r1 や Ccnd1 などの細胞回転関連遺伝子発現の加齢に伴う増加が、照射を受けた群では更に増強することも観察されている。この時の造血前駆細胞の細胞動態を当申請者が考案したコロニー形成性の造血前駆細胞特異的な個体レベルにおける細胞周期測定法 (BUUV 法) で解析すると、BrdUrd の標識率を経時的に観察することで、従来の短期標識で得られた結果は再現しつつも、照射 1 ヶ月後の標識率は有意に抑制されていることが初めて明らかとなった。その後、BrdUrd の標識率は年齢相応の非照射対照群と同じレベルに到達したが、照射 10 カ月後には有意な増加に転じ、この状態がほぼ生涯にわたって持続することを見出した。

2. 研究の目的

本研究は、独自に開発した実験ツールを用いた造血幹・前駆細胞の細胞周期の解析結果を基盤とし、様々な組織から分泌されるエクソソームに含まれる RNA を指標として、前向き研究によって、白血病発症という確率的な事象の発生基盤として考えられている、造血幹細胞分画の遷延する回復不全状態の分子基盤を明らかにすることを企図していた。

3. 研究の方法

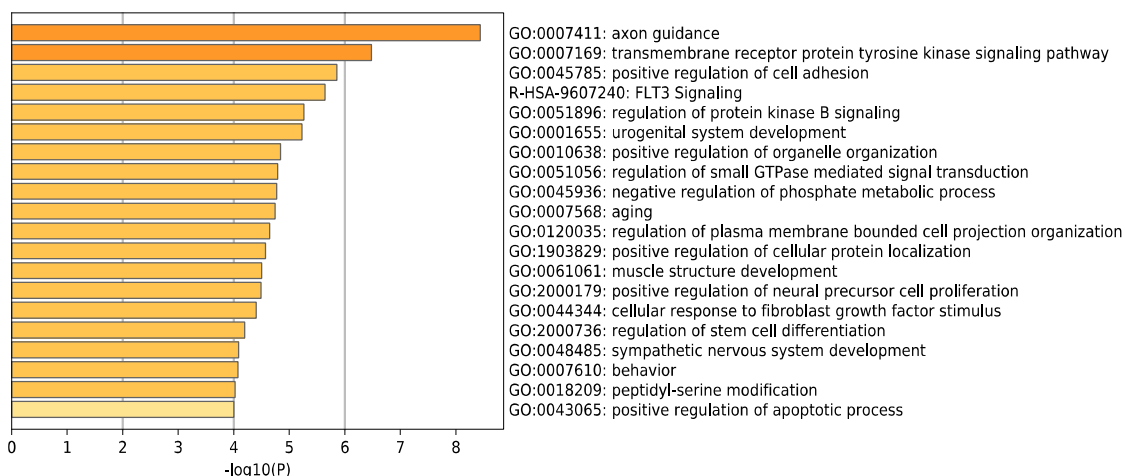
(1) エクソソーム RNA の分離: エクソソームは、extracellular vesicles (EVs) のサブタイプの一つであり、様々な細胞から分泌される miRNA などを内包する脂質二重膜に覆われた小胞として、その存在は知られていたものの、がん診断のバイオマーカーとしてにわかに注目されるにいたった。また、炎症のマーカーとしての有用性が示唆される (Gaitero L, et al., 2016) など、病態や組織傷害の指標への適用の可能性についても期待され、細胞や組織レベルでの検討が進みつつあるが、本研究で志向している個体レベルでの障害性マーカーとしての活用には至っていない。まずは、エクソソーム RNA の計測条件の検討からはじめ、単離方法としては、超遠心ペレットダウン法、ポリマー沈殿法などを試行したうえで、超遠心法による分離方法を確立した。得られた EV の peak size は、nanoparticle-tracking analysis (NTA) により 67nm であり、文献的な報告値とも一致していた。

(2) 照射マウスからの骨髓細胞の採取：本研究では、まず若齢期に照射後、加齢させたマウス骨髓細胞から分離した EV に含まれる small RNA の解析を行い、ここで得られた成果を元に、経時的な変化についても解析を進める事を計画していた。即ち、6 週齢の雄の C57BL/6 マウスに 200cGy の 線全身照射をし、非照射群とともに、SPF 条件下で 18 ヶ月齢まで飼育後、採取した骨髓細胞を解析に供した。尚、照射後の経時的な解析については、末梢血からの EV の採取条件の検討などをすすめたが、コロナ禍での解析の遅れにより、まとまった結果を得るには至らなかった。

(3) 遺伝子解析：分離採取した EV に含まれる RNA の塩基配列を、次世代シーケンサー（所属部所有の Illumina 社製 Miseq 及び Nextseq500）を用いて網羅的に同定した。照射群と非照射群のそれぞれの発現プロファイルの比較によって差異の認められた RNA は、metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) などによって Gene Ontology (GO) 解析した。更に両群で差異の大きかった RNA の二次構造について、online ツール centroidfold (<http://rtools.cbrc.jp/centroidfold/>) を使って予測したところヘアピン構造をとる miRNA であることが有力視されるものが含まれる結果が得られた。そこで、その標的遺伝子の予測を、miRDB (<http://mirdb.org/mirdb/index.html>) により行った。さらに、その予測遺伝子リストによる GO 解析などもすすめた。

4. 研究成果

(1) 照射群と非照射群における発現量の異なる RNA の Gene Ontology (GO) 解析：両群の small RNA の発現プロファイルを比較することで、明らかに発現量の異なる一連の small RNAs が分離された。これらのうち発現量の差異に有意差の認められた 273 個の RNA で GO 解析したところ、加齢、幹細胞分化、アポトーシス制御などに関連することが示された（下図）。



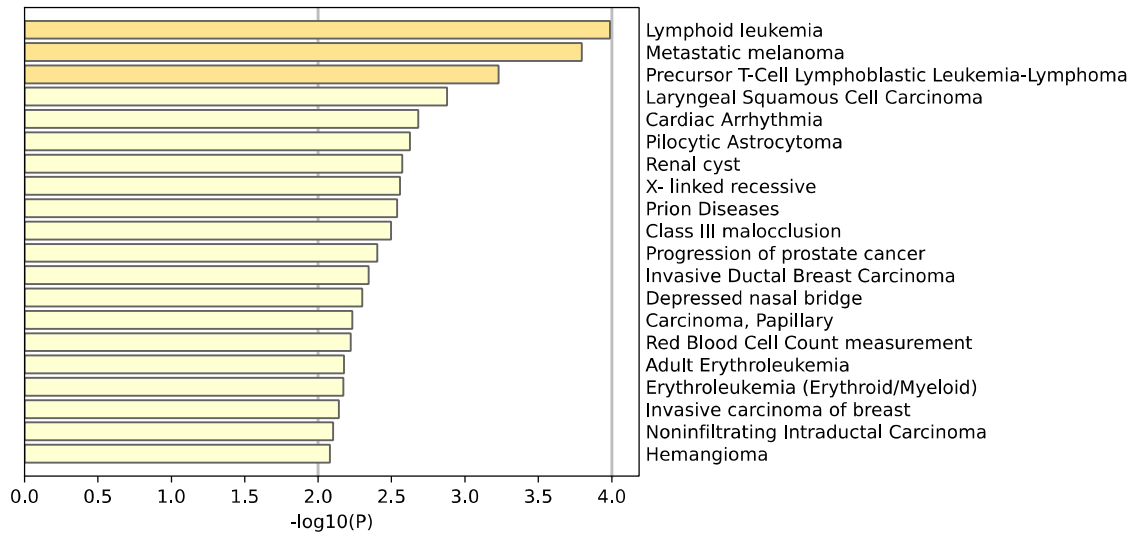
これらの結果は、これまでに得られた限定的な遺伝子群を対象とした定量 PCR による結果とも符合するものと考えられた。

(2) 照射群で明らかに発現量の低下が示された small RNA

(1) で得られた 273 個の RNA のうち、照射群で発現がなくなるものが 11 個得られたので、これらの解析を先行することとした。このうち、RNA の配列を centroidfold で解析した結果、ヘアピン構造をとる miRNA であることが有力視され、かつ、既存の遺伝子座にコードされた以下の 2 つの RNA について、更に解析を進めた。尚、273 個の RNA のうち、11 個以外は、照射群で非照射群より発現が上がったものも含め、非照射群との発現比が 2 倍程度以内に留まっていた。

a) Brms1l (BRMS1 like transcriptional repressor) のエクソン中に存在する新規エクソソーム RNA : Brms1l は breast carcinoma metastasis suppressor (BRMS1) に相同性を持ち、glioblastoma や ovarian cancer を抑制する作用が報告されている。2Gy の照射群において、Brms1l の遺伝子発現は低下していたことから、今回得られた結果は、照射群でのがん抑制作用の低下状態が反映されたものと考えられる。

b) Tmprss15 (transmembrane serine protease 15) に存在する新規エクソソーム RNA : miRDB で解析した結果、標的候補遺伝子として、癌遺伝子として知られる EglN1, Usp28, Prkd3, Pou4f2, Tal1 など、177 の遺伝子が示された。これらの標的遺伝子群のうち、上位 49 個の遺伝子で GO 解析を行うと、白血病が最上位に位置する結果が得られた（下図）。



尚、Egl1 (egl-9 family hypoxia-inducible factor 1) は、ユビキチンを介して p53 を分解する癌遺伝子として、Usp28 は、発がんを促進する脱ユビキチン化酵素として、Prkd3 はがん細胞の増殖、浸潤などを促進する serine/threonine kinase として、Pou4f2 ヒト卵巣癌において癌細胞の生存や薬剤耐性獲得に関わる転写因子として、Tal1 はヒト T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL：ヒト T 細胞急性リンパ芽球性白血病) において、がん抑制遺伝子である FBXW7 腫瘍抑制因子を標的としたがん遺伝子として、それぞれ報告されている。

照射群においては、これらの標的遺伝子の抑制がはずれて活性化しており、発がんやその後の増殖に寄与していることが想定される。

今後は、これまで得られた知見をもとに、別途解析を進めている末梢血由来の週齢特異的なエクソソーム RNA の解析とも比較検証することで、白血病を含む遷延性病変の発症のより詳細な機序解明を図りたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hirabayashi Yoko, Maki Kazushige, Kinoshita Kiyoshi, Nakazawa Takahiro, Obika Satoshi, Naota Misaki, Watanabe Kazuto, Suzuki Mutsumi, Arato Teruyo, Fujisaka Aki, Fueki Osamu, Ito Kosuke, Onodera Hiroshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acid Therapeutics	6. 最初と最後の頁 114 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/nat.2020.0879	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 Yano Tsuneo, Hasegawa Koki, Sato Tatsuhiko, Tatsumi Mitsuki, Watabe Tadashi, Kadonaga Yuichiro, Kabayama Kazuya, Fukase Koichi, Hachisuka Akiko, Hirabayashi Yoko, Fujii Hirofumi, Yonekura Yoshiharu	4. 巻 69
2. 論文標題 Rationale for Translational Research on Targeted Alpha Therapy in Japan ?Renaissance of Radiopharmaceuticals Utilizing Astatine-211 and Actinium-225?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RADIOISOTOPES	6. 最初と最後の頁 329 ~ 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3769/radioisotopes.69.329	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 Tsuboi Isao, Harada Tomonori, Hirabayashi Yoko, Aizawa Shin	4. 巻 99
2. 論文標題 Dynamics of hematopoiesis is disrupted by impaired hematopoietic microenvironment in a mouse model of hemophagocytic lymphohistiocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 1515 ~ 1523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04095-2	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 Ono Ryuichi, Yoshioka Yusuke, Furukawa Yusuke, Naruse Mie, Kuwagata Makiko, Ochiya Takahiro, Kitajima Satoshi, Hirabayashi Yoko	4. 巻 7
2. 論文標題 Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology Reports	6. 最初と最後の頁 685 ~ 692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxrep.2020.05.002	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 Oka Shin-Ichi, Chin A Dave, Park Ji Yeon, Ikeda Shohei, Mizushima Wataru, Ralda Guersom, Zhai Peiyong, Tong Mingming, Byun Jaemin, Tang Fan, Einaga Yudai, Huang Chun-Yang, Kashiwara Toshihide, Zhao Mengyuan, Nah Jihoon, Tian Bin, Hirabayashi Yoko, Yodoi Junji, Sadoshima Junichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Thioredoxin-1 maintains mitochondrial function via mechanistic target of rapamycin signalling in the heart	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvz251	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 Tsuboi Isao, Harada Tomonori, Hirabayashi Yoko, Aizawa Shin	4. 巻 104
2. 論文標題 Senescence-accelerated mice (SAMP1/TA-1) treated repeatedly with lipopolysaccharide develop a condition that resembles hemophagocytic lymphohistiocytosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.209551	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 Ono Ryuichi, Yasuhiko Yukuto, Aisaki Ken-ichi, Kitajima Satoshi, Kanno Jun, Hirabayashi Yoko	4. 巻 2
2. 論文標題 Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0300-2	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Y Hirabayashi
2. 発表標題 Radiation-induced late effects and senescence: their synergistic effects on cell-cycle related gene-expressions in the hematopoietic stem/progenitor cells
3. 学会等名 XVI Latin-American Toxicology and Chemical Safety ALATOX Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y Hirabayashi
2. 発表標題 ICH Anniversary: Summary of 30 Years and Future - Prospects in S Area with Role of Japan
3. 学会等名 17th DIA Japan Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
3. 学会等名 55th Congress of the European Societies of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 Horizontal gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference: Engineering the Genome (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y
2. 発表標題 Evaluation of exosomes as toxic biomarkers in mouse
3. 学会等名 15th International Congress of Toxicology (ICTXV) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y
2. 発表標題 Evaluation of extracellular vesicles (EVs) as toxic biomarkers in mouse
3. 学会等名 59th Annual Meeting of Society of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 Draft Guideline for Non-Clinical Safety Evaluation of Oligonucleotide Therapeutics in Japan
3. 学会等名 DIA Oligonucleotide-based Therapeutics Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平林容子
2. 発表標題 シンポジウム「2Gy全身照射による遷延性の造血幹細胞障害と加齢影響」
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Keiko Tano, Satoshi Yasuda, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoji Sato and Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 A possible risk of genome editing for human gene therapy
3. 学会等名 The 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 DSB Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the Genome Editing
3. 学会等名 ASAITOX 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平林容子
2. 発表標題 シンポジウム「核酸医薬品とその安全性評価戦略」
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Uchida E, Naito Y, Ono R, Hirabayashi Y, Inoue T, Sato Y
2. 発表標題 Safety assessment of CRISPR-Cas9 genome editing for human gene therapy
3. 学会等名 第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Keiko Tano, Satoshi Yasuda, Kenichi Aisaki, Yoji Sato, Satoshi Kitajima, Jun Kanno and Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 Evaluation of Possible Risk in Genome Editing for Human Gene Therapy
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of Society of Toxicology and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------