

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09803

研究課題名(和文) 多能性幹細胞が分泌するエクソソーム機能性RNAの細胞外機能に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Study on extra-cellular function mediated by functional RNAs in exosomes secreted from pluripotent stem cells

研究代表者

野崎 中成 (NOZAKI, Tadashige)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90281683

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)：細胞から分泌されるエクソソーム由来の機能性RNAは、細胞の多様な機能に関するバイオマーカーとして注目されている。エクソソーム由来miRNAが幹細胞に与える影響について、組織幹細胞である歯髄幹細胞を用いた解析を行った。多様な細胞の機能に関わるポリADP-リボシル化はエクソソーム産生にも関与する。そこで、歯髄幹細胞のポリ(ADP-リボ-ス)合成酵素(PARP1)活性をゲノム編集、あるいは阻害薬により抑制し、エクソソーム由来miRNAの網羅的発現解析と細胞機能の解析を行った。これらの解析から、歯髄幹細胞においてPARP1がエクソソームを介して細胞老化の制御に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織幹細胞である歯髄幹細胞は「再生医療等製品」として臨床への応用が期待されている。しかしながら、長期にわたり継代培養を続けると、細胞老化によって増殖能や分化能が低下するという問題点がある。ポリADP-リボシル化は翻訳後修飾の重要なファクターであり、老化に深く関与していると考えられている。本研究では、PARP1が歯髄幹細胞で産生されるエクソソームに含まれる機能性RNAを制御することで、細胞老化をコントロールしている可能性を見出した。PARP1がエクソソーム機能性RNAを介した細胞老化に関与することを示した本研究は、老化に関わる新たなメカニズムの解明に発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Functional RNAs in exosomes secreted from cells participate in a variety of cell functions and are expected as biomarkers. Poly ADP-ribosylation is a post-translational modification that controls major functional and biological processes in cells, including production of exosomes. To determine the effect of poly ADP-ribosylation on functional RNAs in exosomes secreted from dental pulp stem cells and its ramifications on downstream signal transduction, we knocked down poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in dental pulp stem cells using genome editing or inhibitors and performed an exhaustive analysis of the expression of microRNAs derived from the exosomes and the resulting alterations in cell functions. We found that PARP1 could potentially control senescence mediated by their exosomes in dental pulp stem cells.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医学 幹細胞 エクソソーム microRNA 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞から遊離して循環するエクソソーム機能性 RNA (分泌型 miRNA) は、多様な疾患の非侵襲的な診断バイオマーカーとして注目されている。liquid biopsy への臨床応用が期待され、分泌型 miRNA の解明には、社会的ニーズがある。分泌型 miRNA は、細胞外に放出されるホルモンのように働き、生体機能の微調整役を担うため、その異常は疾病の発症や進行と関連することが予測される。これらの学術的背景を踏まえて、分泌型 miRNA が標的細胞へ入り細胞機能にどのような変化を与えるかという学術的「問い」が存在した。

(2) これまでの研究で、多能性幹細胞であるマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) で Parp1 両側アレルに遺伝子操作したクローン株を用いて、培養上清からエクソソームを抽出し、分泌型 miRNA の次世代シーケンス解析を行った。Parp1 欠損により small RNAs の構成が変化すること、細胞外に分泌されたエクソソーム miRNA が標的細胞の細胞死を抑制する可能性を示した。

(3) PARP1 はタンパク質の翻訳後修飾であるポリ ADP リボシル化を担う酵素である。リン酸化など他の翻訳後修飾と同様に、ポリ ADP リボシル化は細胞内情報伝達に関与するが、ポリ ADP リボシル化の細胞外での情報伝達や細胞間コミュニケーションへの関与については明らかにされていない。主に細胞内情報伝達を担うとされている PARP1 の細胞外での働きに着目する点で学術的独自性があった。

2. 研究の目的

細胞外に分泌される脂質二重膜からなる微小な小胞であるエクソソームは、細胞間の情報伝達に関与する。研究代表者はこれまでに、翻訳後修飾であるポリ ADP-リボシル化反応を担う Parp ファミリー1 (Parp1) が細胞間情報伝達に及ぼす機能的意義について、Parp1 欠損型マウス ES 細胞株を用いた研究を行い、Parp1 が細胞外に遊離されるエクソソーム中の分泌型 miRNA を介した細胞外情報伝達にも関与し、細胞間コミュニケーションをコントロールする可能性について報告した。一方、間葉系幹細胞 (MSC) が分泌するエクソソームを介した機能については、多くの研究がなされている。MSC は組織幹細胞として再生医療の有用なソースとなるが、MSC 由来エクソソームも再生医療における有用性が示され、注目されている。ヒト歯髄幹細胞 (DPSC) は抜歯した歯髄から得られ、骨、軟骨、脂肪への分化能や高い増殖能を有するといった、MSC と類似した性質を持つことが知られている。DPSC が発現する PARP1 が、DPSC 由来エクソソームを介してどのような細胞機能に関与するかについては十分な解明はなされていない。本研究は、これまでの研究を包括的に発展させ、ヒト DPSC の PARP1 が、エクソソームに含まれる分泌型 miRNA に与える影響と、それによる細胞外情報伝達および標的細胞の細胞機能に与える変化について調べる。DPSC 由来分泌型 miRNA の細胞外機能に関する研究を通じて、機能性 RNA 創薬へ展開するための基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) DPSC の幹細胞特性の解析

ヒト DPSC (Lonza) を使用した。DPSC の幹細胞特性を明らかにするため、*in vitro* における細胞増殖の解析、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの発現解析および骨細胞、脂肪細胞への分化能の評価を行った。

(2) DPSC の PARP1 ゲノム編集と培養上清中エクソソーム miRNA の解析

DPSC における PARP1 の発現をノックアウトするため、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集を試みた。PARP1 のエクソン部分に crRNA をデザインし、tracrRNA とハイブリダイゼーションさせたのち、エレクトロポレーション法を用いて、Cas9 タンパク質とともに DPSC へ導入した。限界希釈法によってゲノム編集細胞のシングルセル化を試みたが、PARP1 ノックアウト細胞のシングルセル化に成功しなかったため、シングルセル化せずに解析を進めた。PARP1 ノックアウトの効率は、得られた細胞のポリ ADP-リボース (PAR) 合成反応を指標とし、PARP1 を最も効率よくノックアウトすることができた crRNA を選択した。さらに、得られた細胞は、免疫蛍光染色でも PARP1 の発現が低下していることを確認した。この細胞を拡大培養し、培養上清から exoRNeasySerum/Plasma Maxi Kit を用いてエクソソームを単離し、RNA を抽出した。QIaseq miRNA Library Kit を用いてライブラリを調製し、次世代シーケンス解析を行った。有意に発現変動した miRNA に対しデータベースを用いたターゲット遺伝子の予測解析を行い、ターゲット遺伝子に共通する生物学的機能を見出すため、Gene Ontology (GO) のエンリッチメント解析を行った。

(3) PARP 阻害薬を用いた DPSC の細胞機能の解析

PARP 阻害薬 olaparib (AZD2281) 添加による DPSC の細胞増殖能や細胞周期解析のほか、細胞老化マーカー (CDKN2A/P16, CDKN1A/P21) および細胞老化関連分泌形質 Senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子である TGFβ2/TGF-beta2 の発現解析を行った。また、抗 TGF-beta 抗体 (1D11) の添加実験を行い、PARP 阻害により促進される細胞老化における細胞情報伝達と TGFβ2 発現との関係について調べた。

4. 研究成果

(1) DPSC の特性を明らかにするため、*in vitro* における細胞増殖、細胞表面マーカーの発現および分化能の解析を行った。DPSC は初代培養細胞であり、当初良好な細胞増殖を示したが、MSC と同様に継代培養を繰り返すことにより細胞増殖の低下が認められた (図 1)。DPSC において、MSC マーカーは発現していたが、血球・造血幹細胞マーカーの発現は認められなかった。ヒト骨髄、骨由来の MSC では CD271(+)/SSEA-4(+) 細胞の存在が報告されているが、DPSC では CD271(+)/SSEA-4(+) 細胞は認めなかった。一方、CD271(+)/または SSEA-4(+) 細胞はわずかに存在した。MSC マーカーを発現し、MSC と同様に骨分化能および脂肪分化能を有していることから、対数増殖期の DPSC は MSC と同様の増殖能、分化能を有していることが確認された。

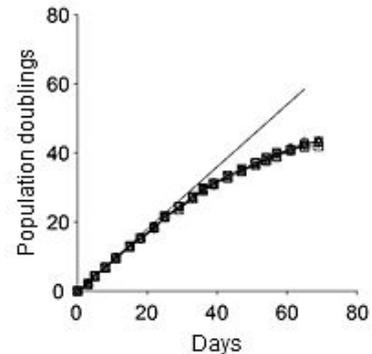


図 1 DPSC の細胞増殖能

(2) PARP1 のエクソン部分に 4 種類の crRNA をデザインし、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集を試み、PARP1 ノックアウト細胞を得た (図 2A)。PAR 合成反応を指標に PARP1 活性を測定し、各 crRNA を導入した細胞から最も高いノックアウト効率を持つクローンを選択した。免疫蛍光染色でも PARP1 の発現が認められないことを確認し、PARP1 ノックアウト細胞とした (図 2B)。

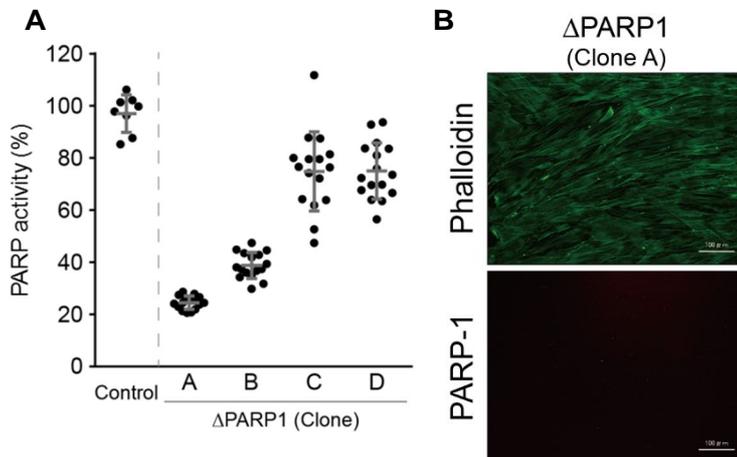


図 2 CRISPR-Cas9 システムを用いた PARP1 ゲノム編集

(A) 4 種類の crRNA による PARP1 活性の比較 (B) PARP1 ノックアウト細胞の免疫染色。ファロイジンによる細胞内アクチンフィラメントと PARP1 の免疫染色を示す。ノックアウト細胞では PARP1 の発現が認められなかった。

(3) 拡大培養を行い、培養上清から得られたエクソソーム由来 miRNA について、次世代シーケンス解析を行った。得られた 75bp のシングルエンドリードは、ヒトのレファレンスゲノムヘアライメントを行った。検出された 2494 個の全 miRNA リストを作成し、アノテーションを付与した。ノックアウト細胞のエクソソーム miRNA で、有意に発現上昇している 163 個、発現下降している 171 個を抽出した。ノックアウト細胞で 2 倍以上の発現上昇がみられ、かつ高いリードカウントを持つ miRNA を 10 個抽出した。MIR-4532 と MIR-520d-3p を除く miRNA は、細胞増殖との関与が報告されていた。(図 3)。さらに、GO エンリッチメント解析を行った結果、細胞老化への関与が示唆される GO Term が抽出された。ノックアウト細胞はコントロール細胞に比べ細胞増殖が抑制されており、PARP1 ノックアウトによって増加する分泌型 miRNA は DPSC の細胞老化を促している可能性が示唆された。

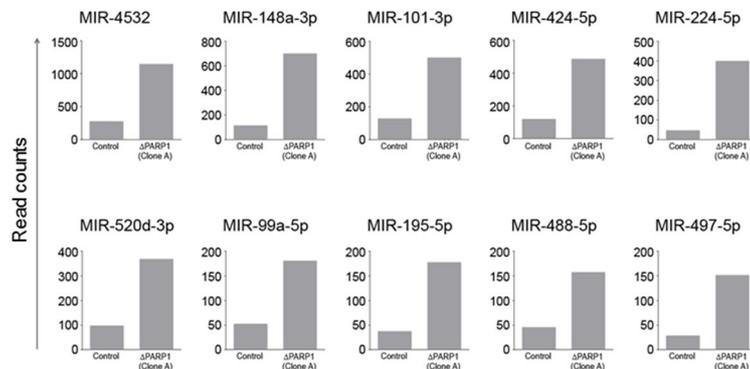


図 3 次世代シーケンス解析

ノックアウト細胞で 2 倍以上の発現上昇がみられ、かつ高いリードカウントを持つ miRNA を抽出した。

(4) ゲノム編集により PARP1 をノックアウトした DPSC は増殖能力が著しく低下したため、AZD2281 を用いた解析を行った。PARP1 と細胞老化との関連が次世代シーケンス解析によって示唆されたことから、PARP 阻害による DPSC の細胞老化への影響を調べた。DPSC において、1~10 μ M AZD2281 存在下で、濃度依存性に PARP1 活性が抑制されることを確認した。DPSC は AZD2281 濃度依存的に細胞増殖活性の低下を認め、G0/G1 期細胞の割合の減少と G2/M 期細胞の割合の増加が認められた(図4)。老化細胞では、分裂期の回避により4倍体の細胞で細胞周期停止すると報告されており、DPSC は AZD2281 による PARP 阻害によって細胞増殖が低下し、細胞老化が惹起されていることが示唆された。

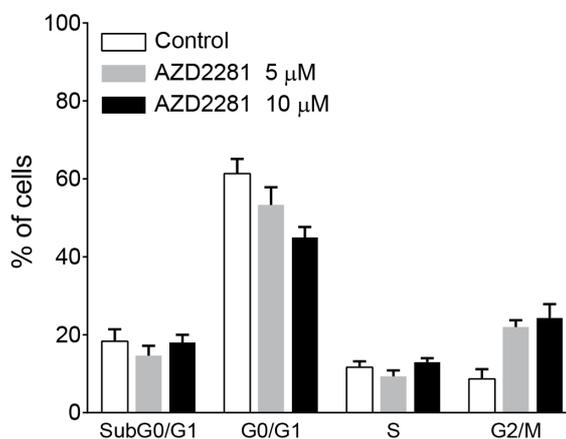


図4 PARP 阻害薬による細胞周期への影響
DPSC に AZD2281 を添加し、PI 染色による細胞周期解析を行った。

(5) 細胞老化マーカー (CDKN2A/P16, CDKN1A/P21) の発現は上昇する傾向が認められた(図5)。次世代シーケンス解析の結果から、PARP 1 を阻害すると TGF-beta シグナル経路が亢進することが示唆された。間葉系細胞において TGFB2/TGF-beta2 は SASP 因子として細胞老化に関わることが報告されているので、DPSC における TGFB2 の発現解析を行った。DPSC において、AZD2281 添加により PARP を阻害すると、TGFB2 の有意な発現上昇が認められた(図5)。

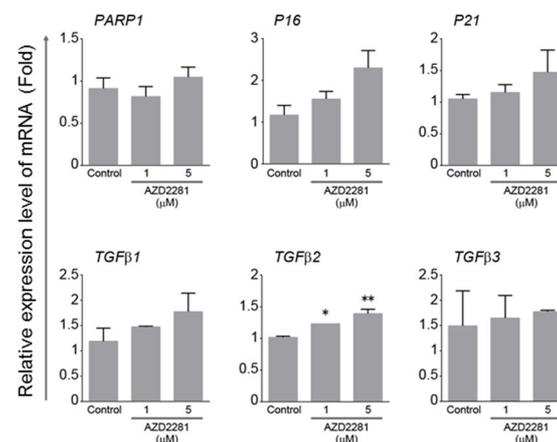


図5 PARP 阻害薬による mRNA 発現変化

DPSC に AZD2281 を添加しても PARP1 の発現は変化しなかった。TGFB2/TGF-beta2 は AZD2281 濃度依存的に有意な発現上昇を認めた。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

(6) 抗 TGF-beta 抗体 (1D11) を添加し、TGF-beta を阻害すると、PARP1 阻害により誘導される細胞増殖抑制が解除される傾向にあった(図6)。これらの結果から、DPSC における PARP1 阻害により誘導される細胞老化に、TGFB2 の発現上昇が関与していることが示唆された。

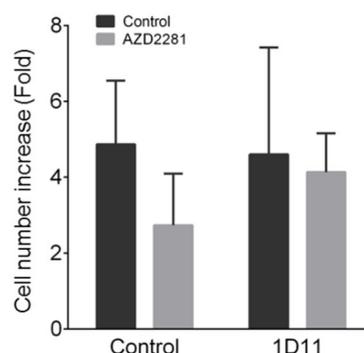


図6 抗 TGF-beta 抗体による細胞増殖活性低下の抑制効果

DPSC に AZD2281 存在下で細胞増殖活性が低下した細胞に 1D11 を添加し、5 日後の播種細胞数に対する細胞数を測定した。

本研究では、歯髄幹細胞において PARP1 の欠失や活性阻害によって、細胞老化に関連するエクソソーム miRNA の産生により、TGFB2 に代表される SASP 因子が誘導されることを明らかにした。PARP1 が歯髄幹細胞で産生されるエクソソームに含まれる機能性 RNA を制御することで、細胞老化をコントロールしている可能性を見出した。PARP1 がエクソソーム機能性 RNA を介した細胞老化に関与することを示した本研究は、老化に関わる新たなメカニズムの解明に発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujihara Hisako, Nozaki Tadashige, Tsutsumi Masahiro, Isumi Mayu, Shimoda Shinji, Hamada Yoshiki, Masutani Mitsuko	4. 巻 8
2. 論文標題 Spontaneous Development of Dental Dysplasia in Aged Parp-1 Knockout Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8101157	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 Chen Lichao, Gunji Akemi, Uemura Akiko, Fujihara Hisako, Nakamoto Kentaro, Onodera Takae, Sasaki Yuka, Imamichi Shoji, Isumi Mayu, Nozaki Tadashige, Kamada Nobuo, Jishage Kou-ichi, Masutani Mitsuko	4. 巻 167
2. 論文標題 Development of renal failure in PargParp-1 null and Timm23 hypomorphic mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 116 ~ 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2019.07.003	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 Sasaki Yuka, Fujimori Hiroaki, Hozumi Miyuki, Onodera Takae, Nozaki Tadashige, Murakami Yasufumi, Ashizawa Kazuto, Inoue Kengo, Koizumi Fumiaki, Masutani Mitsuko	4. 巻 79
2. 論文標題 Dysfunction of Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase Induces a Synthetic Lethal Effect in Dual Specificity Phosphatase 22-Deficient Lung Cancer Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3851 ~ 3861
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-1037	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 Kudo Yuko, Sasaki Yuka, Onodera Takae, Hashimoto Jun, Nozaki Tadashige, Tamura Kenji, Watanabe Masatoshi, Masutani Mitsuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Measurement of Poly(ADP-ribose) Level with Enhanced Slot Blot Assay with Crosslinking	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Challenges	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/chal1e9020027	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0件

〔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
研究協力者	中塚 隆介 (Nakatsuka Ryusuke)		
研究協力者	益谷 美都子 (Masutani Mitsuko)		

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