

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16027

研究課題名（和文）組織再生に関わる末梢循環骨髄間葉系幹細胞における単一細胞網羅的遺伝子発現解析

研究課題名（英文）Single cell transcriptome analysis on circulating mesenchymal stem cells during tissue regeneration

研究代表者

新保 敬史（Shimbo, Takashi）

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：70780609

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：機能的な組織損傷再生には、失われた組織を再構築する細胞の供給が必須である。申請者らは、表皮水疱症モデルマウスを用いて、骨髄由来PDGFR⁺陽性間葉系幹細胞の供給が損傷組織再生に重要であることを発見した。本研究では、組織再生に関わる末梢循環骨髄由来PDGFR⁺陽性間葉系幹細胞における単一細胞網羅的遺伝子発現解析により機能的亜集団を網羅的に同定し、本細胞の包括的な理解を試みた。解析により、骨髄由来PDGFR⁺陽性間葉系幹細胞プールにおける機能的亜集団を発見することに成功した。また骨髄由来PDGFR⁺陽性間葉系幹細胞が動員された損傷組織内において分化し、多様な機能を発揮していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞の高い抗炎症作用や分化能は、再生医療の分野で注目を集め内外で積極的に研究されている。我々が着目する生体に元来備わっている組織再生メカニズムを促進する組織再生誘導機構では、体外での幹細胞培養が不要であるため癌化のリスクはなく表皮水疱症新規治療法として有望である。組織再生誘導を担う末梢循環骨髄由来PDGFR⁺陽性間葉系幹細胞を単一細胞レベルで網羅的に解析し、その組織修復メカニズムを明らかにしようと試みる本研究は先駆的かつ革新的である。また末梢循環間葉系幹細胞には未解明な点が多く、生物学、発生学、幹細胞学の観点からも学術的価値は非常に高いと考える。

研究成果の概要（英文）：The supply of cells to damaged tissue is essential for functional tissue regeneration. Using a mouse model of epidermolysis bullosa, we found that the supply of bone marrow-derived PDGFR⁺-positive mesenchymal stem cells is important for tissue regeneration. In this project, we comprehensively identified functional subpopulations in circulating bone marrow-derived PDGFR⁺-positive mesenchymal stem cells involved in tissue regeneration by single-cell RNA-seq analysis. We successfully identified functional subpopulations in the bone marrow-derived PDGFR⁺-positive mesenchymal stem cell pool. We also demonstrated that bone marrow-derived PDGFR⁺-positive mesenchymal stem cells can differentiate and exert diverse functions in the mobilized damaged tissues.

研究分野：再生医療

キーワード：シングルセルRNA-seq 表皮水疱症 間葉系幹細胞 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

損傷治癒は、複数の反応が協調的に制御され進む極めて複雑な生体反応である。その中で最も重要な過程は、失われた組織を再構築するための細胞の計画的な供給であるが、そのメカニズムに関しては未解明な点が多い。我々は、VII型コラーゲン遺伝子変異を原因とする栄養障害型表皮水疱症に着目し、損傷治癒過程における細胞供給メカニズムの解明とその知見に立脚した新規治療法開発を目指してきた。VII型コラーゲンの機能喪失は、真皮と表皮をつなぎとめる皮膚基底膜構造の破綻を招き、簡単な外力による表皮剥離を誘発する。その結果表皮水疱症患者皮膚では生涯にわたり反復性の水疱が生じる。反復性の水疱形成は、しばしば皮膚の瘢痕化を招き、患者 QOL 低下の大きな要因となる。また一部の瘢痕化した皮膚からは扁平上皮癌が生じる。とくに重症栄養障害型表皮水疱症患者では若年期において悪性の扁平上皮がんを生じ、その予後は極めて悪い。表皮水疱症に対する根治的な治療法は存在せず、その開発は喫緊の課題である。表皮水疱症のように広範に水疱や壊死を伴うような状況では組織再生時、近傍組織からの細胞供給は想定し難く、水疱部における組織再生メカニズムは謎であった。VII型コラーゲンの発現が著しく低い表皮水疱症モデルマウスなどを用いて我々は、以下のような従来想定されていなかった、末梢循環骨髄由来 PDGFR (platelet derived growth factor receptor alpha) 陽性間葉系幹細胞の機能的動員を中心とした新規の組織再生メカニズムを発見した(Tamai et.al, PNAS 2011, PMID: 21464317)。損傷から放出される核内シャペロンタンパク HMGB1 (high mobility group box 1) が、骨髄を活性化し末梢循環中の骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞を増加させることで組織再生を促進すること、骨髄活性化を担う HMGB1 ペプチドの投与は、全身性の壊死や水疱を伴う表皮水疱症モデルマウスの生存期間を著しく改善することを明らかにした。生体内組織修復メカニズムを利用した HMGB1 ペプチドによる組織再生誘導治療法は、表皮水疱症のみならず他の壊死を伴う難治性疾患の新規治療法となりうる可能性をもつ。そこで本研究では、未解明な点が多い末梢循環中骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞が組織再生を誘導するメカニズムを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

表皮水疱症患者皮膚では、広範囲に水疱形成による壊死が生じる。そのため近傍組織からの細胞供給が限定的であると考えられ、どのように失われた組織を再構築する細胞が供給されるのか謎であった。そのメカニズム解明を目指した研究において、広範囲に壊死を伴うような病態では、末梢循環を介した骨髄由来間葉系幹細胞の供給が組織再生を促進することを見出した。末梢循環骨髄由来間葉系幹細胞は、動員された損傷組織において抗炎症作用を持つことや皮膚構成細胞へ分化することを明らかにした。その多様な機能、役割から末梢循環骨髄由来間葉系幹細胞集団には複数の機能的亜集団が存在するとの着想に至った。機能的亜集団はそれぞれ特有の遺伝子発現プログラムを有すると想像されることから、単一細胞網羅的遺伝子発現解析により、その亜集団を同定できると考えた。本研究では、単一細胞網羅的遺伝子発現解析により末梢循環骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞が組織再生を促進するメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、単一細胞網羅的遺伝子発現解析により末梢循環骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞が組織再生を促進するメカニズムを解明することを目指した。末梢循環骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞が多様な役割を担っていることから、複数の機能的亜集団が存在し協調的に組織再生を担っているとの着想を得た。その仮説を証明するために、単一細胞網羅的遺伝子発現解析により末梢循環骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞に存在する機能的亜集団を遺伝子発現情報により網羅的に同定することに取り組んだ。具体的には以下の二つのサブテーマを達成することを目指した。まず、組織損傷や HMGB1 ペプチド投与による組織再生誘導時に末梢血中に増加する骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞集団中に存在する機能的亜集団の網羅的同定を試みた。さらに多様な役割を担う骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞の動員された損傷組織内における分化系譜の網羅的同定にも取り組んだ。具体的には、PDGFR -GFP ノックインマウス (P KI) を用いた単一細胞網羅的遺伝子発現解析と、得られたデータをもとにしたバイオインフォマティクス解析を行った。また表皮水疱症モデルマウスを用いて、損傷修復時に末梢循環に動員される間葉系幹細胞の性状解析を行った。さらに PDGFR プロモーター下流に Cre 遺伝子 (P -Cre)、Cre タンパク誘導性に赤色蛍光を発する tdTomato 遺伝子 (floxed-stop-tdTomato、tdTomato 遺伝子先頭にストップコドン) を有し、Cre 非存在下では tdTomato 蛍光を発しない遺伝子) をもったマウス (P -Cre:tdTomato) を用いて損傷組織に動員された骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞がどのような細胞系譜に分化し組織再生を促進しているか解析した。

4. 研究成果

まず PDGFR 陽性間葉系幹細胞を解析するためのシングルセル RNA-seq の手法について最適化を行った。FACS による Sorting の条件や mRNA 増幅の条件を検討することで、PDGFR 陽性間葉系幹細胞を解析のためのシングルセル RNA-seq 解析プロトコルを確立した。特に mRNA 増幅法に関しては、全くのオリジナルの手法の開発に成功した。その後骨髄内 PDGFR 陽性間葉系幹細胞

胞と末梢循環骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞についてシングルセル RNA-seq 解析を行った。PDGFR 陽性間葉系幹細胞を標的としたシングルセル RNA-seq データは、一般的なシングルセル RNA-seq データよりも、検出できる遺伝子数やトランスクリプト数が少ないことが分かった。それらの特徴を勘案し、得られたデータを用いて信頼性の高い解析を実施するために各種パラメータの最適化を行った。その結果、解析した PDGFR 陽性間葉系幹細胞が複数の機能的亜集団を含むことが明らかになった。各亜集団に特徴的に発現する遺伝子を詳細に解析したところ、これらの検出された亜集団は、それぞれ全く異なる機能を発揮しうる集団であることが推測された。本研究において取得した組織損傷に関わる細胞集団のシングルセル RNA-seq 解析データは、再生医療研究における研究資源として非常に有用であり、迅速な論文発表を目指している。

次に損傷組織に動員された PDGFR 陽性間葉系幹細胞が、組織再生を促進するメカニズムを解析した。PDGFR 陽性間葉系幹細胞は、組織再生に伴う分化の過程において PDGFR の発現を喪失しうるということが想定されたため、P⁺-Cre:tdTomato マウスを用いて細胞系譜解析を可能にした。表皮水疱症モデルマウス皮膚に集積する PDGFR 陽性間葉系幹細胞系譜細胞を網羅的に回収し、シングルセル RNA-seq 解析を行った。その結果、皮膚に動員された PDGFR 陽性間葉系幹細胞が高い分化能を有することが示唆された。これは末梢循環骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞による損傷組織再生メカニズムを明らかにする上で重要な知見となった。また骨髄内 PDGFR 陽性間葉系幹細胞と末梢循環骨髄由来 PDGFR 陽性間葉系幹細胞の異同についても詳細に解析した。各亜集団に発現する特徴的な遺伝子を解析することにより、骨髄内に存在する、どの PDGFR 陽性間葉系幹細胞が末梢循環に動員されうるか明らかにすることが出来た。

本研究計画で得られたこれらの成果は、複数の国際学会・国内学会において発表された。現在論文発表の準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okada Aiko, Shimbo Takashi, Endo Masayuki, Iwai Sayuri, Kitayama Tomomi, Ouchi Yuya, Yamamoto Ryoma, Takaki Eiichi, Yamazaki Sho, Nishida Mami, Wang Xin, Kikuchi Yasushi, Tomimatsu Takuji, Kaneda Yasufumi, Kimura Tadashi, Tamai Katsuto	4. 巻 pii: S0006-291X(19)
2. 論文標題 Transcriptionally distinct mesenchymal stem/stromal cells circulate in fetus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 30410-30413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.03.033	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takashi Shimbo, Sho Yamazaki, Tomomi Kitayama, Yuya Ouchi, Ryoma Yamamoto, Eiichi Takaki, Leena Bruckner- Tuderman, Jouni Uitto, Yasufumi Kaneda, Katsuto Tamai
2. 発表標題 Single cell RNA-seq and single cell ATAC-seq analyses during a treatment for dystrophic epidermolysis bullosa
3. 学会等名 Society for Investigative Dermatology 77th (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Shimbo, Sho Yamazaki, Tomomi Kitayama, Yuya Ouchi, Ryoma Yamamoto, Eiichi Takaki, Leena Bruckner- Tuderman, Jouni Uitto, Yasufumi Kaneda, Katsuto Tamai
2. 発表標題 TRANSCRIPTOME AND EPIGENOME ANALYSES FOR REGENERATED SKIN IN A RECESSIVE DYSTROPHIC EPIDERMOLYSIS BULLOSA MOUSE MODEL
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新保敬史、Ho Yen-Ting、北山智美、大内雄矢、Edward Wijaya、金田安史、玉井克人
2. 発表標題 網羅的単一細胞遺伝子発現解析が明らかにしたマウス潰瘍性大腸炎増悪メカニズム
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Shimbo, Sho Yamazaki, Tomomi Kitayama, Yuya Ouchi, Ryoma Yamamoto, Eiichi Takaki, Leena Bruckner- Tuderman, Jouni Uitto, Yasufumi Kaneda, Katsuto Tamai
2. 発表標題 Single cell transcriptome and epigenome analyses in a murine model of dystrophic epidermolysis bullosa
3. 学会等名 The 49th European Society for Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Shimbo, Sho Yamazaki, Tomomi Kitayama, Yuya Ouchi, Ryoma Yamamoto, Eiichi Takaki, Leena Bruckner-Tuderman, Jouni Uitto, Yasufumi Kaneda, Katsuto Tamai
2. 発表標題 Single cell RNA- and ATAC-seq analyses in a murine model of dystrophic epidermolysis bullosa
3. 学会等名 第44回日本研究皮膚科学会
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