

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18044

研究課題名(和文) IncRNAによるオリゴデンドロサイト分化の制御と再生医療への応用

研究課題名(英文) Long non-coding RNAs during differentiation of oligodendrocytes

研究代表者

井上 順治 (Inoue, Junji)

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：20814859

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)：本研究では髄鞘再生治療を実現できる移植用オリゴデンドロサイトへの分化を特異的に制御するロングノンコーディングRNA (lncRNA)を特定することを目指し、iPS細胞から効率的にオリゴデンドロサイトへ分化誘導する培養方法を確立した上で、シングルセルでの遺伝子発現解析を行った。その結果、同一培養ウェル内に遺伝子発現が異なる複数のクラスターが存在することを発見した。Dry解析によりクラスターはオリゴデンドロサイト分化時系列において異なる段階であることが判明し、さらにオリゴデンドロサイト前駆細胞とみられるクラスター内で特異的に発現する複数のlncRNAを特定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最新のシングルセル遺伝子発現解析技術を利用したことにより、細胞集団全体の平均状態ではなく、個々の細胞の発現を個別に解析できた。培養ウェル内に存在する分化状態が良いオリゴデンドロサイト前駆細胞のクラスターに注目し、このステージの前段階で特異的に発現、あるいは減少する遺伝子、つまりこのステージへの分化を特異的に制御しているlncRNAを含む発現遺伝子を発見することができた。今後は本研究で発見した遺伝子群の発現を分子生物学的手法により人為的に制御し、髄鞘再生治療に有用なオリゴデンドロサイトを効率的に得られる培養法を確立する予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to identify long non-coding RNAs which control the differentiation from iPS cells into oligodendrocytes. Single-cell RNA sequencing for cultured cells revealed that multiple cell clusters was contained in the same culture well. Furthermore, in silico analysis uncovered that several clusters can belong to the timeline of oligodendrocyte differentiation. We discover that a small number of long non-coding RNAs exist in a feasible cluster which similar to oligodendrocyte progenitor cells.

研究分野：解剖学

キーワード：髄鞘再生 オリゴデンドロサイト long non coding RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クラッペ病や異染性白質ジストロフィーの様な先天性脱髄疾患では、遺伝子異常によりオリゴデンドロサイトが傷害されて広範な脱髄を生じ、患者は知的障害および運動障害に苦しむ。根治療法は存在せず、最善の治療法として行われる骨髄移植でも数年程度の延命効果しか得られないため、遺伝子異常を持たないオリゴデンドロサイトの移植による髄鞘の再生が、根本的な治療法として期待される。

2. 研究の目的

オリゴデンドロサイトの移植による髄鞘再生治療を目指し、長鎖ノンコーディング RNA(long non-coding RNA; lncRNA)によるオリゴデンドロサイトの分化制御メカニズムを解明し、脱髄疾患の再生治療に利用できる機能的な移植用細胞を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)培養プロトコルのブラッシュアップ

近年報告されているプロトコル(Wang et al., 2012; Douvaras and Fossati, 2015)に従い iPS 細胞を神経幹細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞(oligodendrocyte progenitor cells; OPC)を経てオリゴデンドロサイトへと分化誘導した場合、同一培養ウェル内にオリゴデンドロサイト以外に分化した細胞が多数存在した。そこで既存のプロトコルの分化因子の濃度や種類を変更すること、また新たなグロースファクターを追加し、既存の培養プロトコルをベースに改良を加えた。

(2)iOPC の分化度合いの評価

髄鞘再生を目的とした細胞移植治療では、分化が完了したオリゴデンドロサイトよりも、その前駆細胞であり、遊走能と増殖能を有する OPC を移植する方が望ましい。そこで改良した培養プロトコルで分化誘導を行った OPC(induced oligodendrocyte progenitor cells; iOPC)に対し、OPC の特異的マーカーの発現を免疫組織化学法やリアルタイム定量 PCR(qPCR)で確認した。また同時に、ドロップアッセイや培養ウェルのタイムラプス撮影で iOPC の遊走能を評価した。

(3)シングルセル遺伝子発現解析

OPC 特異的マーカーの発現が顕著に確認された分化段階の iOPC に対し、シングルセル RNA 発現解析(single cell RNA sequencing: scRNA-seq)を行い、シークエンスの結果は Cell Ranger パイプラインを用いて 1 次解析した。

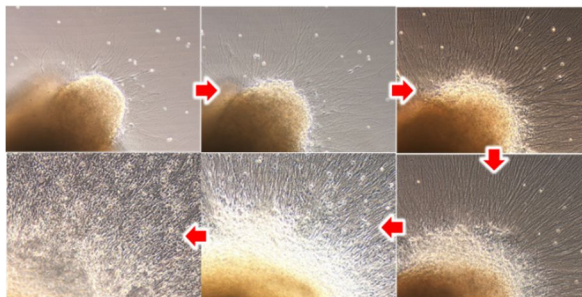
(4)オリゴデンドロサイト分化を特異的に制御する lncRNA 群を特定

1 次解析の結果を Seurat パイプラインに乗せて 2 次解析し、セルマトリックス化したシングルセルの発現データに対し以下の処理を行った。①発現パターンによるクラスタリングを行い、UMAP を用いて可視化した。②個々のクラスターに特異的に発現する遺伝子群を特定し、HeatMap を用いて列挙した。③クラスターの分化時系列での位置を特定するために velocity で処理した。

4. 研究成果

(1)培養プロトコルのブラッシュアップ

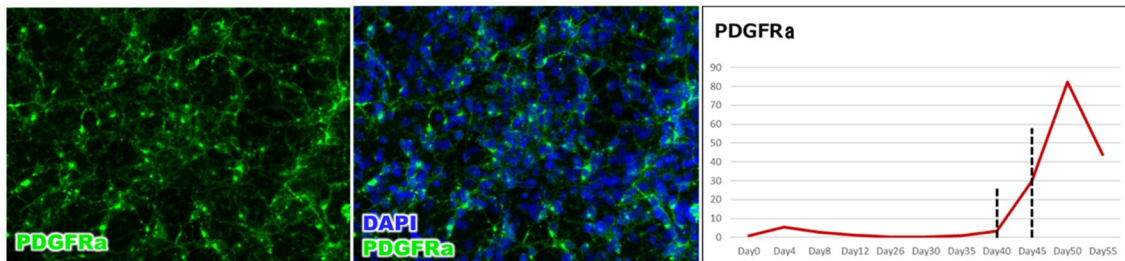
本研究室で保有する iPS 細胞に対し、既存のプロトコルに従ってオリゴデンドロサイトへと分化誘導した場合、腹側化が過剰に働くため、底板細胞への分化が顕著であったこと、また遮光が必要な分化因子の効果が不均一であったことが原因で、目的とするオリゴデンドロサイトでない細胞への分化が増加していたことが分かった。そのため、分化因子の濃度の見直しや、遮光を必要としない代替試薬を使用することにより、安定してオリゴデンドロサイトへの分化が可能となった。分化誘導中の細胞は凝集塊を形成し、分化が進むにつれ iOPC が凝集塊から遊出することが確認できた(図 1)。



(図 1)オリゴデンドロサイトへの分化誘導

(2)オリゴデンドロサイトの分化度合いの評価

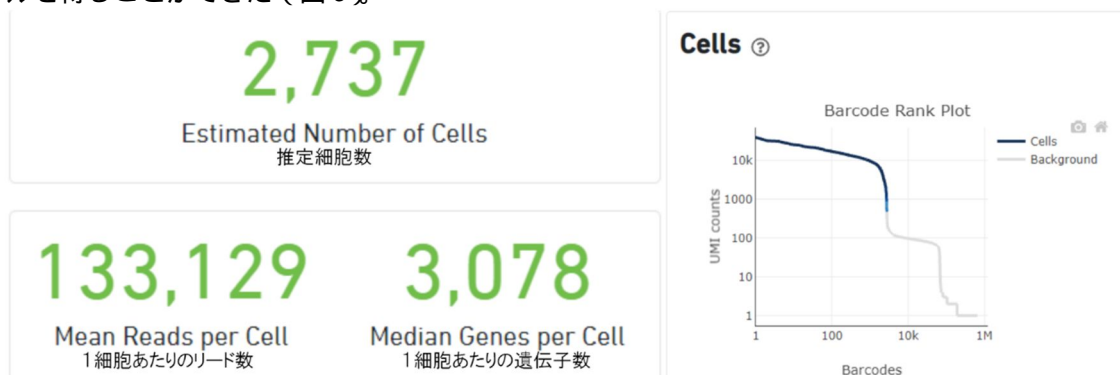
iOPC がオリゴデンドロサイトへの分化時系列上であることを確認するために、OPC 特異的マーカーの発現を免疫組織化学法やリアルタイム PCR で確認した結果、遊出した細胞で血小板由来増殖因子 受容体 (PDGFRa) をはじめとする OPC 特異的マーカーを発現していることが判明した (図 2)。これらの結果から、iOPC は OPC と同じ、あるいは非常に近い発現パターンを有していることが分かった。さらに iOPC の OPC 特異的マーカー発現が最も高かったタイミングでは、遊走能が最も顕著であることがわかった。



(図 2) iOPC に対する免疫組織化学法とリアルタイム PCR

(3)シングルセル遺伝子発現解析

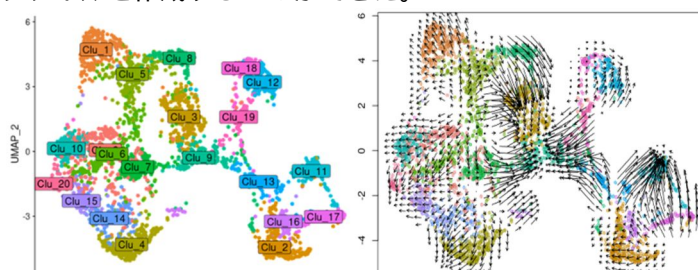
OPC 特異的マーカー発現が最も高い細胞への分化を制御する遺伝子群を特定するために、図 2 の点線間の細胞を採取し、scRNA-seq を行った。Cell Ranger による 1 次解析の結果、細胞として認められたドロップの数は 2737 個、ドロップあたり平均 3078 種類の遺伝子の発現プロファイルを得ることができた (図 3)。



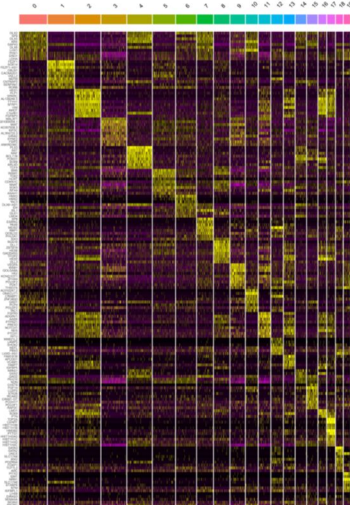
(図 3) Cell Ranger による 1 次解析の結果

(4)オリゴデンドロサイト分化を特異的に制御する lncRNA 群を特定

Seurat による 2 次解析により、同ウェル由来の全細胞は 21 個のクラスターに分けることができた (図 4)。これらのクラスターは発現の特異性解析により、異なる発現パターンを有していることが分かった。個々のクラスターの特異的マーカーを抽出 (図 5) することで、一部の細胞は OPC 特異的マーカーを発現していることが判明した。また、スライシング度合いによる発現遺伝子の velocity を解析した結果、OPC 特異的マーカーを発現するクラスターに分化が向かっている細胞群と分化先となる細胞群を特定することができた。これらの細胞群を分化時系列順に並べた上で、それぞれの細胞で発現が増加、あるいは減少している lncRNA をピックアップすることで、分化時系列で発現が変動し、OPC への分化を制御している可能性のある lncRNA のプロファイルを作成することができた。



(図 4) 発現遺伝子に基づくクラスタリングと velocity 解析



(図 5) クラスターのマーカー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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