

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02962

研究課題名(和文) 包括的1細胞オミックス解析を用いた創傷治癒関連細胞の多様性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Single cell analysis of cell diversity during skin wound healing

研究代表者

田中 克弥 (TANAKA, Katsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・研究協力員

研究者番号：70722750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚創傷治癒過程は、炎症期・増殖期・成熟期で構成される生体反応である。近年、microRNA 機能は、創傷治癒・瘢痕化・感染防御に重要な役割をになっていることを明らかにした。一方、微小環境における様々で且つ、個々の細胞が瘢痕化の起点として作用していることが示唆された。しかしながら、皮膚創傷治癒研究に資する組織位置情報を具備したシングルセル解析法は、未だ確立されていない。本研究では空間的トランスクリプトーム解析の確立・機能解析を行った。そして、瘢痕形成関連遺伝子を同定した。本研究成果は、新たな細胞間相互作用及び細胞分化系譜の詳細な分子機序解明に繋がると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、炎症反応を基軸とした組織修復過程の全容を解明するため、創傷治癒研究に資する空間的トランスクリプトーム解析法の確立をめざした。そして、新規瘢痕形成関連遺伝子を同定した。本研究成果によって、シングルセル解析の問題点であった「採取した細胞の位置情報の欠落」を克服することができた。今後は、本研究成果を発展させて、未病状態における病態発症リスクを予想することができる技術開発にも取り組みたいと考えている。そして、治療法開発だけでなく真の予防法の確立に繋がるように研究を進めて、健康長寿社会の実現に寄与する。

研究成果の概要(英文)：The skin wound healing process consists of an inflammatory phase, a proliferative phase, and a maturation phase. In recent years, functions of microRNAs have been shown to play important roles in wound healing, scarring, and in the response to infection. Various cell types are involved in the initiation of scarring; however, analysis of skin wound healing at the single cell level has not been reported. In this study, we established spatial transcriptome analysis and performed functional analysis. We then identified inflammation-related genes. We believe that the results of this research will lead to the elucidation of the molecular mechanisms that underlie new cell-cell interactions and cell differentiation during skin wound healing.

研究分野：形成外科学

キーワード：再生医学 発生 発現制御 病理学 組織 細胞 分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 創部再生に関与する細胞は多彩且つ、時空間的に制御されている。故に、創部における個々の細胞 (1 細胞、シングルセル) の個性を機能的・分子的に解明し、三次元的な再生過程を予測・制御技術を開発しなければ、病態の発症を未然に防ぐ対策や新規治療法の創出は難しい。

(2) これまで私達は、生体・生細胞イメージングを用いて 1 細胞機能を解明してきた。遺伝子発現については 1 組織 (組織細胞塊、バルク) を用いて包括的遺伝子発現解析を行い、創傷部位における細胞間または、分子間ネットワークを明らかにしてきた。しかしこれまでの既存技術だけでは、炎症増悪や瘢痕の病態化の起点となる少数派 (微小環境) における細胞集団の解析は難しい。従って、これら現象を解析可能とする技術や理論の構築が、次なる課題として浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚創傷治癒過程における、1 細胞局在ならびに遺伝子発現制御機構の分子相関性の解明である。そして、組織学的には形態変化を示さないが、遺伝子発現において病態的变化を呈する細胞の個性を明白にし、皮膚創傷治癒過程及び瘢痕化の分子メカニズムを詳細に明らかにする。具体的には以下である。

- (1) 組織位置情報を具備したシングルセル解析に関する解析基盤の構築。
- (2) 微小環境における細胞間相互作用の機能解析。
- (3) 新規炎症並びに瘢痕関連遺伝子の同定。

3. 研究の方法

(1) 皮膚創傷治癒モデルマウス

マウス皮膚創傷モデルは、深麻酔後、背部をバリカンで除毛し、直径 4 mm の生検トレパンを用いて、皮膚打ち抜き損傷を施して作製する。作製されたマウスの皮膚創傷治癒過程は、炎症細胞浸潤を主体とする「炎症期」(受傷後 1~3 日)、肉芽組織が構築される「増殖期」(受傷後 3~7 日)、過剰に生産された細胞外基質が分解される「成熟期」(受傷後 7~14 日) に分類され、治癒後には瘢痕 (受傷後 14 日以降) が認められる。

(2) 皮膚全創試料を用いたシングルセル解析

mRNA にランダムにバーコードを付す技術を用いてシングルセル解析を行う。具体的な方法は下記である。

- ① コラゲナーゼ等の酵素を用いて皮膚創部組織をシングルセル化する。
- ② 磁気ビーズ抗体 (Miltenyi Biotec) を用いて皮膚創部由来の種々の細胞 (マクロファージ等) を分離する。
- ③ C1 (Fluidigm) を用いてシングルセル単離及び次世代シーケンス (NGS) 用 cDNA ライブラリー作製を行い、ライブラリー品質を検証する。
- ④ NGS (Illumina) を用いた包括的トランスクリプトーム解析を行う。

(3) 空間的トランスクリプトーム解析

Visium (10x Genomics) は、組織における遺伝子発現解析の位置情報を取得できる空間的トランスクリプトーム解析法である。そこで本研究では Visium を用いて機能解析を行い、組織内位置情報を具備した微小環境における包括的遺伝子発現解析を行う。具体的な方法は下記である。

- ① イソペンタンで急速凍結・組織固定した皮膚サンプルを OCT コンパウンドを用いて包埋する。
- ② 薄切切片 (10 μm) を作製し、RNA 結合プローブが搭載された特殊スライドガラス上に載せる。
- ③ HE 染色後、NGS 用 cDNA ライブラリー作製を行うために、酵素類を用いて組織を最適化する。
- ④ 位置情報が付与された NGS 用 cDNA ライブラリーを作製し、NGS (Illumina) を用いて包括的トランスクリプトーム解析を行う。
- ⑤ NGS 解析より得た遺伝子発現情報を HE 染色像に重ね、特定遺伝子の発現量と場所を確定し、バイオインフォマティクス解析を行う。

(4) 定量 PCR (qPCR)

皮膚創部 (直径 6 mm) を液体窒素で急速冷凍した後、TissueLyser II (Qiagen) を用いて粉砕する。その後、RNA を抽出し (Qiagen)、cDNA 合成 (Thermo Fisher) を行う。合成した cDNA を鋳型として QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher) を用いて qPCR を行う。

4. 研究成果

(1) シングルセル解析

皮膚創部におけるマクロファージは、生体防御、線維芽細胞の活性化など多様な役割を担っている。一般的にそのサブタイプは、M1 マクロファージ（炎症性マクロファージ）もしくは M2 マクロファージ（抗炎症性マクロファージ）に分類されている。皮膚創部では、他の性質を有するマクロファージも存在すると考えられているが、未だ詳細なサブタイプの同定には至っていない。そこで、受傷後 3 日目に存在するマクロファージの多様性を解明するため、シングルセル解析を試みた。

まず、皮膚組織から F4/80 ポジティブマクロファージの精製を行い、生細胞の存在を検証した。その結果、十分な数の生きたマクロファージを確認することができた。

次に C1 を用いてシングルセル解析用 cDNA ライブラリー作製を試みた。まず、解析用プレートに精製したマクロファージを流入し、生死判定用試薬を用いて細胞状態の確認を、蛍光顕微鏡を用いて行った。その結果、解析用プレート内でも生細胞を確認することができた。

最後に、C1 を用いて cDNA ライブラリー作製に着手した。その結果、十分な品質を保った cDNA ライブラリーを作製することができなかった。その理由としては、C1 準備中もしくは作動中に細胞死が起きているもしくは、RNA 抽出が不十分であることが推察された。今後は、細胞死を防ぐために固定細胞を用いたシングルセル解析を行う等、手法の改良が必要と考えている。

(2) 空間的トランスクリプトーム解析

皮膚創部サンプル（1、3、7、14 日）を用いて一連の Visium 解析を行った。その結果、各サンプルにおけるクラスター数及び各クラスターにおいて有意に発現上昇している遺伝子数について下記の結果を得た。

1 日（遺伝子数）	3 日（遺伝子数）	7 日（遺伝子数）	14 日（遺伝子数）
クラスター1 (0)	クラスター1 (10)	クラスター1 (374)	クラスター1 (110)
クラスター2 (128)	クラスター2 (10)	クラスター2 (80)	クラスター2 (118)
クラスター3 (23)		クラスター3 (178)	クラスター3 (237)
		クラスター4 (8)	クラスター4 (10)
			クラスター5 (100)

受傷後 3 日目の Visium 解析については再度検証する必要がある。その他のサンプルについては、現在のところ、問題なく情報解析を行えると考えている。

一方、炎症が惹起しない PU.1 KO マウス由来皮膚創部サンプルを用いて NGS 解析を行い、炎症及び癒痕関連遺伝子の網羅的同定を行った。その結果、1,057 種類の候補遺伝子を抽出に成功した。

7 日目に発現する遺伝子群は、癒痕形成に関連している可能性が高い。そこで、Visium 解析で同定した遺伝子群と PU.1 KO マウス解析で同定した炎症・癒痕関連遺伝子群を照合した。その結果、新規炎症依存的癒痕関連遺伝子として遺伝子 A を同定した（図 1）。さらに、皮膚創傷治癒過程における遺伝子 A の発現動態解析を qPCR を用いて解析を行った。その結果、正常皮膚と比較して受傷後 7 日目以降、有意に発現上昇していた（図 2）。

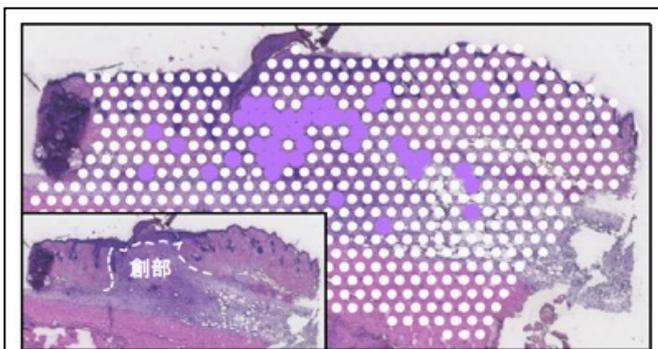


図 1 Visium を用いた遺伝子 A 発現解析
受傷後 7 日目の創部に 遺伝子 A 高発現スポット（紫色）を多数認めた。左下図は HE 像である。

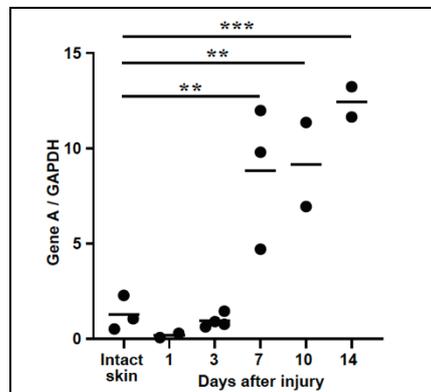


図 2 qPCR を用いた遺伝子 A の発現解析

(3) まとめ

Visium は規定領域 (55 $\mu\text{m}^2/\text{spot}$) における遺伝子発現を解析するため、シングルセルレベルにおける遺伝子発現を見落とす場合がある。一般的なシングルセル解析は、Visium では同定できなかった僅かしか存在しない細胞の遺伝子発現を検出できるメリットがある。今後はシングルセル解析結果と Visium 解析結果を統合して、組織位置情報・細胞間相互作用を考慮して、詳細な分子メカニズムを解明する。

今回新たに見出された癒痕形成関与すると推察される遺伝子 A については発現細胞を同定し、さらに遺伝子改変マウスを作製して研究を進捗させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wang Z, Komatsu T, Ohata Y, Watanabe Y, Yuan Y, Yoshii Y, Park S, Mori R, Satou M, Kondo Y, Shimokawa I, Chiba T	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of rikkunshito supplementation on mice: analysis of oxidative stress resistance and lifespan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Geriatrics and Gerontology International	6. 最初と最後の頁 238-247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ggi.13848	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 森亮一, 下川功	4. 巻 272
2. 論文標題 老化の分子シグナル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 619-624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Mori Ryoichi, Tanaka Katsuya, Shimokawa Isao	4. 巻 60
2. 論文標題 Identification and functional analysis of inflammation-related miRNAs in skin wound repair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 306 ~ 315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12542	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 de Kerckhove M, Tanaka K, Umehara T, Okamoto M, Kanematsu S, Hayashi H, Yano H, Nishiura S, Tooyama S, Matsubayashi Y, Komatsu T, Park S, Okada Y, Takahashi R, Kawano Y, Hanawa T, Iwasaki K, Nozaki T, Torigoe H, Ikematsu K, Suzuki Y, Tanaka K, Martin P, Shimokawa I, Mori R	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeting miR 223 in neutrophils enhances the clearance of Staphylococcus aureus in infected wounds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 e9024 ~ e9024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/emmm.201809024	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 Umehara Takahiro, Mori Ryoichi, Mace Kimberly A., Murase Takehiko, Abe Yuki, Yamamoto Takuma, Ikematsu Kazuya	4. 巻 68
2. 論文標題 Identification of Specific miRNAs in Neutrophils of Type 2 Diabetic Mice: Overexpression of miRNA-129-2-3p Accelerates Diabetic Wound Healing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 617 ~ 630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db18-0313	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 該当する

1. 著者名 森 亮一, 田中 克弥, 野崎 中成, 下川 功	4. 巻 69
2. 論文標題 miR-142はsmall GTPaseを介した好中球細胞骨格制御による黄色ブドウ球菌感染創の改善に必須である	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 46-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 森 亮一, 朴 盛俊, 下川 功	4. 巻 3
2. 論文標題 栄養と加齢—基礎研究より—	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 栄養	6. 最初と最後の頁 233-237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 森 亮一
2. 発表標題 皮膚創傷治癒における miRNA 機能と核酸医薬への応用
3. 学会等名 第50回日本創傷治癒学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 亮一、林 洋子、下川 功
2. 発表標題 miR-142欠損マウスの肝臓における代謝及びミトコンドリア形態変化の機能解析
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 亮一、小松 利光、朴 盛俊、林 洋子、下川 功
2. 発表標題 組織特異的 miR-142 ノックアウトマウスを用いた生命恒常性維持機構の解明
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryoichi Mori
2. 発表標題 Inflammation-related microRNAs regulate neutrophilic functions at S. aureus-infected skin wound sites
3. 学会等名 The 3rd Joint Symposium between Nagasaki University and Wurzburg University (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 亮一
2. 発表標題 皮膚創傷治癒における炎症関連 miRNA の同定及び miR-223 の機能解析
3. 学会等名 長崎障害者支援再生医療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森亮一, 朴盛俊, 林洋子, 下川功
2. 発表標題 寿命及び代謝制御における炎症関連 miR-142 ファミリーの機能解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mori R, Tanaka K
2. 発表標題 Attenuation of age-related fatty liver pathogenesis in miR-142-deficient mice
3. 学会等名 Gordon Research Conferences-Tissue Repair & Regeneration (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 亮一、野崎 中成
2. 発表標題 miRNA-223 発現抑制は Interleukin-6 分泌促進を介し黄色ブドウ球菌感染創を改善する
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 亮一、林 洋子、下川 功
2. 発表標題 Role of C/EBP β -miR-223-Interleukin-6 secretion pathway at Staphylococcus aureus-infected wound sites
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 亮一
2. 発表標題 好中球由来 miR-223 の発現抑制は皮膚感染創における黄色ブドウ球菌排除を促進する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 亮一、野崎 中成
2. 発表標題 miR-223 発現抑制は皮膚創傷部位の感染予防に効果的である
3. 学会等名 第8回臨床ゲノム医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori R, Tanaka K
2. 発表標題 Comprehensive identification of wound healing and inflammation miRNAs reveals a key role for miR-223 in neutrophilic clearance of S.aureus at wound sites
3. 学会等名 EMBL Symposia The Complex Life of RNA (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究 分担 者	森 亮一 (MORI Ryoichi) (30509310)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	

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		
英国	University of Bristol	King ' s College London	