

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20628

研究課題名（和文）RNAスイッチを用いた老化造血幹細胞の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of aged hematopoietic stem cells with miRNA switches

研究代表者

小野 紘貴（Ono, Hiroki）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：50966075

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、造血幹細胞（HSC）の老化に関連するmicroRNA（miRNA）についての研究を行った。まず若齢マウスおよび老齢マウスからHSCを採取し、次世代シーケンサーを用いたmiRNAの網羅的発現解析から、若齢・老齢マウスHSC間で差次的発現を示すmiRNAを同定した。次にmiRNAスイッチと呼ばれるmiRNAの活性を可視化するレポーター系を用いて、若齢・老齢マウスHSCにおけるmiRNA活性の不均一性の可視化と比較を試みた。その結果、若齢・老齢マウスHSC間で活性に顕著な差を示し、miRNA陽性・陰性細胞の割合が変動するmiRNAを複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでHSCの老化に伴うmiRNAの変化については不明点が多かった。本研究では、miRNAが細胞種や細胞の状態の指標となることに着目し、老化とともに変動するmiRNAによって定義されるHSC亜分画の性質を理解することを目指した。

あらゆる血液細胞の源であるHSCの移植は、疾患等により破綻した造血系・免疫系を再構築できることから、種々の血液疾患に対する治療法として確立されている。本研究の成果は、miRNAを操作することで、老化により低下したHSCの機能を回復させたり、miRNAを指標として老化HSC集団の中から比較的高い機能の細胞を選別したりする技術への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated microRNAs (miRNAs) associated with hematopoietic stem cell (HSC) aging. First, we collected HSCs from young and aged mice, and identified miRNAs differentially expressed between young and aged mouse HSCs through comprehensive expression analysis of miRNAs using a next-generation sequencer. Next, we attempted to visualize and compare the heterogeneity of miRNA activity in young and aged mouse HSCs using miRNA-responsive synthetic mRNAs, miRNA switches. As a result, we found several miRNAs that showed differences in expression level and activity between young and aged mouse HSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 老化 miRNA 合成生物学 翻訳制御

## 1. 研究開始当初の背景

老化とは、時間の経過に伴って個体の生理機能が徐々に衰退する生命現象である。近年、個体・臓器の老化の根底には「幹細胞の老化」があることが明らかになりつつある。

造血幹細胞 (HSC) は、自己複製しながらあらゆる成熟血液細胞へバランスよく分化することで、個体の造血機能・免疫機能を支えている。HSC は、加齢とともに細胞数の増加や造血機能の低下、骨髄球系に偏った分化傾向を呈するなど、質的・量的に変化する。HSC は、自己複製能や分化指向性の異なる「亜分画」からなる不均一な細胞集団であるが、老化個体では若齢個体には見られない亜分画が出現するなど、加齢とともに HSC は機能的不均一さを増すことが知られている。こうした老化 HSC を構成する亜分画の研究は、HSC の老化メカニズムを解明する上で重要なテーマであるが、未解明な点が多い。

microRNA (miRNA) とは、遺伝子発現の転写後制御を担う短い非翻訳 RNA であり、HSC において自己複製や分化を制御している。miRNA は細胞種ごとに特徴的な発現パターンを示すことから、近年細胞種を同定するためのマーカーとして利用できることが明らかになってきた。我々はこれまでに、HSC における miRNA の機能の理解を目指して、次世代シーケンサーによる miRNA の網羅的な発現解析手法である Small RNA-seq 法を用いて、若齢マウス由来 HSC 及び造血前駆細胞における miRNA 発現プロファイルを取得してきた。また、生細胞における miRNA の活性 (miRNA による翻訳抑制の程度) を可視化するレポーター系「miRNA スイッチ」を用いることで、若齢マウス HSC において種々の miRNA の活性が不均一であり、miRNA 活性陽性分画と陰性分画のように「miRNA の活性を指標にして分類した HSC の亜分画」を定義できることを見出した。さらに、こうした miRNA 活性にもとづいて定義した亜分画は機能的に異なることを発見した。こうした背景から、「miRNA の活性という視点から、老化に伴って変化する HSC の亜分画をどのように捉えることができるか?」という学術的問いを持った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、網羅的な発現解析から HSC の老化に伴って変化する miRNA を同定し、そのような miRNA の活性に着目して老化 HSC の亜分画の機能を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 移植実験による、培養後の若齢 HSC と老化 HSC の機能の比較

まず、miRNA の発現解析に必要な細胞数を準備するために、2-3 ヶ月齢の若齢マウスおよび 18 ヶ月齢以上の老齢マウスから HSC (CD34<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup>) を採取し、ポリビニルアルコールを用いた培養法 (Wilkinson *et al.*, Nature 2019) により 2 週間増幅した。その後、培養後の若齢 HSC と老化 HSC の機能を比較するために、放射線照射により骨髄破壊した宿主マウス (CD45.1 マウス) に培養した HSC (CD45.2 マウスに由来) を移植した。この時、ドナーの HSC とは区別可能な表現型を持つ骨髄細胞 (CD45.1/45.2 マウス由来) を同時に移植した。移植の 4、8、12、16 週間後に宿主マウスから採血し、全末梢血細胞のうち、ドナー HSC に由来する末梢血細胞の割合をフローサイトメトリーにより定量した。また、ドナー HSC に由来する T 細胞、B 細胞、骨髄球の割合を定量した。

### (2) Small RNA-seq による miRNA の発現解析

続いて、HSC の老化に伴って変化する miRNA を同定するために、Small RNA-seq 法による miRNA の網羅的な発現解析を実施した。まず、蛍光活性化セルソーターを用いて、培養した細胞の中から、HSC を多く含むと考えられる分画(1): EPCR<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup>および造血前駆細胞を多く含むと考えられる分画(2): EPCR<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup>と分画(3): Sca-1<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup>の 3 分画を分取した。そして、分取した細胞から RNA を抽出し、Small RNA-seq 法による miRNA の発現解析を行った。その結果、若齢 HSC と老化 HSC の間で差次的発現を示す miRNA を同定した。

### (3) 若齢・老化 HSC における、miRNA スイッチによる miRNA 活性の可視化と比較

次に、若齢・老化 HSC 間で差次的発現を示す miRNA の活性を測定するために、レポーターとして緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードし、5'-UTR に miRNA 標的配列を挿入した mRNA (miRNA スイッチ) を作製した。そして、作製した miRNA スイッチを、エレクトロポレーション法を用いて若齢および老化 HSC に導入した。トランスフェクションコントロールとして、青色蛍光タンパク質 (BFP) をコードする mRNA も同時に導入した。導入の翌日にフローサイトメトリーを用いて GFP および BFP の蛍光強度を測定した。miRNA は主に翻訳の抑制に関与する因子であるため、miRNA の活性が高いほど緑色蛍光タンパク質の翻訳が抑制されると予想される。一方で、BFP mRNA は miRNA の標的配列を持たないため恒常的に発現すると予想される。細胞間の mRNA 導入効率のばらつきを補正するために、GFP の蛍光強度を BFP の蛍光強度で除した値 (相対 GFP 強度) を算出し、若齢 HSC と老化 HSC 間における miRNA 活性の比

較に用いた。また、miRNA スイッチを導入した細胞集団において、miRNA の活性が均一であるとは限らず、緑色蛍光タンパク質の翻訳が抑制される miRNA 陽性細胞や、翻訳が抑制されない陰性細胞が混在している可能性が考えられた。そこで、miRNA スイッチにより可視化される miRNA 陽性細胞と陰性細胞を定義するために、miRNA スイッチと同時に miRNA 阻害剤を導入することで、miRNA 陽性細胞と陰性細胞を分けるゲートを設定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 移植実験による、培養後の若齢 HSC と老化 HSC の機能の比較

骨髓破壊的前処置を施した宿主マウスへ、若齢 HSC または老化 HSC を移植することにより、その機能を比較した。骨髓中から回収したばかりの培養していない新鮮な老化 HSC は、若齢 HSC に比べ、骨髓再構築能力の低下や骨髓球へ偏った分化傾向を示すことが報告されていたが、ポリビニルアルコールを用いて培養した細胞においても同様に、若齢 HSC に比べて老化 HSC は、末梢血中のドナーキメリズム（全末梢血細胞のうち、ドナー由来の細胞の割合）の低下や骨髓球の割合の増加が見られた。この結果から、培養後においても骨髓再構築能力の低下や骨髓球への分化偏向といった老化 HSC の性質は維持されていると考えられた。

##### (2) Small RNA-seq による miRNA の発現解析

Small RNA-seq 法による網羅的な miRNA 発現解析の結果、若齢 HSC (EPCR<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup>) に比べ、老化 HSC では 17 種類の miRNA の発現量が増加しており、7 種類の miRNA の発現量が減少していることが明らかになった。

##### (3) 若齢・老化 HSC における、miRNA スイッチによる miRNA 活性の可視化と比較

Small RNA-seq 解析による同定された miRNA の内、比較的発現量の高かった 13 種類の miRNA に着目し、miRNA スイッチを用いて活性を測定した。その結果、若齢・老化 HSC 間で let-7 ファミリー、miR-21a-5p、miR-140-5p、miR-155-5p、miR-223-3p といった miRNA の活性に差が見られた。let-7 ファミリー、miR-21a-5p、miR-140-5p、miR-155-5p の活性は、若齢 HSC に比べ、老化 HSC において高くなっていた。一方で、miR-223-3p の活性は、若齢 HSC に比べ、老化 HSC において低くなっていた。

これらの miRNA の中でも miR-140-5p は、主に軟骨組織で発現することが知られている miRNA であるが、HSC や血液細胞における機能は不明であり、HSC の老化との関連も未知であった。若齢・老化 HSC における miR-140-5p 陽性細胞と陰性細胞の割合を定量するために、miRNA スイッチと miR-140-5p 阻害剤を共導入したところ、若齢 HSC では miR-140-5p 陽性細胞の割合が 50%程度であったのに対し、老化 HSC では 80%程度の細胞が miR-140-5p 陽性であった。

若齢・老化 HSC 集団内の miR-140-5p 陽性・陰性細胞の機能や性質に違いがあるのか、miR-140-5p がどのような機能を有するのか、その他の miRNA の活性で定義される亜分画の性質については未解明であるため、今後も研究を進めていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Hiroki Ono, Satoshi Yamazaki, Hirohide Saito
2 . 発表標題 Dissecting the heterogeneity of ex vivo expanded mouse hematopoietic stem cells with miRNA switches
3 . 学会等名 ISSCR 2023 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Chen Jung, Hiroki Ono, Hirohide Saito
2 . 発表標題 Comprehensive miRNA Expression Profiling in Young and Aged Hematopoietic Stem Cells
3 . 学会等名 第24回 日本RNA学会年会
4 . 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 造血幹細胞の選別方法、造血幹細胞集団の製造方法、及び造血幹細胞の選別キット	発明者 小野紘貴、齊藤博英	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-083310	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------