

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11283

研究課題名(和文) 多能性幹細胞の細胞外small RNAに関する基礎的研究

研究課題名(英文) Study on characteristics of small RNA secreted from the pluripotent stem cells

研究代表者

野崎 中成 (NOZAKI, Tadashige)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90281683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：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)の細胞内情報伝達への関与については多くの知見があるが、細胞間情報伝達における役割は解明されていない。Parp1欠損型(Parp1^{-/-}) ES細胞株を用い、細胞外に遊離されるエクソソーム中のsmall RNAを網羅的に解析した。Parp1は、エクソソームmicroRNAを介して細胞間コミュニケーションに関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：While the functions of Parp1 in intracellular signaling have been extensively studied, its roles in intercellular signaling remain to be established. In the present study, we used the Parp1^{-/-} embryonic stem (ES) cell line, 210-58 established from the wild-type (Parp1^{+/+}) ES cell line, J1. To examine whether Parp1 has roles in differentiation, cell growth, cell death, and other physiological processes by regulating intercellular communications, we compared the properties of microRNAs in exosomes derived from Parp1^{-/-} and Parp1^{+/+} ES cells. Parp1 deficiency in ES cells led to inhibition of cell-cell communication, possibly by intercellular signal transduction, suggesting that Parp1 functions extracellularly by regulating exosomal microRNAs.

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

翻訳後修飾であるポリ ADP-リボシル化を担うポリ (ADP - リボース) 合成酵素、ファミリー 1 (Parp1) の細胞内情報伝達への関与については多くの知見があるが、細胞間情報伝達への関与および役割については解明されていない。研究代表者らは、Parp1 のエクソン 1 領域のジーンターゲティングによりノックアウトマウスを世界で最初に作製し、また、野生型 (*Parp1^{+/+}*) ES 細胞株から *Parp1* の両側アレルを破壊した欠損型 (*Parp1^{-/-}*) ES 細胞株を樹立した。

microRNA (miRNA) など機能性 small RNA は、様々な細胞プロセスに関わっている。中でも幹細胞から遊離するエクソソームに含まれる miRNA は、微小環境において幹細胞と周囲の細胞とのコミュニケーションの役割を担う。例えば、幹細胞が産生する因子が、活性酸素により傷害を受けた細胞に働くことで、心筋や脳の虚血再灌流傷害からの回復を促進する (Stem Cell Res, 2013, Stem Cells, 2013)。細胞外 miRNA は、生体の広範にわたって供給されるが、その機能については未だ不明な点が多い。その機能を解明することにより、機能性 small RNA を用いた核酸医薬の開発 (miRNA 創薬) につながる可能性がある。機能性 small RNA の細胞外機能を解明する基礎的研究は、次世代医薬創出に向けた社会的ニーズがあり、発展性のある研究として期待される。

2. 研究の目的

多能性幹細胞から遊離する細胞外 small RNA の機能を解析して再生医療への応用を目指す。多能性幹細胞が他の細胞と small RNA を介してどのようにコミュニケーションを図っているか、多能性幹細胞から遊離する細胞外 small RNA を介する細胞間コミュニケーションへの Parp1 の関与を分子レベルで明らかにする。機能性 small RNA の中でも、多能性幹細胞から遊離して細胞外で機能する miRNA に着目して研究を行う。野生型 (*Parp1^{+/+}*) ES 細胞株と独自に作製した両側アレルを破壊した *Parp1* 欠損型 (*Parp1^{-/-}*) ES 細胞株を用い、ES 細胞から遊離されるエクソソームに含まれる miRNA を網羅的に解析する。細胞外 miRNA 機能へ Parp1 がどのように関与するかを調べ、miRNA 創薬の一翼を担う基盤的研究を行う。

3. 研究の方法

多能性幹細胞は、細胞外へエクソソーム miRNA を遊離し、微小環境の細胞へ機能するが、その過程で Parp1 の細胞間情報伝達を介して何らかの役割を担うという仮説を検証した。

<多能性幹細胞から遊離する細胞外 miRNA の解析>

(1) 細胞培養

野生型 ES 細胞株 (*Parp1^{+/+}*)、クローン名 J1 からヘテロ欠損 ES 細胞株 (*Parp1^{+/-}*)、クローン名 210 を樹立し、210 からホモ欠損 ES 細胞株 (*Parp1^{-/-}*)、クローン名 210-58 を樹立し、各細胞株を保有している。各細胞はフィーダーフリーのゼラチンコート培養皿上で、LIF 存在下で培養した。

(2) エクソソームの単離

細胞培養上清は 4、2,000 x g、30 分間遠心し、上清をポアサイズ 0.22 μ m のフィルターで前処理を行った。Total Exosome Isolation Reagent を用いて、エクソソームを単離した。

(3) small RNA の検出

単離したエクソソームから、トータル RNA を精製した。TruSeq Small RNA Library Preparation Kit を用いて、ライブラリーを構築した。シーケンシングライブラリーの調整のため、1 本鎖 RNA を対象に、5'、3' 両末端に特異的なアダプター (アダプター配列 + イルミナのシーケンスに必要な配列を持つプライマー) を付加し、アダプターを特異的に認識するプライマーを用いて PCR 増幅を行った。アダプターダイマー等の短い断片を除去するため、磁気ビーズによる精製を行った。イルミナ社の次世代シーケンシングプラットフォーム (HiSeq 1500) を用いて、次世代シーケンス解析を行った。得られた 50bp のシングルエンドリードに対して、マウスのレファレンスゲノムへのアライメントを行い、miRNAs, snRNAs, snoRNAs, tRNAs を含む small RNA の分類を行った。

<バイオインフォマティクスによる miRNA 候補の同定>

(4) ターゲット遺伝子の予測解析

TargetScan と microRNA.org の 2 つのデータベースを用いて有意に変動するターゲット遺伝子の予測解析を行った。hypergeometric distribution (超幾何分布) を用いて、有意に変動する予測ターゲット遺伝子を抽出した。

(5) Gene ontology enrichment 解析と pathway 解析

予測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、StrandNGS ver. 2.6 software を用いて、Gene Ontology (遺伝子の生物学的プロセス、細胞の構成要素および分子機能に着目して、遺伝子に付けられるアノテーション) enrichment 解析を行った。MAPPFinder software を用いて、Pathway 解析を行った。生物学的経路を視覚化するため、ConPath Navigator を用いて、経路をマップに表示した。

(6) miRNA の発現解析

TaqMan advanced miRNA assays を用いて、変動した miRNA の発現を定量した。Parp1 欠損により発現が有意に2倍以上、上昇または下降する miRNA を抽出した。210-58 と J1 における発現は、比較 Ct 法 ($\Delta\Delta Ct$ method) による相対定量を行った。

(7) ターゲット遺伝子 mRNA の発現解析

ES 細胞から QIAshredder と RNeasy Mini Kit を用いて、トータル RNA を抽出、精製した。トータル RNA をテンプレートとして、SuperScript VIL0 Master Mix を用いて、First-strand cDNAs を合成した。特異的 PCR プライマー は designed using a Perfect Real Time Support System により設計、合成した。Power SYBR Green PCR Master Mix を用いて、標的細胞におけるターゲット遺伝子 mRNA の発現を定量した。

4. 研究成果

(1) エクソソーム small RNA の構成比

次世代シーケンス解析の結果、J1(*Parp1*^{+/+})および210-58(*Parp1*^{-/-}) ES 細胞株のエクソソームより得られた 50bp のシングルエンドリード数は、各々、18,680,288 と 11,169,213 であった。miRNAs, snRNAs, snoRNAs, tRNAs, exonic RNAs, intronic RNAs を含む small RNA の構成比を調べた。miRNA の割合は、各々、8.2% (J1)と 3.5% (210-58) であった (図1)。

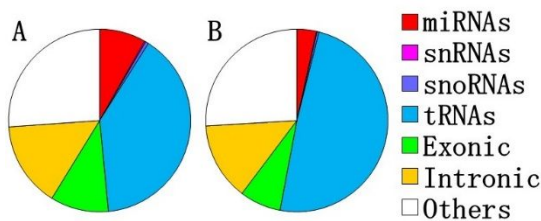


図1 エクソソームの small RNA の構成比 (A)J1(*Parp1*^{+/+})、(B)210-58(*Parp1*^{-/-})

(2) エクソソーム miRNA のプロファイリングとターゲット遺伝子予測

次世代シーケンス解析から得られたリード配列情報を基に、miRNA のプロファイルを行うため、リードのトリミング、リファレンスゲノムへのアライメントを行った。リードをカウント後、定量化を行い、Parp1 遺伝子型により有意に発現変動している miRNA を、Parp1 欠損による発現の上昇群と下降群に分けて抽出した。Parp1 欠損による上昇群は 118 個、下降群は 211 個であった。2つのデータベースを用いて有意に変動するターゲット遺伝子の予測解析を行った結果、発現の上昇している miRNA に対して 810 個、発現の下降している miRNA に対して 716 個のターゲット遺伝子を候補として抽出した。

(3) Parp1 欠損により有意に変動するシグナル伝達経路

予測ターゲット遺伝子に共通する生物学的経路をマップに表示してデータを視覚化した。Pathway 解析の結果、miRNA 発現の上昇群において、MAPK signaling pathway を含む5つの pathway を有意に抽出した ($p < 0.05$)。一方、miRNA 発現の下降群においては、有意な pathway は検出されなかった。Parp1 欠損による有意に変動するターゲット遺伝子には、MAPK signaling pathway 上に存在する *Elk1*, *Map4k3*, *Map4k4*, *Mapk8* が含まれていた。これらの予測ターゲット遺伝子は、複数の miRNAs (*miR146a-5p*, *miR365-3p*, *miR98-5p*, *miR196b-5p*, *let-7a-5p*, *miR203-3p*, *let-7f-5p*, *let-7i-5p*, *miR200c-3p*, *miR200a-3p*, *let-7d-5p*, *let-7c-5p*, *miR212-3p*) によって、制御される可能性が示唆された (表1)。

表1 miRNA 発現の変動 (210-58 vs J1)

| miRNA | Fold change |
|-------------------|-------------|
| <i>miR146a-5p</i> | 7.5 |
| <i>miR365-3p</i> | 7.5 |
| <i>miR98-5p</i> | 6.4 |
| <i>miR196b-5p</i> | 6.0 |
| <i>let-7a-5p</i> | 3.7 |
| <i>miR203-3p</i> | 3.4 |
| <i>let-7f-5p</i> | 3.2 |
| <i>let-7i-5p</i> | 2.8 |
| <i>miR200c-3p</i> | 2.7 |
| <i>miR200a-3p</i> | 2.6 |
| <i>let-7d-5p</i> | 2.4 |
| <i>let-7c-5p</i> | 2.1 |
| <i>miR212-3p</i> | 2.1 |

(4) 予測ターゲット遺伝子に対する Gene Ontology enrichment 解析

予測ターゲット遺伝子の生物学的機能を見出すため、Gene Ontology による enrichment 解析を行った。*Elk1*, *Map4k3*, *Map4k4*, *Mapk8* には、9個の GO term ($p < 0.05$) が存在した (表2)。

表2 予測ターゲット遺伝子の GO term

| GO term | p-value |
|--|---------|
| regulation of transcription, DNA-templated | 0.004 |
| response to cadmium ion | 0.005 |
| phosphorylation | 0.014 |
| transcription, DNA-templated | 0.015 |
| regulation of JNK cascade | 0.015 |
| positive regulation of cell migration | 0.019 |
| response to stress | 0.029 |
| ossification | 0.036 |
| response to UV | 0.049 |

GO enrichment 解析の結果、miRNA の機能のある程度推測できるため、その機能への

Parp1 の関与を評価した。データベース (<http://amigo.geneontology.org/amigo>) の Inferred Tree View を用いて、GO term の関連性を樹状図で表示すると、9 個の GO term の上流には、regulation of JNK cascade (GO:004632)、phosphorylation(GO:0016310)、response to stress(GO:0006950)、protein serine/threonine kinase activity(GO:0004674)、cell communication(GO:0007154)が存在した。増殖やストレスに関連した細胞内シグナル伝達と細胞間コミュニケーションに関する生物学的機能への Parp1 の関与が示唆された。miRNA の発現が上昇している pathway では、pathway 上のターゲット遺伝子が負に制御されることが予測され、Parp1 欠損によりこれらの機能が抑制される可能性が示唆された。

(5) miRNA の発現レベルの検証

miRNA の発現解析の結果、Parp1 欠損により *miR365-3p*、*let-7a-5p*、*miR196b-5p*、*miR203-3p*、*miR98-5p*、*miR146a-5p* の発現が有意に 2 倍以上増加していた。一方、*200a-3p*、*let-7c-5p*、*miR200c-3p* の発現は 2 倍以上の増加は確認されなかった (図 2)。

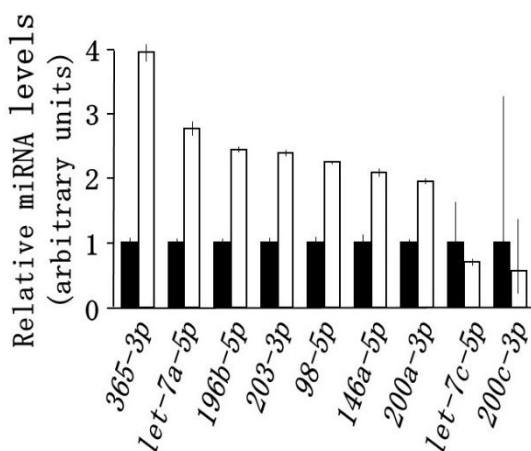


図 2 miRNA の発現解析

黒 ; J1 (*Parp1*^{+/+})、白 ; 210-58 (*Parp1*^{-/-}) 由来エクソソーム miRNA の相対的発現量を示す。サンプル間の補正は、*miR320-3p* をリファレンスとして用いた。5 ~ 6 個の technical replicon に対する平均値 ± 標準誤差を示す。

(6) ターゲット遺伝子の発現解析

Parp1 欠損による有意に変動するターゲット遺伝子には、MAPK signaling pathway 上に存在する *Elk1*、*Map4k3*、*Map4k4*、*Mapk8* が含まれていた。miRNA の発現が上昇している pathway 上にあるこれらターゲット遺伝子は標的細胞である ES 細胞において、負に制御される可能性があるため、ES 細胞において、ターゲット遺伝子 mRNA の発現を定量し、評価した。エクソソーム miRNA が送り込まれる標的細胞である ES 細胞において *Elk1*、*Map4k3*、*Map4k4*、*Mapk8* mRNA の発現レベルは、

Parp1 欠損により、各々、0.66、0.71、0.59、0.87 倍に減少していた。(図 3)。

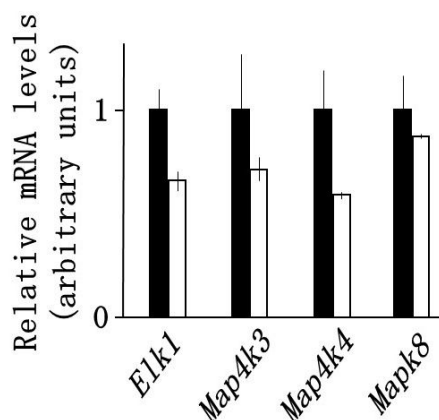


図 3 ターゲット遺伝子 mRNA の発現解析

黒 ; J1 (*Parp1*^{+/+})、白 ; 210-58 (*Parp1*^{-/-}) 由来 mRNA の相対的発現量を示す。サンプル間の補正は、*Gapdh* をリファレンスとして用いた。4 個の technical replicon に対する平均値 ± 標準誤差を示す。

210-58 (*Parp1*^{-/-}) から遊離したエクソソームに包埋された miRNA が、標的細胞へ送り込まれたときの、生物学的機能の 1 つとして cell communication (GO:0007154) が明らかにされた。GO:0007154 の下流の term として cell-cell signaling (GO:0007267)、signal transduction (GO:0007165) が位置していた。Parp1 の細胞外機能として、エクソソーム miRNA を介した細胞間コミュニケーションに参与することができ、Parp1 が欠損するとこれらの機能が抑制されることが示唆された。

Parp1 や翻訳後修飾であるポリ ADP-リボシル化は、細胞内情報伝達へ関与することが報告されている。本研究は、Parp1 が細胞内情報伝達だけでなく、エクソソーム 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担う可能性を示した。Parp1 が関与する細胞間コミュニケーションに細胞外で介在するエクソソーム miRNA を具体的に同定した。同定したエクソソーム miRNA が、標的細胞の機能を実際にコントロールできるかを今後確認する研究が必要である。阻害薬が臨床応用されるなど、Parp1 やポリ ADP-リボシル化の制御が様々な疾患の治療に試されているため、本研究により示された Parp1 のエクソソーム miRNA を介した細胞外機能のダイナミクスをさらに探求していくことで、miRNA 創薬につながる可能性が示唆された。本研究で得られた成果は、国際学会において発表し、学術誌に報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Nozaki T, Sasaki Y, Fukuda I, Isumi M, Nakamoto K, Onodera T, Masutani M. Next-generation sequencing-based miRNA expression analysis in *Parp1*-deficient embryonic stem cell-derived exosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 2018; 499: 410-415.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.073

Osada T, Nozaki T, Masutani M. *Parp1* deficiency confers defects in chromatin surveillance and remodeling during reprogramming by nuclear transfer. *Curr Protein Pept Sci* 査読有 2016; 17 (7): 693-704.
DOI:10.2174/1389203717666160419144502

[学会発表](計4件)

Nozaki T, Masutani M, Ohura K. NGS-based analysis of exosomes from *Parp1*-deficient ES cells. FDI's Annual World Dental Congress. 2017.9.1 Madrid, Spain.

野崎中成, 益谷美都子, 大浦 清. Profiling of small RNAs in exosomes secreted from *Parp1* knockout embryonic stem cells. 第90回日本薬理学会年会 2017.3.15 長崎市.

野崎中成, 益谷美都子, 大浦 清. ES細胞由来エクソソーム miRNA を介したシグナル伝達における *Parp1* の関与. 第16回日本再生医療学会総会 2017.3.8 仙台市

Nozaki T, Fujimori H, Masutani M, Ohura K. Comprehensive miRNA expression analysis in exosomes derived from *Parp1*-deficient embryonic stem cells using next-generation sequencing. th 7th EMBO meeting. 2016.9.12. Mannheim, Germany

6. 研究組織

(1)研究代表者

野崎 中成 (NOZAKI, Tadashige)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 90281683

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

益谷 美都子 (MASUTANI, Mitsuko)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・フロンティア生命科学分野・教授

研究者番号: 60238904

(4)研究協力者
なし