

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11531

研究課題名(和文) 仮骨延長術におけるエピジェネティック修飾による骨再生促進法の確立

研究課題名(英文) Epigenetics of osteogenesis related genes in adipocyte for cell transplantaion in distraction osteogenesis

研究代表者

三川 信之 (Mitsukawa, Nobuyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40595196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織からは比重の違いを利用して2種類の細胞が採取できる。1つは浮遊層から分離される天井培養由来前駆脂肪細胞であり、もう1つは沈殿層から分離される脂肪組織由来幹細胞である。天井培養由来前駆脂肪細胞は長期継代後も高い骨分化ポテンシャルを維持していた。この違いを保持するメカニズムとしてCpGメチル化、ヒストン修飾H3K4me3の状態が天井培養由来前駆脂肪細胞は脂肪組織由来幹細胞と比べて骨分化関連遺伝子群が発現しやすい状態にあることを次世代シーケンサー(NGS)によって明らかにした。また、NGSによる多次元データを機械学習で次元削減し2種類の細胞群が異なるクラスターを形成す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

頭蓋顔面変形症に対して我々が世界に先駆けて行ってきた仮骨延長法は多くの患者に福音をもたらしてきた。しかし、骨再生の元となる幹細胞群が不足し仮骨形成が得られない場合があることが問題だった。幹細胞群の補充のため、脂肪組織由来細胞は豊富に採取できることから有力視されている。脂肪組織由来細胞群は骨分化能を持つが、その詳細は不明だった。今回、我々は脂肪組織に含まれる2種類の細胞群の骨分化能の精密な測定、骨分化能を保持する根幹であるエピジェネティクスについて詳細な解析を行い知見を得た。エピジェネティクスへの介入により脂肪組織細胞を用いた骨形成促進への道を開く第一歩となった。

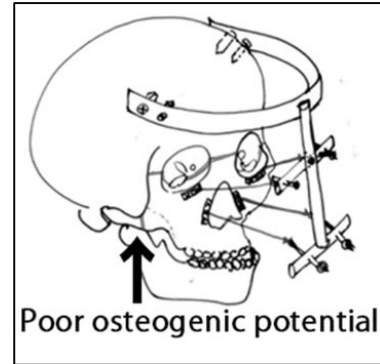
研究成果の概要(英文)：Two types of cell groups can be harvested from subcutaneous fat tissue using the differences in specific gravity. One is ceiling-culture derived preadipocytes from floating fraction, and the other is adipose-derived stem cells from stromal vascular fraction. Ceiling-culture derived preadipocytes showed higher osteogenic potential than adipose-derived stem cells even after seven weeks of culture. We measured the epigenetic status of both types of cells using next generation sequencer. We clarified that epigenetics of CpG methylation and H3K4me3 were in the status that osteogenesis related genes were more prone to be expressed in ceiling-culture derived preadipocytes than in adipose-derived stem cells. We performed the machine learning to visualize clustering of the two types of cells by dimensional reduction. T-distributed stochastic neighbor embedding was performed. Dimension-reduced visualization by machine learning showed clustering of two different types of cell groups.

研究分野：骨延長術

キーワード：骨延長術 エピジェネティクス 機械学習 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

頭蓋顎顔面変形症に対して、申請者らが世界に先駆けて行ってきた仮骨延長法は多くの患者に福音をもたらしてきた。仮骨延長法は細胞生物学的には0.5-1.0mm / 日程度の緩徐持続的な伸展刺激により、軟部組織を含む細胞増殖と細胞外基質産生による組織の再生統合が行われるという特徴を持つ。しかし、現在でも仮骨形成不全による長い保定期間と延長後の後戻りが問題で、仮骨形成を促進する方法が求められている。仮骨延長部における緩徐な伸展刺激による骨再生は、多種多様な細胞の増殖と分化が同時発展的に進行する複雑な過程である。骨新生が速やかに行われるため細胞増殖と分化、骨新生、血管新生などが調和して進行のに必要な細胞群が十分に供給されることが求められる。ところが、実際には癒痕化などで乏幹細胞状態にあり骨新生が遅延することも多い。



我々はこの問題に対し脂肪組織から採取される細胞の移植が解決の糸口になると考えている。なぜならば、分化の系統からみると骨と脂肪は極めて近接した細胞であり、共に間葉系細胞であり分化の最終段階で骨と脂肪に分かれるからである。また、脂肪組織は低侵襲に大量の細胞を分離できるため再生医療の細胞供給源として有望である。

脂肪組織からは2種類の細胞を採取可能である。1つはコラゲナーゼ処理の後の遠心分画から採取される脂肪組織由来幹細胞で、もう1つは浮遊分画から採取される天井培養由来前駆脂肪細胞である。天井培養脂肪細胞、脂肪組織由来幹細胞ともに骨分化能を持つことは以前から知られていたが、分化能の違いやその違いをもたらすメカニズムの詳細は不明だった。

2. 研究の目的

本研究の目的は皮下脂肪組織から分離される天井培養由来前駆脂肪細胞と脂肪組織由来幹細胞の骨分化能の違いを明らかにし、その基盤にあるメカニズムとしてのエピジェネティクスを明らかにする。

3. 研究の方法

代謝学的な異常がみられない標準体型 ($19 < \text{BMI} < 25$) の女性から、手術時に廃棄される腹部皮下組織を回収した。

(1) 脂肪組織由来幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞の継代後の骨分化ポテンシャルの検討

腹部皮下組織を細切してコラゲナーゼ処理の後遠心した。沈殿分画(stromal vascular fraction, SVF)を培養して底面に接着した細胞群を脂肪組織由来幹細胞(adipose-derived stem cells, ASCs)とした。遠心処理物の上層浮遊分画を Sugiharara らが報告した天井培養法によって培養し天井面に接着した細胞群を天井培養由来前駆脂肪細胞(ceiling culture-derived preadipocytes, ccdPAs)とした。両者を7週間培養の後、骨分化誘導培地で培養し、骨分化能を比較した。アリザリンレッド染色、骨分化関連遺伝子の mRNA 発現、蛋白発現量を測定した。

(2) 脂肪組織に存在する細胞の骨分化関連遺伝子のエピジェネティクス解析

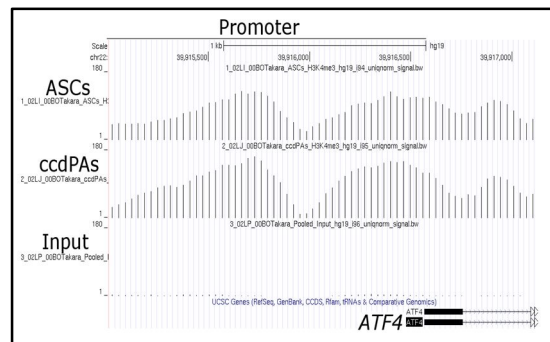
脂肪組織由来幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞を 7 週間継代培養の後、エピジェネティクス解析を行った。エピジェネティクス解析として次の 2 つを行った。1 つは CpG メチル化であり、450K 高解像度単一 CpG サイトレベル DNA メチル化アッセイを行った。もう一つはヒストン修飾であり、Histone 3 lysine 4 trimethylation (H3K4me3)のクロマチン免疫沈降次世代シーケンシング(ChIP-seq)を行った。

(3) 脂肪組織由来幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞の CpG メチル化 値に対する機械学習を用いたクラスタリング

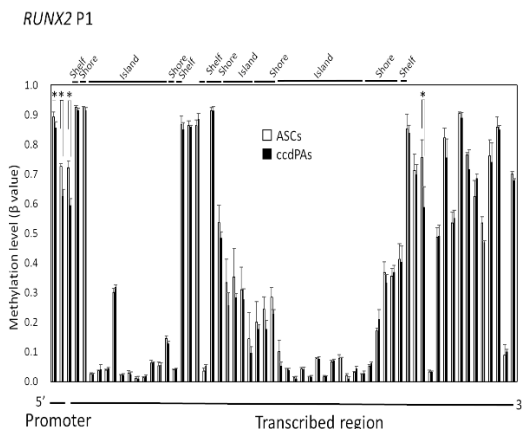
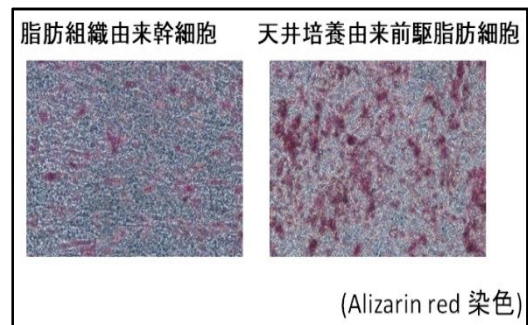
450K 高解像度単一 CpG サイトレベル DNA メチル化アッセイで得られた 値を用いて脂肪組織由来幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞のクラスター解析を行った。骨分化関連遺伝子 RUNX2, ATF4, SP7, BGLAP の CpG サイト 95 箇所を用いた。95 次元の array について、機械学習を用いた次元削減を t-distributed stochastic neighbor embedding(tSNE)法、Python ソフトウェア(version 3.8.1; Python Software Foundation, Wilmington, DE, U.S.A) および Python プラグインソフトウェア scikit-learn (version 0.22.2)で行い、可視化した。

4. 研究成果

(1) 天井培養由来前駆脂肪細胞は脂肪組織由来幹細胞と比較して 7 週間継代培養後もアリザリンレッド染色で濃染を示し高い骨分化能を保持していることがわかった。RUNX2, BGLAP など骨分化に特異的な遺伝子の mRNA、タンパク質も同様に天井培養由来前駆脂肪細胞は脂肪組織由来幹細胞と比べて高い発現を示した。

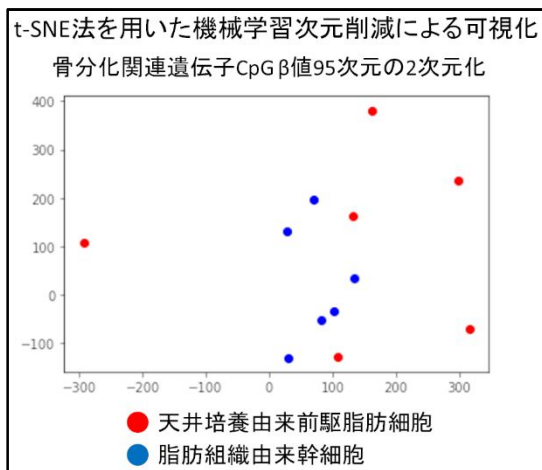


(2) 天井培養由来前駆脂肪細胞は脂肪組織由来幹細胞と比較して骨分化のマスターレギュレーターである RUNX2 遺伝子のプロモーター領域の CpG サイトのメチル化率は有意に低かった。すなわち、天井培養由来前駆脂肪細胞は脂肪組織由来幹細胞と比較して RUNX2 を発現しやすい状態にあると考えられた。



ヒストン修飾 H3K4me3 について骨分化関連の代表的な転写因子である ATF4 遺伝子について、天井培養由来前駆脂肪細胞は脂肪組織由来幹細胞と比較して修飾率が高値だった。すなわち、RUNX2, ATF4 などのエピジェネティクス状態が複合して天井培養由来前駆脂肪細胞の高い骨分化ポテンシャルを維持していると考えられた。

(3) 骨分化関連遺伝子の CpG 値アレイに対する機械学習 t-SNE 法を用いた次元削減で天井培養由来前駆脂肪細胞と脂肪組織由来幹細胞が異なるクラスターを示し、性質の異なる細胞群であることが可視化された。また、天井培養由来前駆脂肪細胞の方がクラスター分散が大きく、個体ごと、細胞群毎の骨分化方向への分化度の違いが大きい可能性が示唆された。



が明らかになった。

以上の(1), (2), (3)の結果から、

- ・天井培養由来前駆脂肪細胞は脂肪組織由来幹細胞と比べて、長期継代後も高い骨分化能を保持しており、CpG メチル化、H3K4me3 などのエピジェネティクス状態によるものと考えられた。

- ・機械学習を用いた CpG メチル化 値の機械学習を用いた次元削減による可視化により天井培養由来前駆脂肪細胞と脂肪組織由来幹細胞が異なるクラスターに属することが

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 Sasahara Yoshitaro, Kubota Yoshitaka, Kosaka Kentaro, Adachi Naoki, Yamaji Yoshihisa, Nagano Hidekazu, Akita Shinsuke, Kuroda Masayuki, Tanaka Tomoaki, Bujo Hideaki, Mitsukawa Nobuyuki	4. 巻 144
2. 論文標題 Adipose-Derived Stem Cells and Ceiling Culture-Derived Preadipocytes Cultured from Subcutaneous Fat Tissue Differ in Their Epigenetic Characteristics and Osteogenic Potential	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 644 ~ 655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PRS.00000000000005913	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
研究分担者	窪田 吉孝 (Kubota Yoshitaka) (10375735)	千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501)	
研究分担者	秋田 新介 (Akita Shinsuke) (00436403)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	