

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11541

研究課題名（和文）骨髄由来間葉系幹細胞のstemnessを評価する分化予知マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of predictive markers to analyze the differentiation potentials of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells

研究代表者

金輪 真佐美（福永真佐美）（KANAWA, MASAMI）

広島大学・自然科学研究支援開発センター・助教

研究者番号：00284208

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）の分化予知マーカーを同定した。分化誘導前のMSCに発現している遺伝子レベルと、分化誘導後の分化レベル（骨、軟骨、脂肪）との間の相関関係を分析した。次にMSCの分化の方向性や分化能の違いを検討するために相関係数が有意であった遺伝子について、細胞種間の遺伝子レベルの平均値の差を分析した。骨分化予知マーカーとして15個、脂肪分化マーカー遺伝子として11個、軟骨分化マーカーとして8個の遺伝子を選択した。これらの遺伝子は3方向、2方向に共通するものとユニークマーカーに分類することができた。これらの遺伝子によってMSCの分化能を分化誘導前に把握できるのではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究対象に用いたMSCは、癌化のリスクがiPS細胞より低いこと、ES細胞と比較して倫理面で利用しやすいこと、培養が容易であるなど多数の利点を有している。さらにMSCは骨、軟骨、脂肪などへの分化能を有しており、再生医療に既に応用されている。しかしMSCの分化能は株によって分化の方向性あり、分化レベルも一定ではない。そこで臨床応用を成功させるためには、MSCの分化能を予測することが必要である。しかし、分化能を予測する方法については不明な点が多く確立されていない。本研究で得られた結果は、MSCの分化能を事前に把握するための一手段として再生医療に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We identified differentiation-predicting marker genes for bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSCs). We analyzed the correlation between the gene levels of MSCs before and after induction of differentiation (osteogenic, chondrogenic, and adipogenic). MSCs can have different differentiation directions and potentials depending on the source; therefore, we confirmed the marker genes that reflect these differences among significantly correlated genes. We selected 15, 11, and 8 predictive markers for osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation, respectively. These genes were divided into three groups with different potentials: one lineage, two lineages with osteogenic and adipogenic or adipogenic and chondrogenic, and three lineages. Our results suggest that these genes will be useful in examining the differentiation potential of MSCs before induction.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 分化予知マーカー 骨分化 軟骨分化 脂肪分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 間葉系幹細胞 (MSC) は、多分化能を有しており再生医療への応用が期待されている。申請者は過去に多数の骨髄液より MSC を分離培養し、培養した細胞が MSC であることを確認するために骨、軟骨、脂肪の3方向への分化能を分析した。現在 MSC の分化能の証明方法には、分化誘導後に分化細胞を染色する方法がよく用いられている。しかし染色法は定性的な方法であるため、分化能の高低差を詳細に提示することが難しい。そこで申請者は3方向への分化能を定量的な方法によって分析した。結果、全ての分化能において、高低差があり一定ではないことが明らかとなった¹⁾。

(2) MSC の同定には現在のところ数種の表面抗原が用いられている。表面抗原の分析も定性的である。さらに表面抗原の分析は、MSC と形態が非常によく似ている線維芽細胞 (FB) と区別することが難しい。申請者は、MSC を同定するための手段に、表面抗原ではなく遺伝子を用いることができないか検討し、線維芽細胞と MSC とを区別する数種類の遺伝子マーカーを報告してきた²⁾。MSC が有する分化能の応用を目的として再生医療に利用する場合、細胞が有している分化能を分化誘導前の未分化な状態で正確に把握しておくことが重要であると考えられる。しかし、培養 MSC の分化能を分化誘導前に予測する手段は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

MSC は癌化のリスクが iPS 細胞より低いこと、ES 細胞と比較して倫理的な観点からも臨床応用するために、受け入れられ易いと考えられている幹細胞である。申請者は多数の骨髄液から MSC を分離培養し、MSC が有する3方向への分化能 (骨、軟骨、脂肪) を分析したところ全ての分化能において高低差があり一定ではなかった。さらに中には極低レベルの分化能しか示さない株があることも確認した。MSC を再生医療に用いる場合、臨床の用途に見合った分化能を事前にチェックすることが臨床応用を成功に導くために非常に重要であると考えられる。しかし現在のところ、分化誘導前に分化後の分化レベルを判断する方法については不明な点が多い。本研究は、骨髄液から分離培養した MSC に発現している多数の遺伝子の中から骨、軟骨、脂肪分化誘導後の分化レベルを反映している遺伝子を同定することである。

3. 研究の方法

(1) 分化誘導前の細胞の遺伝子定量

骨髄由来 MSC (10 ilium MSC、5 jaw MSC)、4 FB 合計 19 株の細胞を実験に供した。まず 19 株の細胞を通常培養し¹⁾ RNA を抽出した。予め用意されていた 95 個の候補遺伝子についてリアルタイム PCR によって mRNA レベルを定量した。なお 95 個の遺伝子は 2 回のマイクロアレイによって FB より MSC で高い発現レベルを示した遺伝子として選択していた²⁾。

(2) 細胞培養、分化誘導ならびに分化マーカーの測定¹⁾

軟骨分化

19 細胞について無血清培養によるペレット培養を行った。即ち、 2.5×10^5 細胞を 15 mL 遠心管に播種し 28 日間 37 °C で CO₂ インキュベーターにて培養した。分化マーカーとして glycosaminoglycan (GAG) を GAG assay kit を用いて定量した。含有 DNA は Pico Green dsDNA quantification kit を用いて定量し GAG 量は DNA 量によってノーマライズした。

脂肪分化

19 細胞に脂肪分化誘導を行った。即ち、24 ウエルプレートに細胞を播種しコンフレントに達した後、脂肪分化誘導培地にて脂肪分化を誘導した。分化マーカーには glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性を GPDH activity assay kit を用いて定量した。軟骨分化と同様に含有 DNA を測定し、GPDH 活性をノーマライズした。

骨分化

19 細胞に骨分化誘導を行った。即ち、24 ウエルプレートに細胞を播種しコンフレントに達した後、骨分化誘導培地にて培養した。分化マーカーには Alkaline phosphatase (ALP) activity を定量した。軟骨、脂肪分化と同様に含有 DNA で ALP 活性をノーマライズした。

(3) 統計解析

19 細胞の RNA を用いて測定した 95 遺伝子の mRNA レベルと同細胞を 3 方向 (骨、軟骨、脂肪) に分化誘導測定したそれぞれの分化マーカー間の相関係数 (ピアソン r) ならびに、細胞種間 (ilium MSC、jaw MSC、FB) の mRNA 発現レベルの平均値を Student t test、Mann-Whitney U test によって検定した。これらの検定は全て SPSS ver. 24 を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 分化誘導前の細胞に発現している 95 遺伝子の mRNA レベルと分化後の分化マーカー値分析に用いた 19 細胞の分化誘導前の 95 個の遺伝子についての mRNA レベルを表 1 に、また、同細胞の分化誘導後の 3 方向(軟骨、脂肪、骨)への分化マーカー値を図 1 に示す。軟骨と脂肪の分化マーカーにおいて jaw MSC のレベルは ilium MSC に比べて低いレベルであった。また FB は軟骨、脂肪に分化しなかった。骨分化マーカーにおいては、軟骨、脂肪で見られた ilium MSC と jaw MSC のような違いはなかった。一方、FB は低レベルではあるが ALP 活性を有していた。そこで、分化予知マーカーの選択方法として、未分化な細胞に発現している遺伝子レベルと分化後の分化マーカー値との相関係数を分析した後、軟骨と脂肪分化予知マーカーの選択においては分化誘導前の遺伝子発現レベルが ilium MSC > jaw MSC であるかどうかについて検討した。さらに骨分化予知マーカー遺伝子においては ilium MSC > FB, jaw MSC > FB の分析も付け加えた。分析結果を以下(表 2 ~ 4)に結果を示す。

Cell	MSC					iLium MSC					jaw MSC					FB				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
ACTB	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
ADAM10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM22	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM23	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM28	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM30	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM33	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM35	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM38	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM39	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM40	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM42	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM43	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM44	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM45	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM46	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM47	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM48	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM49	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM51	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM52	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM53	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM54	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM55	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM56	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM57	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM58	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM59	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM60	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM61	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM62	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM63	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM64	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM65	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM66	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM67	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM68	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM69	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM70	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM71	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM72	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM73	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM74	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM75	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM76	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM77	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM78	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM79	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM80	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM81	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM82	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM83	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM84	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM85	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM86	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM87	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM88	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM89	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM90	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM91	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM92	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM93	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM94	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ADAM95	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

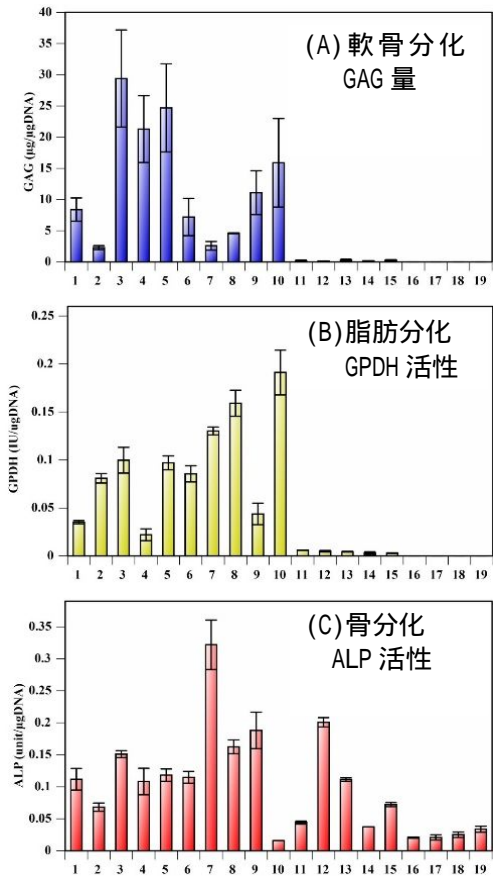


図 1 分化誘導後の 19 被検細胞の分化マーカー値。(1-10 ; ilium, 11-15 ; jaw, 16-19 ; FB)

表 1 分化誘導前における 19 被検細胞の 95 遺伝子発現レベル。

(2) 軟骨分化予知マーカー遺伝子の選択

軟骨分化誘導前の 95 個の遺伝子発現レベルと軟骨分化マーカーレベルとの間の相関関係を分析したところ 8 個の遺伝子が有意であった(表 2)。さらに 8 個の遺伝子について ilium MSC と jaw MSC のグループにおける平均値は全て ilium MSC で高く有意な差が認められた。従ってこれら 8 個の遺伝子を軟骨分化予知マーカーとして選択した。

Gene	Full name	GAG × gene expression levels 相関係数 (r)	Relative mRNA levels		(t-test)
			ilium	jaw	
<i>EFEMP1</i>	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1	0.637*	8.35 ± 2.09	2.5 ± 2.09 *	
<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor	0.603*	47.31 ± 6.87	12.92 ± 5.0 **	
<i>TGM2</i>	transglutaminase 2	0.603*	106.71 ± 27.47	10.61 ± 6.45 **	
<i>CDKN2D</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 2D	0.577*	62.76 ± 11.62	2.84 ± 0.46 **	
<i>AURKB</i>	aurora kinase B	0.570*	7.44 ± 1.70	2.41 ± 0.63 **	
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1	0.566*	4.42 ± 0.74	1.85 ± 0.22 **	
<i>CD74</i>	CD74 molecule	0.565*	153.26 ± 42.9	8.5 ± 3.49 **	
<i>ACLY</i>	ATP citrate lyase	0.531*	6.28 ± 0.74	1.51 ± 0.22 ***	

表 2 95 個の遺伝子の中で GAG 量と有意な相関関係にあった 8 遺伝子の相関係数と同遺伝子について、それぞれの細胞種での遺伝子発現レベルの平均値。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(3) 脂肪分化予知マーカー遺伝子の選択

脂肪分化誘導前の 95 個の遺伝子発現レベルと脂肪分化マーカーレベルとの間の相関関係を分析したところ、22 個の遺伝子が有意であった(表 3)。さらに 22 個の遺伝子について ilium MSC と jaw MSC のグループにおける平均値は全て ilium MSC で高く、有意な差が認められた。赤字で示した 11 個の遺伝子は ilium MSC と jaw MSC の平均値の差が 3 倍以上あった。3 倍以上差がある 11 個の遺伝子を脂肪分化予知マーカーとして選択した。

Gene	Full name	GPDH × gene expression levels 相関係数 (r)	Relative mRNA levels		(t-test)
			ilium	jaw	
<i>ITGA5</i>	integrin subunit alpha 5	0.826***	5.20 ± 0.58	1.40 ± 0.18 ***	
<i>MCAM</i>	melanoma cell adhesion molecule	0.812***	118.38 ± 25.90	8.81 ± 5.64 **	
<i>GPR37</i>	G protein-coupled receptor 37	0.782**	27.03 ± 5.17	6.25 ± 4.03 **	
<i>PSMC5</i>	proteasome 26S subunit, ATPase 5	0.769**	4.87 ± 0.76	2.46 ± 0.20 **	
<i>ACLY</i>	ATP citrate lyase	0.737**	6.28 ± 0.74	1.52 ± 0.22 ***	
<i>DNCL1</i>	dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1	0.732**	14.59 ± 1.97	3.23 ± 0.73 ***	
<i>P4HA2</i>	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2	0.720**	9.02 ± 1.90	2.09 ± 0.91 **	
<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor	0.708**	47.31 ± 6.87	12.92 ± 5.00 **	
<i>ZNF185</i>	zinc finger protein 185 with LIM domain	0.708**	7.39 ± 2.84	4.13 ± 0.26 **	
<i>CDKN2D</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	0.703**	62.76 ± 11.62	2.84 ± 0.46 **	
<i>DPYSL3</i>	dihydropyrimidinase like 3	0.664**	3.78 ± 0.45	2.79 ± 0.48 **	
<i>INPP5E</i>	inositol polyphosphate-5-phosphatase E	0.650**	5.51 ± 0.81	3.08 ± 0.74 **	
<i>UBE2C</i>	ubiquitin conjugating enzyme E2 C	0.612*	5.29 ± 1.11	2.46 ± 0.50 **	
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1	0.608*	4.42 ± 0.74	1.85 ± 0.22 **	
<i>CCNB1</i>	cyclin B1	0.598*	4.46 ± 0.94	2.64 ± 0.41 **	
<i>CD74</i>	CD74 molecule	0.561*	153.26 ± 42.93	8.50 ± 3.49 **	
<i>COL7A1</i>	collagen type VII alpha 1 chain	0.561*	5.78 ± 1.10	2.61 ± 0.60 **	
<i>AURKB</i>	aurora kinase B	0.556*	7.44 ± 1.70	2.41 ± 0.63 **	
<i>AMD1</i>	adenosylmethionine decarboxylase 1	0.545*	4.16 ± 0.56	3.41 ± 0.38 **	
<i>CDC20</i>	cell division cycle 20	0.526*	7.56 ± 1.51	3.73 ± 0.85 **	
<i>SLC2A1</i>	solute carrier family 2 member 1	0.526*	4.91 ± 0.58	1.30 ± 0.22 ***	
<i>MCM7</i>	minichromosome maintenance complex component 7	0.517*	5.03 ± 0.75	2.78 ± 0.29 **	

表 3 95 個の遺伝子の中で GPDH 活性と有意な相関関係にあった 22 遺伝子の相関係数と同遺伝子について、それぞれの細胞種での遺伝子発現レベルの平均値。

(赤字;3 倍以上の差を示した遺伝子) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(4) 骨分化予知マーカー遺伝子の選択

分化誘導前の 95 個の遺伝子発現レベルと骨分化マーカーレベルとの間の相関関係を分析したところ、17 個の遺伝子が有意であった(表 4)。分化誘導後の FB の ALP 活性は MSC に比べて低いレベルである(図 1. C) ので、遺伝子発現レベルにおいても MSC と FB との間で差があることが望ましい。そこで MSC と FB との間で差がなかった *P4HA2* と *PSMC5* をまず候補から外し、15 個の遺伝子を骨分化予知マーカー遺伝子として選択した。なお 15 個の遺伝子の発現パターンを MSC の種類によってさらに分類した。骨分化マーカーは軟骨や脂肪分化マーカーで認められた ilium MSC と jaw MSC のグループにおける違い(ilium MSC > jaw MSC)はなかった(図 1. C)。ゆえに 15 個の遺伝子中で、両グループ間での平均値に有意な差がない 6 遺伝子と jaw MSC でも高い発現を示した *SERPINI1* を残りの 8 個の遺伝子と区別した(表 4)。8 個の遺伝子は FB との比較において ilium MSC でのみで発現が高く、jaw MSC では発現が低かった。

Gene	Full name	ALP × gene expression levels 相関係数 (r)	Relative mRNA levels			Mann-Whitney U-test		
			ilium MSC	jaw MSC	FB	ilium vs. FB	ilium vs. jaw	ilium vs. FB
<i>MCAM</i>	melanoma cell adhesion molecule	0.889**	284.71 ± 69.92	23.23 ± 14.86	7.1±4.28	*	*	n.S.
<i>DNCL1</i>	dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1	0.824**	32.84 ± 4.92	7.58 ± 1.72	3.68±1.18	***	***	n.S.
<i>HGF</i>	hepatocyte growth factor	0.813**	142.18 ± 23.03	144.12 ± 27.40	28.93±12.56	***	n.S.	*
<i>HLA-DRA</i>	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	0.780**	13467 ± 4566.58	300.29 ± 154.92	7.43±2.95	**	**	n.S.
<i>HLA-DRB</i>	major histocompatibility complex, class II, DR beta	0.762**	121.46 ± 82.43	1 ± 0	1±0	*	**	n.S.
<i>SRGN</i>	serglycin	0.727**	103.68 ± 15.16	108 ± 58.60	1.43±0.25	***	n.S.	*
<i>SERPINI1</i>	serpin family E member 1	0.724**	41.34 ± 9.91	146.51 ± 23.22	4.52±2.90	*	*	*
<i>ACLY</i>	ATP citrate lyase	0.705**	6.19 ± 0.82	1.52 ± 0.22	1.96±0.25	***	***	n.S.
<i>P4HA2</i>	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2	0.669*	8.14 ± 1.96	2.01 ± 0.87	2.88±0.55	n.S.	*	n.S.
<i>ITGA5</i>	integrin subunit alpha5	0.648*	5.03 ± 0.62	1.4 ± 0.18	2.2±0.22	**	**	*
<i>TFPI2</i>	tissue factor pathway inhibitor 2	0.620*	21.49 ± 5.10	33.86 ± 18.55	2.82±1.41	*	n.S.	*
<i>KCTD12</i>	potassium channel tetramerization domain containing 12	0.617*	29.16 ± 4.43	28.45 ± 4.44	4.47±1.83	**	n.S.	*
<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor	0.614*	99.74 ± 15.58	29.06 ± 11.25	1.62±0.62	**	**	*
<i>PSMC5</i>	proteasome 26S Subunit, ATPase 5	0.589*	5.32 ± 0.87	2.92 ± 0.24	2.63±0.58	n.S.	n.S.	n.S.
<i>CD74</i>	CD74 molecule	0.585*	539.76 ± 166.0	29.45 ± 12.10	2.3±0.76	*	*	*
<i>TRIB2</i>	tribbles pseudokinase 2	0.579*	15.46 ± 1.76	15.89 ± 3.67	2.71±0.65	***	n.S.	*
<i>IGF1</i>	insulin like growth factor 1	0.560*	850.99 ± 215.9	1242 ± 262.7	1±0	*	n.S.	*

表4 95個の遺伝子の中でALP活性と有意な相関関係にあった17遺伝子の相関係数と同遺伝子について、それぞれの細胞種での遺伝子発現レベルの平均値(青字；ilium MSCとjaw MSCの比較においてjaw MSCの発現レベルがiliumと同等、或いは高いレベルを示した遺伝子、グレー；いずれの細胞種間でも有意差なし)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(5) 分化予知遺伝子マーカーのまとめ

95個の候補遺伝子の中から8個の軟骨分化予知遺伝子マーカー、11個の脂肪分化予知遺伝子マーカー、15個の骨分化予知遺伝子マーカーを便図にて分類した(図2)。1方向のみの分化を予知できるユニークマーカー、さらに骨、脂肪ならびに脂肪、軟骨の2方向の分化予知に関するマーカー、3方向全ての予知に参与するマーカーに分けることができた。これら合計23個の遺伝子のmRNAレベルを分化誘導前に分析すると、3方向への分化誘導後の分化の方向性や分化の高さを予測できるのではないかと考えられた。

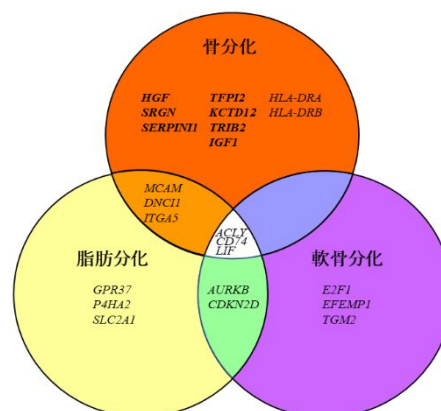


図2 骨、軟骨、脂肪分化予知マーカー遺伝子

<引用文献>

1) Kanawa M, Igarashi A, Ronald VS, Higashi Y, Kurihara H, Sugiyama M, Saskianti T, Pan H, Kato Y. Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells expanded with fibroblast growth factor-2. *Cytotherapy*. 2013 Sep;15(9):1062-72.

2) Igarashi A, Segoshi K, Sakai Y, Pan H, Kanawa M, Higashi Y, Sugiyama M, Nakamura K, Kurihara H, Yamaguchi S, Tsuji K, Kawamoto T, Kato Y. Selection of common markers for bone marrow stromal cells from various bones using real-time RT-PCR: effects of passage number and donor age. *Tissue Eng*. 2007 Oct;13(10):2405-17.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kanawa M, Igarashi A, Fujimoto K, Saskianti T, Nakashima A, Higashi Y, Kurihara H, Kato Y, Kawamoto T.	4. 巻 43
2. 論文標題 The Identification of Marker Genes for Predicting the Osteogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 current issues in molecular biology	6. 最初と最後の頁 2157-2166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb43030150	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 Masami Kanawa, Akira Igarashi, Katsumi Fujimoto, Veronica Sainik Ronald, Yukihito Higashi, Hidemi Kurihara, Yukio Kato, Takeshi Kawamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Potential Marker Genes for Predicting Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app9142942	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 Kanawa M, Igarashi A, Fujimoto K, Higashi Y, Kurihara H, Sugiyama M, Saskianti T, Kato Y, Kawamoto T	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetic Markers Can Predict Chondrogenic Differentiation Potential in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/9530932	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 Yoshida K, Nakashima A, Doi S, Ueno T, Okubo T, Kawano KI, Kanawa M, Kato Y, Higashi Y, Masaki T	4. 巻 7
2. 論文標題 Serum-Free Medium Enhances the Immunosuppressive and Antifibrotic Abilities of Mesenchymal Stem Cells Utilized in Experimental Renal Fibrosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE	6. 最初と最後の頁 893-905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.17-0284	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 Fujii S, Fujimoto K, Goto N, Abiko Y, Imaoka A, Shao J, Kitayama K, Kanawa M, Sosiawan A, Suardita K, Nishimura F, Kato Y	4. 巻 8(4)
2. 論文標題 Characterization of human dental pulp cells grown in chemically defined serum-free medium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 350 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2018.1066	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

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金輪真佐美, 五十嵐 晃, 藤本勝巳, Tania Saskianti, 中島 歩, 東 幸仁, 栗原英見, 加藤幸夫, 河本 健
2. 発表標題 間葉系幹細胞の骨分化能予知遺伝子マーカーの同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金輪真佐美, 五十嵐 晃, 藤本勝巳, Veronica Sainik Ronald, Tania Saskianti, 中島 歩, 東 幸仁, 栗原英見, 加藤幸夫, 河本 健
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の骨、軟骨、脂肪分化予知マーカー遺伝子の同定
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金輪 真佐美、五十嵐 晃、藤本 勝巳、東 幸仁、栗原 英見、加藤 幸夫、河本 健
2. 発表標題 骨髄由来MSCの脂肪分化予知遺伝子マーカーの同定
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金輪真佐美、五十嵐晃、藤本勝巳、東幸仁、栗原英見、杉山勝、加藤幸夫、河本健
2. 発表標題 3D解析による骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨分化予知遺伝子マーカーの研究
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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	藤本 勝巳 (FUJIMOTO KATSUMI) (40294566)	広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	平田 伊佐雄 (HIRATA ISAO) (40346507)	広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	河本 健 (KAWAMATO TAKESHI) (50224861)	広島大学・学術・社会連携室・特任教授 (15401)	

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		
インドネシア	Universitas Airlangga		