

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591753

研究課題名（和文） 間葉系細胞の骨・軟骨分化過程における DNA メチル化調節の解析

研究課題名（英文） Analysis of DNA methylation in the mesenchymal stem cells differentiating into bone and cartilage cells

研究代表者

江面 陽一（EZURA YOICHI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50333456

研究成果の概要：

様々な組織に存在して多分化能を示す間葉系幹細胞のうち、滑膜由来細胞は特に高い軟骨分化能を示す。このような由来組織に基づく間葉系幹細胞の性質の相違には、潜在的にエピジェネティックな相違の関与が推定されるが、間葉系幹細胞のゲノム DNA メチル化レベルについて、これまでは十分に検討されていなかった。我々は本学附属病院における膝関節手術により同意を得て採取された滑膜由来間葉系幹細胞を用いて、軟骨細胞への分化誘導をペレット培養法により行い、その前後におけるゲノム DNA のメチル化状態を検討するため、選別された候補遺伝子プロモーター領域についてメチル化候補領域の推定をおこない、それぞれについてバイサルファイトシーケンス法による解析を行った。その結果、骨・軟骨系細胞への分化制御を中心的に担う *RUNX2* および *OSX* 遺伝子や *SOX9* 遺伝子などのプロモーター配列中に存在する富 CpG 領域における低メチル化状態は、軟骨細胞への分化誘導を行っても明らかな変動を示さず安定的に維持されていた。また軟骨細胞への分化誘導過程において大きく発現増加する遺伝子群と、反対にほぼ完全に発現が抑制される遺伝子群におけるプロモーター領域について解析した結果、大半の遺伝子について分化誘導前後におけるメチル化状態は変動することなく安定していたが、唯一 *SDF1* 遺伝子の上流約 1 kb の領域については軟骨細胞分化後にメチル化レベルは減少して、遺伝子発現の抑制とは逆説的な変動を示すことが判明した。このようなメチル化レベルの相違は成人関節軟骨の層別の相違としても同定することができた。滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨細胞分化の過程においてゲノム DNA のメチル化変動は稀な現象であり、エピジェネティックな制御は比較的安定的であることが示されたが、稀なメチル化変動領域は候補遺伝子領域アプローチ法によっても同定可能であることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：間葉系幹細胞・DNAメチル化・エピジェネティクス・軟骨細胞分化

1. 研究開始当初の背景

骨・軟骨組織は、間葉系細胞から段階的な分化過程を経て形成される軟骨細胞および骨芽細胞系の細胞群を主な構成要素として構築される。骨系細胞の分化を調節する機構として、段階的な細胞分化過程の進行を特徴付ける特異的発現様式を示すマーカー遺伝子の同定から、それらの遺伝子発現を決定付ける転写因子、ランクス2 (*RUNX2*)、オステリクス (*OSX*)、ソックス9 (*SOX9*)などの同定・解析によって解明されてきた。一方、初期胚発生における細胞分化制御に際して、クロマチン構成蛋白やゲノムDNAの修飾を介したエピジェネティックな分子機構が遺伝子発現制御に重要な役割を果たすことが知られているが、そのような調節は骨・軟骨組織を含めた様々な器官形成における細胞分化に際しても利用されることが、特に重要と認識されるようになった(文献1, 2)。

骨・軟骨細胞の分化形成においては、間葉系幹細胞とよばれる多分化能をもった細胞が、何段階にもわたる分化レベルをたどりながら、他細胞系譜への移行もしくは逆行することのできない独自の分化状態を獲得し、最終的に分化を遂げた成熟細胞となってゆくと考えられている。このような細胞分化における方向性をもたらす系譜間移行の可逆性・非可逆性について調節する分子機構については、未だ詳細には明らかにされていないが、細胞分化の方向性決定に際して少なくとも何らかの作用を示す分子機構として、一般にDNAメチル化などのエピジェネティックな遺伝子発現の調節機構が関与すると推察されており(文献3)その詳細についての解明が期待されている。

間葉系幹細胞から骨・軟骨細胞への多段階にわたる分化過程において、急速な遺伝子発現の変動により特異的発現増強を示す遺伝子群は多数知られているが、同様に特異的な発現サイレンシングを受ける遺伝子群も多数存在することには、あまり注目されることはなかった(文献4)。我々はこれまでの検討から、このようなサイレンシングをうける遺伝子群中に、興味深い幾つかの遺伝子が含まれることに注目していたが(文献4)その具体的な意義については明らかにすることができていなかった。

本研究計画において我々は、このような分化細胞系譜に特異的な遺伝子サイレンシングをもたらす分子機構について解明するため、骨芽細胞および軟骨細胞分化誘導中の間葉系幹細胞について、ゲノムDNAのメチル化修飾の状態を網羅的かつ経時的に追跡する

ことにより、この過程における代表的なメチル化領域を多数同定し、その生物学的・機能的な意義について検討する計画を立てた。

このような解析を行うことで、ゲノムDNAの配列情報のみによらない細胞分化の制御機構の存在を明らかにし、骨・軟骨細胞分化プロセスに必須とされる分子機構について解明を目指した。このような試みは、様々な骨系統疾患や軟骨関連疾患の病態解明とその治療法検討に役立つ知見となることが期待される。

(引用文献)

1. Allegrucci C. et al. *Reproduction* 129:137-149 (2005)
2. Song F. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:3336-3341 (2005)
3. Jaenisch R and Bird A. *Nature Genetics.* 33:245-254
4. Sekiya I. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:4397-4402 (2002)
5. Noer A et al. *Mol. Biol. Cell* 17:3543-3556 (2006)

2. 研究の目的

間葉系幹細胞から多段階にわたる骨・軟骨細胞への分化過程において、急速な遺伝子発現の変動により特異的発現増強を示す遺伝子群は多数知られるが、同様に特異的な発現サイレンシングを受ける遺伝子群も多数存在する。我々はこのようなサイレンシングをうける遺伝子群中に、興味深い幾つかの遺伝子が含まれることを見出している。本研究では、この分化細胞系譜に特異的な遺伝子サイレンシングをもたらす分子機構について解明するため、骨芽細胞および軟骨細胞分化誘導中の間葉系幹細胞におけるゲノムDNAのメチル化修飾の状態について、経時的かつ網羅的に追跡する。本解析によって同定される、これらの細胞分化過程における代表的なメチル化領域について、その生物学的・機能的な意義を検討することにより、ゲノムDNAの配列情報のみによらない細胞分化の制御機構の存在と意義を明らかにし、骨・軟骨細胞分化プロセスを進行させる分子機構を解明してゆくことにより、様々な骨系統疾患や軟骨関連疾患の病態解明とその治療法検討に役立つ知見を得ることが目標である。

3. 研究の方法

(平成19年度)

(1) 間葉系幹細胞の軟骨細胞および骨芽細

胞への分化誘導：

ヒト間葉系幹細胞の培養として、本学で実施した膝関節手術の術前に承諾を得た検体提供者から骨髄・海綿骨および滑膜等由来の間葉系幹細胞を獲得し、細胞増殖能、in vitroでの分化能、表面抗原等の基礎データを収集し、細胞を凍結保存した。これらの中から幾つかの細胞を選び出して解凍し、必要に応じて、軟骨細胞および骨芽細胞への分化誘導を、BMP2 および TGF β 添加によるペレット培養と、アスコルビン酸およびベータグリセロリン酸添加による平皿培養でそれぞれ行ない、並行培養した細胞の染色評価による分化誘導度モニターを行いながら、4 段階にわたった分化段階ステージの細胞からトータル RNA および、ゲノム DNA を抽出した。

(2) 軟骨細胞および骨芽細胞の分化誘導過程における発現サイレンシング遺伝子の同定：上記(1)により培養細胞から抽出した RNA を用い、アフィメトリクス社の Gene Chip アレイによる網羅的遺伝子発現の解析を行った。ゲノム DNA メチル化解析結果との並行性について検討することは重要と考えられた。並行実験による培養細胞からのデータを利用してサイレンシング遺伝子群を探索し、軟骨細胞分化と骨芽細胞分化過程における差異に注目しながら候補遺伝子群を選出した。

(3) 候補遺伝子アプローチによる軟骨細胞分化におけるメチル化 DNA の探索：上記(1)により培養細胞から抽出したゲノム DNA を用い、(2) の発現アレイ解析から選ばれたサイレンシング遺伝子について解析をおこなった。まず遺伝子上流領域の DNA 配列解析により CpG アイランドの有無と範囲について解析し、保有するものについてバイサルファイトシーケンス法による解析を進めた。上流 1 から 2 kb 以内に 1 または 2 組の目標増幅断片を設定して、バイサルファイト処理後のゲノム DNA について 2 ラウンドの PCR で断片増幅を行った。増幅した PCR 産物は電気泳動による分離同定をおこない、増幅された産物のバンドを切り出して、レジンカラムを用いた精製をおこない、プラスミドベクターへのサブクローニングと大腸菌へ形質転換をおこなうことで、複数断片のメチル化レベルを解析した。すなわち各サンプル約 10 コロニーずつ程度について、配列解析を遂行し、元来の CpG 配列が保存された断片配列の存在率を計算することで、メチル化レベルの定量的解析を行った。

第一段階のスクリーニングとして、まず 2 つの分化段階ステージにおける比較解析を行なった。分化誘導直前の検体および 3 週間の分化誘導をおこなった最終検体から 1 検

体ずつのバイサルファイト処理後のゲノム DNA を用いて PCR をおこない、増幅断片のサブクローニングを行った。それぞれ 5-10 クローンずつの配列解析をおこない、メチル化配列に明らかな差異をみとめる領域を探索した。次に多段階分化レベルにおける複数の検体から、これらのメチル化領域の広がりの変化と遺伝子発現レベルの変化との並行性について検討することを目標とした。この方法により、分化に伴うメチル化変化を示す遺伝子領域の同定を可及的多数行うことを年度内の目標とした。

(平成 20 年度)

(1) 間葉系幹細胞の軟骨細胞および骨芽細胞への分化誘導：前年度までに採取したヒト間葉系幹細胞を用いて、軟骨細胞、骨芽細胞および脂肪細胞への分化誘導をペレット培養または平皿培養でそれぞれ行ない、並行培養した細胞の染色評価による分化誘導度モニターを行うと共に、いくつかの分化段階においてトータル RNA およびゲノム DNA を細胞から抽出した。

(2) 軟骨細胞および骨芽細胞の分化誘導過程における DNA メチル化変動の網羅的解析：前年度におこなった候補遺伝子アプローチによるメチル化解析から、間葉系幹細胞における DNA メチル化状態は、軟骨細胞への分化誘導過程においては比較的安定的に維持されることが明らかとなった。そこでメチル化状態の変化の現れる稀なゲノム DNA 領域を同定するための、網羅的な解析の実施が望まれた。メチル化感受性もしくは非感受性の制限酵素を利用したサブトラクション法の実施の可能性および、メチル化 DNA 結合蛋白 MeCP2 に対する特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を応用したゲノム DNA のタイリングアレイ解析実施の可能性について検討した。

(3) 観察された間葉系幹細胞でのメチル化変化の評価が生体内での変化を反映するものであるか検証するため、ヒト関節軟骨組織におけるメチル化レベルの評価をおこなった。本学運動器外科学において人工膝関節置換術中に採取された関節軟骨組織を用いて、軟骨細胞の分化段階を反映する表層・中間層・深層におけるゲノム DNA を抽出し、各層における DNA メチル化レベルの相違について検討するとともに、間葉系幹細胞で観察されたメチル化レベルとの比較をおこなうことで、後者における評価の妥当性について検討した。

(4) メチル化変動領域周辺についての解析：上記により同定されたメチル化変動領域については、周辺領域におけるメチル化レベルの解析についても明らかにすることが望

まれた。まず周辺領域のメチル化状態についてパイサルファイトシーケンス法により検証し、複数検体で再現性の確認された領域について多段階の分化ステージで検討することにより、メチル化誘導が行われる時期を明らかにする。また観察されたメチル化変動が軟骨細胞への分化誘導過程に特異的なものであるか否かについて検討するため、骨芽細胞および脂肪細胞への分化誘導をおこなった細胞についても多段階ステージの検体でメチル化解析を試みた。

(5) メチル化変動遺伝子による分化制御の可能性についての検討：同定されたメチル化変動遺伝子の細胞分化制御に果たす役割について検討するため、siRNA の遺伝子導入による遺伝子ノックダウンの軟骨細胞分化に与える影響について検討する計画であった。具体的には、トリジンブルー染色による組織染色評価と軟骨細胞特異的なマーカー遺伝子の発現レベルの評価により遺伝子ノックダウンの影響について検討し、単一遺伝子の抑制でみられる変化が乏しい場合には、複数遺伝子ノックダウンをおこない、その効果が明らかである場合には、個々の遺伝子発現抑制の結果生じるその他の遺伝子発現の変化について網羅的に解析をすすめ、具体的な標的遺伝子を絞り込むことによって詳細な分子制御の機構について明らかにしてゆくことが研究計画期間内の目標であった。

4. 研究成果

本研究は、様々な組織に存在して多分化能を示す間葉系幹細胞の、由来組織に基づく性質の相違について潜在的な関与の推定される、エピジェネティックな制御の可能性について検討した。

まず各種間葉系幹細胞の採取および保存は、平成 19 年度に計画通りに実施され(本学運動器外科学教室) 培養実験系によって、採取した細胞の性質判定を行なった。本研究計画の大半は、これらの細胞のうち、とくに軟骨細胞への分化能の高いことの示された滑膜由来間葉系幹細胞を用いて、軟骨細胞への分化誘導をペレット培養法により行い、その前後におけるゲノム DNA のメチル化状態について検討をおこなうことで遂行された。

候補遺伝子アプローチとしては、骨・軟骨系細胞への分化制御を中心的に担う *RUNX2* および *OSX* 遺伝子や *SOX9* 遺伝子などの転写因子群に注目して解析をおこなったが、各遺伝子の転写開始点付近における CpG 配列の密度と CpG アイランドの広がりなどに注目した結果、特に *RUNX2* 遺伝子および *SOX9* 遺伝子に焦点を絞ることができた。興味深いことに、これらの二つの重要な転写因

子遺伝子の CpG 配列の広がりには極めて類似した様式を示しており、高密度の CpG 配列部位が上流 1 Kb ほどまで広がっていたが、間葉系幹細胞におけるメチル化の程度についても、同等の結果が観察され、軟骨細胞への分化誘導の有無にかかわらず、極めて低いメチル化レベルが保たれていた。追加して検討した遺伝子 *SOX5*, *SOX6*, *NKX3.2* などについても特記すべき所見は認められず、したがって、これらの転写因子遺伝子における DNA メチル化制御が分化調節に関わる可能性は低いと考えられた。

次に、網羅的な遺伝子発現のマイクロアレイ解析によって候補遺伝子群を選出した。さらに、これらの遺伝子プロモーター領域について、メチル化候補領域の推定をおこない、メチル化調節の関与の推測された候補遺伝子領域のそれぞれについて、パイサルファイトシーケンス法による解析を行った。選別した遺伝子群は 2 型 11 型コラーゲン遺伝子、マトリリン遺伝子、コンドロモジュリン遺伝子などの細胞外マトリックス蛋白をコードする遺伝子に加えて、ウイント 1 1 遺伝子や FGF 受容体 3 遺伝子などの成長因子・サイトカインとその受容体、阻害因子やホルモン受容体などであるが、その遺伝子発現の変動についてはリアルタイム RT-PCR でまず確認を行うことができた。一方、プロモーター領域のメチル化レベルについては、パイサルファイト・シーケンス法で詳細に定量的な評価を行った結果、大半の遺伝子領域では分化誘導の前後における大きな変化を示すことなく、分化レベルの相違によっても比較的安定に保たれることが確認された。また、近年明らかにされてきた、CpG 密度とシトシン・メチル化レベルとの相関についても、合致したデータを得ることができ、大半の高 CpG 密度を示す部位ではメチル化レベルは低く保たれ、逆に低い CpG 密度を示す領域では高いメチル化レベルを示すことが多いことが確認された。

以上のようなメチル化レベルの相違が、生体において通常の分化過程をたどる細胞においてみられる変化を反映するものであることを確認するため、ヒト被験者から提供された成人関節軟骨を用いて、3 層もしくは 4 層にわけて採取した軟骨細胞層由来のゲノム DNA 検体について、これまで解析してきた遺伝子領域における DNA メチル化の程度について再検討した。このような軟骨組織の層(表層・中間層・深層)は軟骨細胞の分化段階の異なる細胞集団を分けて評価することのできる方法であるが、先の解析において間葉系幹細胞の分化によって変動を示さなかった大半の遺伝子領域については軟骨組織の層別の評価でも多きな相違は示さず、

また間葉系幹細胞で観察されたメチル化レベルとほぼ同等のメチル化を示すことが確認された。すなわち間葉系幹細胞におけるメチル化の評価は、生体内での細胞の状態をほぼ忠実に反映するものであると考えられた。

一方、軟骨細胞への分化誘導によって、上記傾向とは異なったメチル化レベルを示した遺伝子領域として、我々は *SDF1* 遺伝子上流約 1 kb の領域を同定することができた。この領域は CpG 密度が 13% と高密度の CpG 部位が集積するにもかかわらず、分化誘導前の間葉系幹細胞において、約 85% と極めて高いメチル化レベルを示していた。由来組織の異なる、滑膜以外の組織から得られた間葉系幹細胞においても類似した結果が確認されたが、興味深いことにこの細胞を軟骨細胞への分化誘導をおこなうと 3 週間後にはメチル化レベルが解除される傾向 (約 60% まで) のあることが示された。

本結果、すなわち間葉系幹細胞において通常とは異なるメチル化レベルを示した *SDF1* 遺伝子上流約 1 kb の領域が軟骨細胞への分化誘導に伴って脱メチル化の傾向を示したことと一致して、ヒト軟骨組織におけるメチル化レベルの解析からは、全体に高いメチル化レベルを示すことが確認され、また最表層におけるメチル化 (約 50%) が特に高いことが確認された。したがって、*SDF1* 遺伝子のこの領域におけるメチル化変化は、生体内での軟骨細胞分化においても、重要な機構として作用している可能性が高いと考えられる。また、このような脱メチル化の傾向は、実際の遺伝子発現の変化として観察された発現抑制とは逆説的に相関するものであることから、DNA メチル化を介した遺伝子発現の制御は優先的に作用するものではなく、他の機構を介した遺伝子発現に対して補助的に作用するものであることが推定されるが、その詳細については今後の課題とされる。この領域における変化の特異性と機能的意義について、今後も解析を続ける必要があると考えられる。

本研究計画の意義として、間葉系幹細胞における DNA メチル化レベルの評価を先駆的に遂行することが出来た。本研究計画期間内には、いわゆる網羅的な解析の実施には至らなかったが、候補遺伝子アプローチ法による中規模解析を実施することにより、従来明らかにされていなかった、間葉系幹細胞の軟骨細胞分化の過程におけるゲノム DNA のメチル化調節について明らかにすることが出来た。さらに、このような変動は稀な現象であり、エピジェネティックな制御は比較的安定的であることが示されたが、稀なメチル化変動領域は候補遺伝子領域アプローチ法によっても同定可能であることが示された。

特に、軟骨細胞分化過程において注目すべき *SDF1* 遺伝子は特徴的なメチル化制御を受けることが示されたため、本遺伝子のメチル化制御の機構と、その生物学的な意義については、更なる解明を進める必要性が示された。間葉系幹細胞のエピジェネティックな遺伝子発現制御の機構について明らかにしてゆくことは、再生医療への利用の期待される本細胞を効率よく使用するために重要な作業であり、また骨肉腫などの悪性腫瘍を含めた間葉系細胞の分化障害などを原因として生じる様々な疾患の発症機構の解明を進める上でも、その意義は極めて大きいと考えられる。

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 1 件)

Ezura Y, Sekiya I, Koga H, Muneta T, Noda M. Methylation status of CpG-islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis and Rheumatism* 60:1416-1426, (2009) 査読あり

[学会発表](計 2 件)

- (1) 江面陽一 関矢一郎 宗田大 野田政樹: 「ヒト滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨細胞分化過程における主な遺伝子上流 CpG アイランドのメチル化状態は定常的に維持される」. 第26回日本骨代謝学会学術集会. 平成20年10月28日. 大阪国際会議場
- (2) 江面陽一, 関矢一郎, 宗田大, 野田政樹.: 「Epigenetic Status Monitored by DNA Methylation in the 5'-flanking Regions of CpG-rich Promoters are Stable during Chondrogenesis in Pellet Cultures of Pluripotent Human Mesenchymal Progenitor Cells」 米国骨代謝学会, 平成19年9月1

8日、ホノルル

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特記すべき事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

江面 陽一(エツラ ヨウイチ) 准教授
東京医科歯科大学 難治疾患研究所
研究者番号: 50333456

(2)研究分担者

(平成19年度)

関矢, 一郎 (セキヤ, イチロウ) 准教授
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

研究者番号: 10345291

(3)連携研究者

(平成20年度)

関矢, 一郎 (セキヤ, イチロウ) 准教授
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

研究者番号: 10345291