

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08257

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞のstemnessに影響を及ぼす代謝経路の多様性の検討

研究課題名(英文) Investigation of the diversity of metabolic pathways affecting stemness in mesenchymal stem cells

研究代表者

竹谷 健 (Taketani, Takeshi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：30359880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)の代謝経路の多様性がMSCのstemnessに影響するか検討した。まず、stemnessを高、中、低の3群に分けたMSCを用いて行なったメタボローム解析を調べたところ、3群がそれぞれ共通の代謝プロファイルを形成しており、遺伝子発現解析結果を組み合わせると、TCAサイクルに關与する特定のアミノ酸が優位に変化することが同定された。次に、先天性骨系統疾患である低ホスファターゼ症(HPP)のMSCのメタボローム解析を行ったところ、タウリンが低下していることが明らかとなった。タウリンを付加したところ、自己複製能および脂肪分化能が促進された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、正常な間葉系幹細胞だけでなく、骨系統疾患の1つである低ホスファターゼ症の間葉系幹細胞において、代謝プロファイルの違いから幹細胞としてのstemnessに關与する代謝産物を同定できたことは、先天性骨系統疾患だけでなく健康人が加齢により生じる疾患(骨粗鬆症など)に対する代謝産物を用いた治療が期待される結果を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the diversity of metabolic pathways in mesenchymal stem cells (MSCs) affects the stemness of MSCs. First, metabolomic analysis of MSCs divided into three groups (high, medium, and low stemness) revealed that the three groups share each common metabolic profile. And we identified a predominant change in specific amino acids involved in the TCA cycle when we combined with gene expression analysis. Next, metabolomic analysis of MSCs with hypophosphatasia (HPP), one of the congenital skeletal diseases, demonstrated that taurine decreased. Addition of taurine enhanced self-renewal and adipogenic differentiation capacity.

研究分野：小児科

キーワード：間葉系幹細胞 タウリン 低ホスファターゼ症

研究概要

1. 研究開始当初の背景

先天性骨系統疾患は、約 500 種類も存在するが日本では年間 250 人程度しか出生しない、非常にまれな病気である。多くは骨・軟骨代謝に関わる酵素、転写因子などの遺伝子異常が原因である。一部の疾患にのみ、酵素補充療法などの薬物治療により一定の症状の改善を認めているが、効果が限定的で QOL/ADL が困難であることが多く、致死的な経過をとることも少なくない。また、生涯を通じて薬物治療を続ける必要があるため、薬の副作用や、高額な医療費・福祉費などの問題点も存在する。そのため、根治療法の確立が不可欠である。骨および軟骨の起源である間葉系幹細胞 (MSC) は幹細胞として能力 (stemness) である、自己増殖能と分化能を有する体性幹細胞である。幹細胞の stemness は遺伝子発現やタンパクの相互作用などの複数の要因により規定されている。しかし、代謝経路の多様性が MSC の stemness にどのように影響するかがわかっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 2 つである。

- MSC の stemness (自己増殖能と分化能) に影響を及ぼす代謝経路を明らかにすることによって、stemness の高い MSC を作成する方法を確立すること
- 先天性骨系統疾患の stemness が低下した MSC の代謝経路を修復することで骨再生を回復させることを目的としている。

3. 研究の方法

MSC の stemness に必要な代謝経路の解析

stemness を高、中、低の 3 群 (REC, MEC, SEC) に分けた MSC を用いて行なった網羅的メタボローム解析を詳細に検討した。具体的には、TCA 回路や解糖系、アミノ酸代謝などの代謝経路ごとの代謝産物の増減を細胞群ごとに評価して、stemness が高い高純度 MSC に優位性がある代謝経路を絞り込んだ。

先天性骨系統疾患の MSC における stemness を回復させる代謝産物の解析

先天性骨系統疾患の 1 つである低ホスファターゼ症 (HPP) 患者由来 MSC を用いて上記 3 の実験を行い、HPP 由来 MSC の stemness が回復するために必要な代謝産物を同定した。その後、同定された代謝産物を ALPL 遺伝子を shRNA でノックダウンした MSC に投与することで、MSC の stemness を検討した。stemness の解析は、増殖能 (増殖能、コロニー形成能) および分化能 (骨、軟骨および脂肪に誘導する培地で培養して、それぞれ免疫染色や遺伝子発現などで評価) を行った。

4. 研究成果

MSC の stemness に必要な代謝経路の解析

ヒト骨髄から CD90 および CD271 のどちらも発現している細胞をセルソーターでシングルセルソーティングして、96 ウェルプレートに 1 細胞ずつ播種して 2 週間で Confluent になった細胞を Rapidly expanded clone (REC) とした。2~3 週間および 3~4 週間以降に Confluent になった細胞をそれぞれ、Medium expanded clone (MEC) および Slowly expanded clone (SEC) とした。これら 3 つの細胞集団をそれぞれ 3 クローンずつ用いて、メタボローム解析をおこなった (図 1A, B)。その結果、増殖能により分類した 3 群がそれぞれ共通の代謝プロファイルを形成することが明らかとなった。このメタボローム解析とこれまで我々が行った 3 群の RNA シークエンスを用いた遺伝子発現解析結果を組み合わせて詳細な解析を行ったところ、TCA サイクルに参与する特定のアミノ酸が優位に変化することから、現在、stemness に影響するかどうか詳細な解析を行っている。

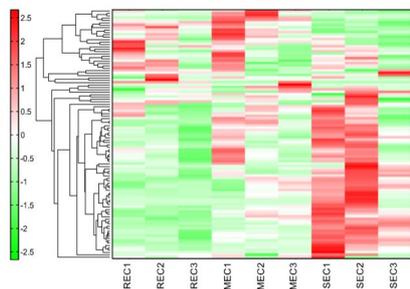


図1A Heatmap

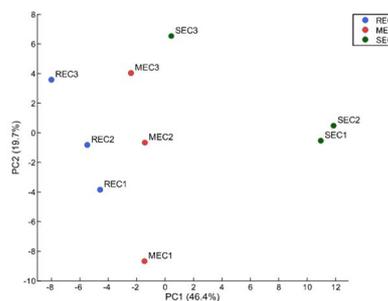


図1B 主成分分析

先天性骨系統疾患の MSC における stemness を回復させる代謝産物の解析

3 人の HPP 患者および 2 名の正常健康人の骨髄から、それぞれ通常の培養方法で増殖させた MSC を用いて、メタボローム解析を行ったところ、図 2 に示す代謝産物が HPP 患者と正常健康人において優位に変化することが明らかとなった。これまで我々が行った HPP 患者および正常健康人の MSC を用いた遺伝子発現解析結果を組み合わせると、タウリンが正常健康人に比較して、HPP 患者では優位に低下していたことから、タウリンが stemness に影響するかどうかを検討した。正常健康人由来 MSC に *ALPL* 遺伝子 ShRNA で *ALPL* 遺伝子をノックダウンした (図 3)。これらの細胞にタウリン (0, 10, 15, 20 μ M) を付加して細胞の増殖能を検討したところ、ShRNA で *ALPL* 遺伝子をノックダウンした MSC は control ShRNA を導入した MSC と同様に増殖した (図 4)。また、タウリン付加したコロニーアッセイで検討したところ、増殖能と同様に ShRNA に関わらずタウリンを付加した MSC はコロニー数が増加した。次に、タウリン付加による分化能を検討した。まず、骨分化能を ALP 活性、遺伝子発現 (*ALPL*, *RUNX2*, *OPN*, *OSX* など)、Alizarin red 染色で分析したところ、タウリン付加の影響はみられなかった。次に、軟骨分化を、遺伝子発現 (*SOX9*, *Col2a1* など)、Alcian Blue 染色で検討したが、骨分化同様にタウリン付加による変化はなかった。しかし、脂肪分化において、遺伝子発現 (*PPAR γ* , *Leptin* など) および Oil red 染色で調べた結果、control ShRNA および *ALPL* ShRNA 同様に脂肪分化が促進された (図 5)。なお、骨髄から培養した健康人 MSC にタウリン付加したところ、増殖能および分化能ともに亢進した。

5. 考察

これまでの結果から、MSC の stemness に影響する代謝産物がいくつか見つかった。造血幹細胞の stemness に影響する代謝産物が報告されているが、現時点で造血幹細胞とは異なる物質である可能性が高い。今後、詳細な検討を行うことで、MSC の stemness に影響する代謝産物を明らかにして行く予定である。また、HPP の MSC を用いて同定されたタウリンは ALP の発現に関わらず MSC の stemness に影響する可能性が示唆された。先行論文はタウリンが骨分化を促進する報告があったが、HPP に対する骨分化は促進されなかった。しかし、今回の検討で、タウリン付加により脂肪分化が促進する結果が明らかとなったことは、脂肪分化する MSC は stemness が強いことから、HPP の MSC の stemness に positive な影響をもたらす可能性が示唆された。

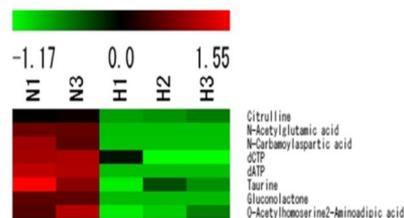


図2 Heatmap
N, 健康人; H, HPP患者

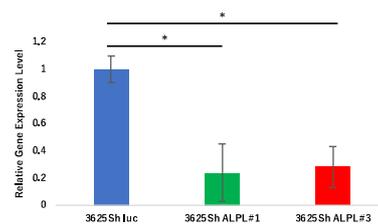


図3 *ALPL* 遺伝子発現
3625, 正常健康人由来 MSC

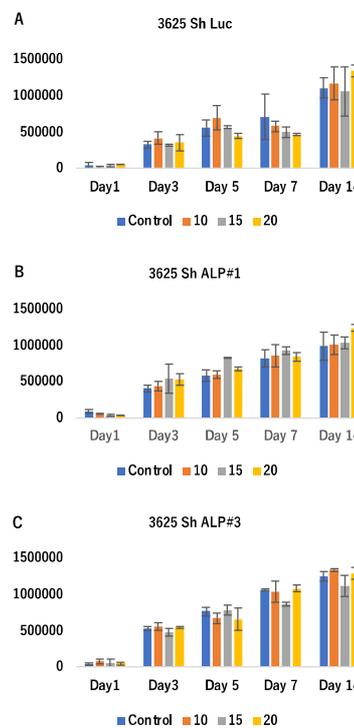


図4 Cell viability アッセイ
A, Sh control; B, ShALP#1; C, ShALP#3

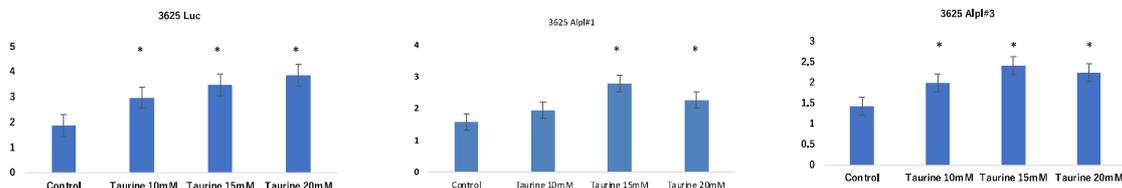


図5 Oil red 染色 (432nm 吸光度測定)
A, Sh control; B, ShALP#1; C, ShALP#3

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 1件）

1. 著者名 Yang Jiahao, Liu Lu, Oda Yasuaki, Wada Keisuke, Ago Mako, Matsuda Shinichiro, Hattori Miho, Goto Tsukimi, Kawashima Yuki, Matsuzaki Yumi, Taketani Takeshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Highly-purified rapidly expanding clones, RECs, are superior for functional-mitochondrial transfer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	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） 10.1186/s13287-023-03274-y	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 -

〔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
研究協力者	- - (Kamrunnahar Shanta)		

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
---------	---------