

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：32665
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22580340
 研究課題名（和文）終末分化した脂肪細胞および卵巣顆粒層細胞の脱分化および多能性獲得機構の解明
 研究課題名（英文）Integrated transcriptomics for dedifferentiation and acquisition of multipotency in porcine mature adipocytes and follicular granulosa cells.
 研究代表者
 加野 浩一郎（KANO KOICHIRO）
 日本大学・生物資源科学部・准教授
 研究者番号：80271039

研究成果の概要（和文）：

本研究では、成熟脂肪細胞および顆粒膜細胞の脱分化機構の一端を明らかにする目的で、脱分化過程における遺伝子発現状況を網羅的に調べた。まず、ブタマイクロアレイで利用できる遺伝子機能情報は不足していることから、ヒトおよびマウスの全遺伝子に対する配列相同性検索を用いてブタの遺伝子機能予測を行なった。その結果、70%強の遺伝子機能情報を付与することに成功した。次いで、成熟脂肪細胞あるいは顆粒膜細胞の脱分化によって増減した遺伝子群および両細胞の脱分化に共通して増減した遺伝子群に関連する生物学的機能の特徴を推測した。その結果、各細胞の脱分化後に共通して、細胞増殖や細胞接着因子、細胞外マトリックス、細胞分化に関与する遺伝子群の発現上昇が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We conducted global gene expression analyses to clarify the dedifferentiation mechanism of mature adipocytes (MAs) and follicular granulosa cells (GCs). By comparing global gene expression profiles during the dedifferentiation process, we searched for particular biological functions in those genes whose expression intensities were increased or decreased by dedifferentiation of MAs and GCs. After dedifferentiation, expression of those genes expressed strongly in MAs and GCs, such as genes for lipid metabolism and reproductive system development, was remarkably decreased. Moreover, in the process of dedifferentiation of both MAs and GCs, genes involved in cell morphology, cytoskeleton, cell adhesion, angiogenesis, cell proliferation, and tissue development were upregulated, whereas those involved in the regulation of gene expression were downregulated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 2011 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 2012 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：発生、多能性獲得

1. 研究開始当初の背景

近年、分化した体細胞核を再プログラミングする3つの方法が報告された。分化した体細胞を、1) 除核した卵母細胞に核移植する (Wilmot et al., 1997 ; Wakayama et al., 1998)、2) 胚性幹 (ES) 細胞と融合させる (Tada et al., 2001)、3) 複数の核内転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc) をウイルスによって導入し、強制発現させる (Yamanaka et al., 2007)、以上の3つの方法を用いることによって、すでに分化した体細胞核をリプログラミングすることに成功している。これらのことから考えると、分化した体細胞核をリプログラミングするには卵母細胞および ES 細胞に含まれるリプログラミング因子、あるいは山中ファクターが必要不可欠であることを示している。しかし、それらの技術を用いても体細胞がリプログラミングされる確率はいずれも数パーセントであり、現在においても解決すべき問題が山積している。体細胞をリプログラミングするには、上記1~3)の方法があるが、1および2)はいずれも卵子が必要であり、研究材料としては扱いづらく、またヒトへの応用となると倫理的な問題において高い障壁がある。一方、山中ファクターの導入による体細胞のリプログラミングは卵子を用いないことから倫理的な問題をクリアする素晴らしい方法ではあるが、体細胞にウイルスを用いて外来遺伝子を導入することが必須であることから、主に安全性において解決すべき問題が山積しているのが現状である。

そこで、我々は卵子や山中ファクターを用いないリプログラミングを誘導法の確立するために以下の点に着目し、仮説を立てた。1) 生体組織内における分化細起り、特異的な機能を発現する分化細胞に終末分化する。2) 終末分化した細胞は、組織内の微小環境に厳密に支配され、特異的な機能を確実に維持するために厳密な制御を受けている。次いで、一般的な細胞の特徴として、3) 終末分化した細胞は増殖を停止しており、増殖している細胞はその機能を発現しない。すなわち、分化と増殖は対極にある。4) 増殖している細胞は DNA (遺伝子) を複製するために分化状態のクロマチン構造を一時的に緩める必要がある。以上、1~4) から考えると、終末分化した体細胞をリプログラミングするには、それらを a) 厳密な制御を受けている組織から解放すること、b) 組織内の微小環境とは全く異なる状況で維持すること、c) 活発な増殖を誘起し、エピジェネティックな変化を誘導することによって組織内で作られた細胞の記憶を出来る限り消去すること、以上、a~c) が出来れば終末した体細胞においてもリプログラミングできると仮説し、研究

を遂行した。その結果、終末分化した脂肪細胞を組織から単離し、プラスチック内で培養して増殖を誘起すると脂肪細胞は脱分化し、線維芽細胞様の DFAT (dedifferentiated fat) 細胞が得られた。それらは脂肪細胞に再分化するだけでなく (Yagi et al., 2004 ; Nobusue et al., 2008)、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、神経系細胞などに分化転換することを我々は報告した (Matsumoto et al., 2008 ; Oki et al., 2008 ; Kazama et al., 2008 ; Ohta et al., 2008)。以上の結果は、我々の仮説を強く支持すると考えられるが、脂肪細胞が脱分化し、多能性獲得した機構については明らかではない。

2. 研究の目的

最近、我々は終末分化した脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞を脱分化誘導することによって、骨芽細胞や筋細胞などの間葉系細胞へ、さらには胚葉を越えて神経系細胞や乳腺上皮細胞へと分化転換する多能性前駆細胞を簡便かつ大量に取得する培養系を確立した。本研究では、なぜ終末分化した脂肪細胞あるいは卵胞顆粒層細胞が一般的な培地で培養するだけで、脱分化し多能性を獲得するのか、そのメカニズムを明らかにすることを目的として行なった。

3. 研究の方法

成熟脂肪細胞および顆粒層細胞の脱分化過程で経時的にサンプリングした細胞から全 RNA を採取したのち、ブタ GeneChip (アフィメトリクス社) を用いて網羅的に解析した。ブタゲノムは十分に解読されていないので、マウスおよびヒトゲノム情報を利用してブタゲノムにアノテーションをつけて、より多くの情報を付与した。それを基にして、GeneChip 解析から得られたデータから、脂肪細胞および顆粒層細胞の脱分化過程において、それぞれの細胞に共通かつ特異的に発現すると推定される遺伝子群の抽出を行なった。多能性獲得にかかわると推定される遺伝子群の抽出についても、ES および iPS 細胞、組織性幹細胞等の公開されているデータベース等を利用して抽出を試みた。

4. 研究成果

我々は、生体内において特異的な機能をもつ成熟脂肪細胞 (MAs) および卵胞顆粒層細胞 (GCs) を体外培養し、脱分化させることによって、種々の細胞へと分化する細胞を作り出すことに成功している。しかし、これらの細胞がどのような機構で脱分化するかについては明らかにされていない。本年度では、MAs および GCs の脱分化機構の一端を明らかにする目的で、脱分化前後の各2点をマイク

ロアレイ解析することによって、脱分化過程における遺伝子発現状況を網羅的に調べた。ブタマイクロアレイで利用できる遺伝子機能情報は不足していることから、ヒトおよびマウスの全遺伝子に対する配列相同性検索を用いてブタの遺伝子機能予測を行なった。その結果、70%近くの遺伝子機能情報を対応付けすることに成功し、ブタマイクロアレイデータの生物学的解釈が可能となった。次いで、MAあるいはGCsが脱分化および多能性獲得することによって有意に変化した遺伝子に関連する生物学的機能の特徴を調べた。その結果、採取直後に強く発現していたMAsおよびGCs特異的機能に関与する遺伝子は、脱分化後にその発現が著しく減少した。一方、脱分化後に共通して有意に発現が増加した遺伝子は、細胞運動、細胞の形態変化、組織の発生、細胞接着、細胞増殖、血管新生、細胞の形態形成およびアクチン細胞骨格の生合成に関連する機能をもつことが明らかとなった。また、これらの遺伝子群についてさらに精査した結果、ストレス応答、細胞の形態変化および細胞の分化制御に関する遺伝子群に分類されることが示された。

ブタ脂肪細胞 (MAs) および卵胞顆粒層細胞 (GCs) の脱分化および多能性獲得に関与する遺伝子群を抽出する目的で、MAs および GCs の脱分化および多能性獲得過程で得られた経時的なマイクロアレイデータをもとにして、それらの過程に特徴的な遺伝子発現パターンを調べた。その結果、体外培養したGCsは、培養24時間後までにGCs特異的遺伝子群の発現が急速に低下した。一方、有意に発現上昇した遺伝子は培養24時間後に最も多かったが、その後は殆ど変化しなかった。また、有意に発現上昇した遺伝子は、“ストレス応答”、“形態変化”および“組織形成”に関わるものであった。以上の結果から、GCsの脱分化および多能性獲得は培養24時間以内と極めて短時間に起こると推察された。次いで、公共のデータベースに公開されている植物および動物の体細胞とそれに由来する多能性細胞 (プロトプラストおよびiPS細胞) のマイクロアレイデータを取得し、生物情報学的手法を用いてMAsおよびGCsに由来する多能性細胞と比較解析を行なった。その結果、葉の組織を酵素処理して得られたプロトプラストでは、光合成に関わる遺伝子群の発現が低下し、外傷およびストレス応答に関わる遺伝子群の発現量が増加することが明らかとなった。また、ブタ胎子線維芽細胞 (PFF) 由来のiPS細胞とMAsおよびGCs由来の多能性細胞から得られたデータを主成分解析した結果、PFF、MAsおよびGCs由来の多能性細胞の遺伝子発現状況は類似したが、ips、MAsおよびGCsとは大きく異なった。以上の結果

から、MAs および GCs に由来する多能性細胞は、1) プロトプラストと同様にストレス応答に関わる遺伝子群が脱分化および多能性獲得する過程において高発現すること、2) PFF の遺伝子発現状況と類似するが、多能性をもつiPS細胞とは異なった特徴をもつことが示された。

成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞 DFAT の多能性に関連する遺伝子を明らかにする目的で行なった。すなわち、我々が取得した DFAT のマイクロアレイデータと遺伝子発現情報データベースが提供する種々の多能性細胞のマイクロアレイデータを比較解析することによって多能性に関連遺伝子の抽出を試みた。まず、DFAT、胚性幹細胞、神経幹細胞、肝芽細胞、間葉系幹細胞であるMSCsおよびC3H10T1/2のマイクロアレイデータを主成分分析した。その結果、成熟脂肪細胞に由来する DFAT は間葉系幹細胞であるMSCsおよびC3H10T1/2と高い類似性を示したが、外胚葉由来の神経幹細胞や内胚葉由来の肝芽細胞とは著しく異なっていた。次に、先に行なった。主成分分析の結果を基に、DFAT、MSCs および C3H10T1/2、さらには分化能をもたない線維芽細胞株 BALB-3T3 の遺伝子発現プロファイルを用いて比較解析することによって多能性関連遺伝子の抽出を試みた。その結果、DFAT、MSCs および C3H10T1/2 それぞれに共通して高く発現する遺伝子 117 個が、また共通して低く発現する遺伝子 339 個が抽出された。さらに、それら抽出された遺伝子の中から核内転写因子を抽出するために、PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) を用いて解析した。その結果、発現が高い 117 個の遺伝子の中には 5 個の核内転写因子 (TF) が、また発現が低い 339 個の遺伝子のうち 24 個の TF が含まれていた。5 つの TF の遺伝子機能を調べた結果、抽出した TF の 2 つは胚発生にかかわる遺伝子であり、残りの 3 つは組織特異的遺伝子を抑制して多能性を維持する働きをもつことが明らかとなった。

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 6 件)

1. Oki Y, Ono H, Motohashi T, Sugiura N, Nobusue H, Kano K, Dedifferentiated follicular granulosa cells derived from pig ovary can transdifferentiate into osteoblasts, *Biochem J*, 2012, 447: 239-248. (査読有)
2. Obinata D, Matsumoto T, Ikado Y,

Sakuma T, Kano K, Fukuda N, Yamaguchi K, Mugishima H, Takahashi S, Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model, *Int J Urol*, 2011, 18:827-834. (査読有)

3. Ono H, Oki Y, Bono H, Kano K, Gene expression profiling in multipotent DFAT cells derived from mature adipocytes, 2011, 407: 562-567. (査読有)

4. Nobusue H, Kondo D, Yamamoto M, Kano K, Effects of lysophosphatidic acid on the invitro proliferation and differentiation of a novel porcine preadipocyte cell line, *Comp Biochem Physiol Biochem Part B*, 2010, 157: 401-407. (査読有)

5. Yamamoto M, Taniguchi Y, Kano K, Yamada T, Characteristics of Proliferation and Differentiation-Dependent C/EBP, PPAR γ and Leptin Gene Expression Patterns Intrinsic to Bovine Intermuscular, Perirenal and Subcutaneous Preadipocytes, *J Anim Vet Adv*, 2010, 9: 1639-1645. (査読有)

6. Nobusue H, Kano K, Establishment and characteristics of porcine preadipocyte cell lines derived from mature adipocytes. *J Cell Biochem*, 2010, 109: 542-552. (査読有)

[学会発表] (計6件)

1. 内藤竜也、川野有美、沖 嘉尚、加野浩一郎、ブタ卵胞顆粒層細胞における遺伝子発現およびクロマチン構造の変化、日本畜産学会第116回大会、平成25年3月28日、安田女子大学。

2. 森川諒介、沖 嘉尚、加野浩一郎、脱分化脂肪細胞株および種々の多能性細胞における遺伝子発現プロファイルの比較解析、日本畜産学会第116回大会、平成25年3月28日、安田女子大学。

3. 金田詩織、森川諒介、沖 嘉尚、加野浩一郎、成熟脂肪細胞および脱分化脂肪細胞株DFAT由来の脂肪細胞における遺伝子発現プロファイルの比較解析、日本畜産学会第116回大会、平成25年3月28日、安田女子大学。

4. Nobusue H, Onishi N, Oki Y, Shimizu T, Saya H, Kano K, Mutual regulations of actin cytoskeleton remodeling and peroxisome

proliferator-activated receptor γ on early adipocyte differentiation, Dec 7, 2011, 51th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology (Denver CO USA).

5. 沖 嘉尚、小野浩雅、坊農秀雅、加野浩一郎、脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞における脱分化機構の網羅的解析、日本畜産学会114回大会、2011年8月26日、北里大学。

6. Oki Y, Ono H, Motohashi T, Sugiura H, Kano K, Porcine Ovarian Follicular Granulosa Cells Can Transdifferentiate into Osteoblasts In Vitro and In Vivo, Dec 14-20, 2010, 50th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology (Philadelphia PA USA).

[その他]

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/57/0005684/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加野 浩一郎 (KANO KOICHIRO)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：80271039

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし