

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 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591681

研究課題名（和文） 変形性関節症の治療を目指す間葉系幹細胞エピジェネティクスに関する分子生物学的解明

研究課題名（英文） Epigenetics of mesenchymal stem cells considering regenerative therapy for osteoarthritis

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（和文）：

再生医療に利用されるヒト間葉系幹細胞について、ケモカイン遺伝子 SDF1（別名 CXCL12）の上流に同定したメチル化変動部位は、サイレンサー領域として働くことが示された。網羅的なメチル化レベルの比較解析から、インビトロにおける間葉系幹細胞の分化誘導に伴うメチル化変動は極めて稀な現象であったが、生体内で長期の細胞履歴を反映する、異なる組織 MSC においては再現性をもって多数の領域が、関節発生や軟骨細胞分化に重要な遺伝子座に示され、新たな研究課題が提示された。

研究成果の概要（英文）：

The differentiating potentials of human mesenchymal stem cells (hMSCs) were analyzed from epigenetic aspect. By analyzing cytosine methylation status of various gene loci, an upstream region of stromal derived factor 1 (also called as CSCL12) gene was hypothesized to function as silencer element of this gene in hMSCs. Although the alteration of cytosine methylation was a rare event in the in vitro differentiation system, global analysis indicated consistent differences could be represented among hMSCs with different tissue origins, which may reflect relatively long term epigenetic history of individual cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

未分化な間葉系細胞から多段階の制御を受けて形成される骨・軟骨組織の主構成細胞（軟骨細胞および骨芽細胞系）の分化制御は、ランクス2（Runx2）やソックス9（Sox9）

などの転写因子群によって統御されることが知られる一方、細胞外基質や細胞接着などの細胞周囲環境からの影響も重要である。しかし環境要因がどのようにして細胞分化プログラムに影響するかという点については、

十分明らかにされていない。

初期胚発生に重要な細胞分化制御機構として働くクロマチン構成蛋白やゲノム DNA の修飾などのエピジェネティックな変化は、胚性幹細胞 (ES) の自己複製能維持と分化制御に関わる機構として重要であり、大規模なエピジェノム・マッピング研究によって解析されてきた。同様な機構は、成人の組織にも存在する「間葉系幹細胞」(MSC) の分化に際しても、段階的に成熟分化する細胞が次第に他系譜へと移行できなくなる際の重要な制御機構と考えられるが、骨・軟骨細胞分化に関連しては、十分に解明されていなかった。

胚細胞形成や受精・着床などに際した劇的な細胞環境の変化は、エピジェネティックな制御に影響するといわれる。我々はこれまでに、副甲状腺ホルモンシグナルと細胞外基質蛋白オステオポンチンの相互作用が骨髄間葉細胞の分化に関与することを見出し、また間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化過程においては、分化に従い発現抑制を受ける遺伝子群の中から興味深いメチル化変動を示す遺伝子領域(「軟骨細胞分化に伴う DNA メチル化修飾状態の変動領域」; DMR-CD(s): ケモカイン遺伝子 SDF1 および軟骨細胞の初期分化に関わる転写因子 Nkx3.2 遺伝子上流領域など)を同定してきた。

2. 研究の目的

本研究計画は、ヒト間葉系幹細胞(MSC)の軟骨細胞への分化過程でシトシン・メチル化の変動を示す領域について、メチル化変動の細胞系譜特異性を検証し、個々の領域における生物学的な意義について解明を進めることで、再生医療への利用がすでに実現化レベルにある本細胞の有効な選択的採取法と分化制御法開発のための基盤を形成することである。特に、ヒト由来間葉系幹細胞 (MSC) の軟骨細胞分化過程で我々がこれまでに同定してきた「DNAメチル化変動領域」として、SDF1 (別名 CXCL12) 遺伝子や NKX3.2 遺伝子などの遺伝子上流における CpG リッチな領域について、そのメチル化変動の細胞系譜特異性を検証するとともに、個々の領域における生物学的な意義について解明を目指す。さらに「軟骨細胞分化への特異性についての検証」「遺伝子発現調節へ関与する分子機構の解明」「細胞分化へ関与する分子機構の解明」によって、再生医療への利用の期待される本細胞の選択的採取法ならびに分化制御法の開発のための基盤形成を目的とする。

3. 研究の方法

<シトシン・メチル化の網羅的解析>

シトシン・メチル化変動の再現性の検証には、バイサルファイト・シーケンス法を利用

した。網羅的なメチル化変動の解析には、イルミナ社のメチル化解析アレイ (Infinium アッセイ) を用い、間葉系幹細胞の軟骨細胞分化過程における変化を追跡した。また滑膜由来細胞と骨髄由来細胞の比較を行った。メチル化部位のクロマチン構造への影響もしくは関連については、ヒストン分子尾部のメチル化 (H3K4, K9 および K27 など) およびアセチル化修飾状況についてクロマチン免疫沈降法により検討した。

<遺伝子発現の網羅的解析>

網羅的なシトシン・メチル化解析の結果本研究計画の開始以前に行われた遺伝子発現とシトシン・メチル化の比較検討は、限られた遺伝子座における検討結果であり、検討する間葉系幹細胞としては、滑膜組織由来の細胞を用いていた。骨髄由来の細胞に比べて滑膜組織由来細胞の軟骨細胞への分化能は高いことが知られているため、両者における遺伝子発現の比較には重要な意義がある。そこでこれらの比較検討のために、網羅的な遺伝子発現について検討して、シトシン・メチル化の解析への応用を検討した。

<細胞分化へ関与する分子機構の解明>

メチル化変動解析によって同定された領域に該当する転写因子の遺伝子座について、推定されたオルタナティブスプライシングについては RT-PCR により検証した。プラスミド強制発現系と RNA 干渉法による細胞分化に及ぼす影響を検討した。

< CpG メチル化変動の種保存性について >

マウス骨髄間質細胞やマウス滑膜由来細胞を利用してシトシン・メチル化を検討した。ヒトおよびマウスにおいて保存された遺伝子配列上における、軟骨細胞への分化誘導前後と、組織由来の異なる MSC におけるメチル化相違との関係について検討した。マウス正常胚における肢芽組織における遺伝子発現について比較検討した。

4. 研究成果

<メチル化変動の特異性についての検討>

これまでに我々が同定したメチル化変動が、軟骨細胞への分化時に特異的な変化であるか否かについて検討するため、間葉系幹細胞の脂肪細胞分化および骨芽細胞分化誘導時の SDF1 遺伝子上流におけるメチル化変化について、バイサルファイト・シーケンス法により検討した結果、これらの誘導系において明らかなメチル化変動は示されず、軟骨細胞分化時にみられたメチル化変動は誘導系特異的なものであった。

< SDF1 遺伝子上流領域におけるメチル化変

動の生物学的意義について>

これまでに同定してきたシトシン・メチル化変動領域としてSDF1およびNKX3.2遺伝子座について解析を進めた。SDF1遺伝子のメチル化変動領域については、滑膜由来MSCを用いてその変動領域は上流約1kbに限られることが示されたが、NKX3.2遺伝子座下流のメチル化変動域については、細胞間の再現性に乏しいことが判明した。SDF1遺伝子上流のメチル化変動領域の遺伝子発現に与える影響の検討として、本領域を含む2kbの配列一を最長とするSDF1遺伝子プロモーター領域を組み込んだレポーターコンストラクトによるルシフェラーゼアッセイをおこない、当該メチル化変動領域が、少なくとも未分化なMSCにおいてはサイレンサー領域として働くことを示した。シトシン・メチル化によってそのサイレンサー機能が打ち消されるという仮説を支持した。

<軟骨細胞分化過程におけるシトシン・メチル化の網羅的解析>

我々が従来採用してきたバイサルファイト・シーケンス法によるメチル化変動の比較では、限られた検体数と期間における解析には限界があった。そのため、イルミナ社のメチル化解析アレイを用いた約2万8千箇所のCpG部位におけるメチル化状況について、間葉系幹細胞の軟骨細胞分化過程における変化を追跡した。その結果、同一培養細胞の分化誘導時のシトシン・メチル化は極めて安定であり、明らかなメチル化変動を示す部位は非常に限られたものであることが示された。我々がこれまでに同定したメチル化変動領域のCpG部位はアレイによる解析部位に含まれなかったが、バイサルファイト・シーケンス法によるメチル化変動の追試結果は、多くの場合不明瞭であった。

<異なる組織に由来するMSCにおけるシトシン・メチル化の解析>

変形性関節症の再生医療的アプローチとして、患者由来の間葉系幹細胞を応用する試みは既に複数の機関で進められている。利用する細胞起源として骨髄、脂肪組織にくわえて関節滑膜組織は有効な供給源とされている。本研究においては、間葉系幹細胞の軟骨細胞分化能について、新たな視点から発現制御機構にアプローチするため、異なる部位から採取された間葉系幹細胞における遺伝子発現制御機構としてのシトシン・メチル化の程度について検討した。その結果として、骨系あるいは軟骨細胞分化に重要とされる転写因子遺伝子である、RUNX2, RUNX3, DLX5, ALX4 遺伝子の上流もしくは遺伝子内におけるシトシン・メチル化が由来細胞によって大きく異なる事実を見出した。これらの相違に

基づく遺伝子発現レベルの相違についても検討するため、網羅的な遺伝子発現解析を利用しながら解析した。この結果として、滑膜由来細胞と骨髄由来細胞との間に有意な発現相違を示す遺伝子は多数同定されたが、この知見と、網羅的なシトシン・メチル化解析との比較から、骨系細胞の分化制御に重要とされる複数の遺伝子についても、その発現レベルと遺伝子座におけるシトシン・メチル化レベルとの関連が示される事実を見出した。

<エピジェネティックな機構の普遍性の検証>

マウス骨髄間質細胞、滑膜由来細胞および半月板由来細胞における遺伝子発現の検討と、シトシン・メチル化について検討を行い、ヒトにおいて観察された遺伝子発現の相違と、メチル化相違の普遍性について、ヒトおよびマウスにおいて保存された遺伝子配列上にとくに注目して検証を行った。マウス正常胚における肢芽組織を用いた微量組織についても遺伝子発現の相違について比較検討した。しかしマウス間葉系幹細胞の分化誘導系を利用した、プラスミド強制発現系およびRNA干渉法による発現抑制の細胞分化へ及ぼす影響について検証は困難であった。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. Yoichi Ezura, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, Takuya Notomi, Ichiro Sekiya Takeshi Muneta, Masaki Noda. Identification of the Differentially Methylated Promoter and Intragenic CpG-Cytosines in the Human Synovium and Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (Poster Sessions). The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, California, USA, September, 2011.
2. Ezura Y, Hayata T, Nakamoto T, Notomi T, Muneta T, Sekiya I, Noda M. Identification of Signature Genes Selectively Expressed in Mesenchymal Stem Cells Derived from Synovial Joint Tissues (Poster Sessions). 2012 ASBMR annual meeting, Minneapolis, USA, Oct 12-15, 2012.
3. 江面陽一、早田匡芳、中元哲也、納富拓也、関矢一郎、宗田大、野田政樹。ヒト骨髄および滑膜由来間葉系細胞において

異なる CpG メチル化を示す遺伝子群の探索と骨軟骨細胞分化の制御に関わる転写因子群の抽出:RUNX2 および RUNX3, DLX5, ALX4 遺伝子。第 30 回日本骨代謝学会、東京、2012 年 7 月 19-21 日(ポスター発表)。

〔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〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

関矢 一郎 (SEKIYA ICHIRO)

東京医科歯科大学大学院 歯学研究所 歯内科学科・教授

研究者番号: 10345291