

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593020

研究課題名(和文) 歯髄由来細胞の多能性を誘導するリプログラミング因子に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Study on mechanisms for reprogramming factors inducing pluripotency

研究代表者

野崎 中成 (NOZAKI, Tadashige)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90281683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：多能性を誘導するリプログラミング因子へのポリ(ADP-リボース)代謝の関与を調べた。ポリ(ADP-リボース)代謝は、ポリADP-リボースの合成系と分解系から成る。合成系を担うParp1と分解系を担うPargのホモ欠損マウス細胞を用いて、miRNAによるリプログラミングへのParp1およびParg欠損の効果を調べた。Parp1欠損およびParg欠損細胞において、リプログラミングに関わる遺伝子の発現を調べた。リプログラミングにポリ(ADP-リボース)代謝が関与することを示すと共に、Parp1とPargの発現バランスがリプログラミング因子の発現にどのように影響するか検討した。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the association of poly (ADP-ribose) metabolism on reprogramming, we examined gene or miRNA expressions comprehensively under the deficiency of Parp1 and Parg. From our earlier study, we ascertained that the expression of reprogramming markers increased after conversion to different lineage cells in dental pulp cells, suggesting that those levels are key events on the reprogramming processes. It is particularly interesting that the level of reprogramming markers was lower in Parp1-deficient embryonic stem cells than in wild type cells. Moreover, differential expression of miRNA associated with reprogramming factors was detected in Parg-deficient embryonic stem cells. Consequently, this study investigated mechanisms for reprogramming factors associated with poly (ADP-ribose) metabolism.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医学 再生医療 歯科 多能性 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

分化ポテンシャルの高い細胞を利用して、生体組織、臓器を再生する治療法が試みられている。これら多能性細胞を用いた再生医療は移植に代わる治療法として社会的なニーズがある。多能性細胞のソースは様々な組織の体細胞に求められている。骨髄には多能性幹細胞が存在し、体細胞よりも分化能の高い幹細胞の増殖や分化に関する研究が行われている。研究代表者らは、歯髄由来細胞にリプログラミング因子 *Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* が発現していることを報告し、骨髄幹細胞を種々の細胞系譜へ分化誘導する系を歯髄由来細胞に適用することで研究を展開してきた。*Oct3/4*, *Sox2* の発現は分化誘導により低下することから、分化度の指標になることを示した。また、歯髄由来細胞から系譜の異なる細胞へ分化誘導できることを報告した。脱メチル化剤である 5-Aza-2'-deoxy-cytidine 処理により分化を観察し、エピジェネティクス (DNA 塩基配列の変化なしに後天的にクロマチンを修飾し遺伝子発現を調節すること) による発現調節がリプログラミングの重要な因子であることを示した。

研究代表者らは、ジーンターゲットングによりポリ (ADP リボース) 合成酵素 (Parp1) を欠損したマウスおよび細胞を作製し、連携研究者は、これを維持、管理している。Parp1 は DNA メチル化の制御やヒストンアセチル化に働き、オープンクロマチン構造変換により、ゲノムワイドに転写を制御する。すなわち、Parp1 はエピジェネティクス、細胞分化、リプログラミングやクロマチンリモデリングなど多彩な機能を担っている。研究代表者らは、これまでに Parp1 欠損によりゲノムワイドに現れる遺伝子発現変化を網羅的に解析した。これら研究経緯は、本研究課題の着想に至る研究成果として位置づけられる。

2. 研究の目的

リプログラミング (脱分化・分化転換など) を促進する因子を明らかにするため、研究代表者らが作製した遺伝子改変マウスの細胞を用い、多能性を誘導するリプログラミングへのポリ (ADP リボース) 代謝の関与を調べる。本研究を通じて、再生医療へ発展させるための一翼を担う基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

< 内在性リプログラミング因子の解析 >

(1) 内在性リプログラミング因子の発現を調べる。ラット歯髄由来細胞に内胚葉へ分化転換を誘導し、内在性リプログラミング因子の発現変動を調べる。Parp1 ホモ欠損型 (Parp1^{-/-}) と野生型 (Parp1^{+/+}) マウスの細胞から RNA を調製し、発現を解析する。Parp1 遺伝子型による内在性リプログラミング因子の発現を比較する。

(2) リプログラミング効率の解析系を構築し、Parp1 遺伝子型によるリプログラミング効率を評価する。多能性を誘導するリプログラミングにおいて、Parp1 の効果を調べるため、研究代表者らが作製した Parp1 ホモ欠損型と野生型マウスの胎児由来線維芽細胞を用いる。

(3) Parp1 ホモ欠損型と野生型のマウス ES 細胞株を用い、アレイ解析を行ったデータの詳細な分析を行う。Parp1 遺伝子型による内在性リプログラミング因子の発現を比較する。

< microRNA による制御に関する解析 >

(4) Parp1 ホモ欠損型と野生型のマウス ES 細胞株から RNA を調製し、miRNA アレイを用いて、microRNA の網羅的発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) 内在性リプログラミング因子の発現を調べた。ラット歯髄由来細胞を内胚葉へ分化誘導し、内在性リプログラミング因子の発現変動を調べた。分化誘導 10 日後に、*Oct4*, *Nanog* の発現上昇が認められた。異なる系譜細胞へ分化転換する系において内在性リプログラミング因子の発現は誘導されることが示唆された (図 1)。

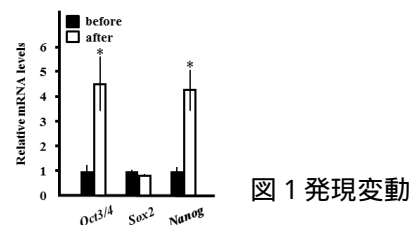


図 1 発現変動

Parp1 遺伝子型による内在性リプログラミング因子の発現を調べた。Parp1 ホモ欠損型株 (210-58) と野生型株 (J1) において *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* の発現を調べた。各 5 サンプルを用いて、定量的発現解析を行った平均値を示す。Parp1 ホモ欠損型株における *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* の発現は、野生型に比べて各々 0.54, 0.89, 0.96 倍であった (図 2)。

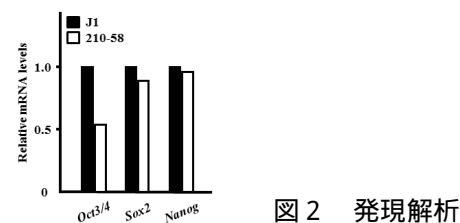


図 2 発現解析

(2) リプログラミング効率の解析系を構築した。miRNA-302bcad/367 のクラスターを含むプラスミドを E.coli ZYCY10P3S2T 株でクローン化した。Arabinose を添加し、C31 インテグラーゼを介した分子内組換えを誘導して、miRNA-302bcad/367 のク

スターを発現する非ウイルス性のリプログラミングミニサークル DNA ベクターを調製した。この発現ベクターを電気穿孔法とカチオン脂質導入法を組み合わせることでマウス由来細胞に導入し、GFP の発現を指標にリプログラミングの誘導を試みた。導入 4 週間後に、ES 細胞様のコロニーを形成した (図 3)。GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察すると、形成したコロニーでは GFP の発現が減少した。ミニサークルの発現ベクターは宿主細胞のゲノムに組み込まれないため、細胞分裂により GFP 発現が徐々に減衰すると考えられた。

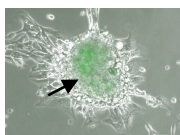


図 3 多能性細胞の誘導
矢印は GFP の発現を示す。

リプログラミング効率の解析系を用いて、Parp1 遺伝子型による効果を調べた。Parp1 ホモ欠損型と野生型の胎児由来線維芽細胞に、ミニサークルの発現ベクターを導入し、リプログラミングを誘導した。導入後、生育するコロニー数を計測した Parp1 ホモ欠損型クローン株 (#2-2, #3-2) は、野生型クローン株 (#7-2) と比較してコロニー数が減少していた (図 4)。

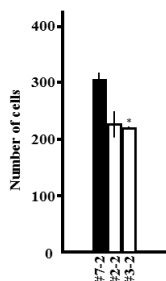


図 4 Parp1 遺伝子型による
リプログラミング効率
各 9~10 サンプルの平均値
を示す (error bars ; 標準誤
差、* $p < 0.05$)

(3) ポリ(ADP リボース)代謝は、ポリ ADP リボースの合成系と分解系から成る。合成系を担う Parp1 は、Oct3/4 と Sox2 を制御する。また、Parp1 は、Sox2 と複合体を形成して多能性を制御している。体細胞のリプログラミングの初期に、多能性遺伝子座にある Nanog と Esrrb の転写が誘導されるが、その際にエピジェネティクス修飾因子である Parp1 と Tet2 がその遺伝子座へ働く。すなわち、ヒストンを修飾することでクロマチンを活性化し、多能性遺伝子座領域にある遺伝子の転写を誘導できる。Parp1 が担う翻訳後修飾であるポリ ADP-リボシル化は、クロマチン再構築とエピジェネティクス修飾を介して、リプログラミングを制御する可能性がある。内在性リプログラミング因子の発現は、Parp1 遺伝子型により影響を受けるかを調べるため、Parp1 ホモ欠損型と野生型のマウス ES 細胞株を用いたアレイ解析の詳細な分析を行った。Parp1 ホモ欠損型の 2 クローン株 (210-58, 226-47) と Parp1 野生型株 (J1) の ES 細胞株は、研究代表者らが作製したものをを用いた。各クローンに対して 3 つの independent なアレイ解析を行い、平均を算

出し、Parp1 ホモ欠損型と野生型を比較した。Parp1 ホモ欠損型で Oct3/4 の発現は、210-58 と 226-47 で各々、1.4 倍、1.3 倍に上昇した。Sox2 の発現は、210-58 と 226-47 で各々、0.86 倍、0.67 倍に減少した。この解析から、Parp1 遺伝子型は多能性細胞のポテンシャルに影響する可能性が示唆された。

(4) Parp1 遺伝子型のみならず、分解系を担う Parg 遺伝子型は、ポリ ADP-リボシル化のターゲットとなるリプログラム因子に対して影響する可能性があり、Parg 遺伝子型について解析を進めた。リプログラミング解析系で示したように、microRNA を細胞に導入することで、リプログラミングを誘導できるため、リプログラミング因子として microRNA の関与が示唆されている。また、microRNA 結合タンパク質である Ago はポリ ADP-リボシル化により翻訳後修飾される。これらの事実は、リプログラミング過程において microRNA を介した遺伝子発現の制御に、ポリ(ADP リボース)代謝が関与することが示唆される。ポリ(ADP リボース)代謝における microRNA による制御を調べるため、研究代表者らが作製した Parg ホモ欠損型のマウス ES 細胞株 (D122) と野生型のマウス ES 細胞株 (J1) を用いた。RNA を調製し、アレイを用いて、microRNA の網羅的発現解析を行った。

LIF 存在下、野生型と比較して Parg ホモ欠損型で 2 倍以上に発現増加していたのは、多能性誘導に関与する miR-294, miR-295 などを含む 15 個であった。一方、同様に 0.5 倍以下に発現低下していたのは、DNA メチル化調節に関わる miR-370 などを含む 14 個であった。ポリ(ADP リボース)代謝は、microRNA 発現制御を介して、多能性と広範なメチル化パターンの維持に関与することが示唆された。

miRNA がターゲットとする遺伝子のデータベース解析を行った。LIF 存在下、野生型の発現と比較して Parg ホモ欠損型で 2 倍以上に発現増加していた 15 個の miRNA が共通してターゲットとしている遺伝子は 44 個であった。一方、LIF 存在下、野生型の発現と比較して Parg ホモ欠損型で 0.5 倍以下に発現低下していた 14 個の miRNA が共通してターゲットとしている遺伝子は、95 個であった。miRNA の発現が低下している 95 個のうち、2 個以上の miRNA がターゲットとしている遺伝子 25 個中、リプログラミング因子を抽出したところ Lin28, Dicer1, Pou5f1, Stat3 などがあった。これらの遺伝子は発現が上昇している可能性があった。Parg 遺伝子型により miRNA による制御を介して、多能性を誘導するリプログラミング因子に影響する可能性が示唆された。

以上の研究成果から、ポリ(ADP リボース)代謝を担う Parp1 と Parg の発現バランスを調節することでリプログラミングをコン

トロールできる可能性が示唆された。現在、NAD⁺の酵素活性部位を競合的に拮抗する Parp1 阻害薬が開発されている。それら新規化合物は低濃度で特異性に優れ、ヒトに *in vivo* で適用することができ、一部の化合物は治療薬として臨床試験の段階にある。一方、Parp1 賦活薬や Parg 阻害薬の開発が期待されている。それらの化合物を組み合わせることで、ポリ(ADP リボース)代謝を調節し、リプログラミングを制御できる可能性がある。

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3件)

Nozaki T, Ohura K. Regulation of miRNA during direct reprogramming of dental pulp cells to insulin-producing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読有, 444, 2014, 195-198.
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.01.030

Nozaki T, Ohura K. Micro RNA-mediated mechanism for direct conversion of dental pulp cells to endocrine lineage cells. *FEBS Journal*. 査読有, 281, 2014, 230-231.
DOI: 10.1111/febs.12919

Nozaki T, Fujimori H, Wang J, Suzuki H, Imai H, Watanabe M, Ohura K, Masutani M. Parp-1 deficiency in ES cells promotes invasive and metastatic lesions accompanying induction of trophoblast giant cells during tumorigenesis in uterine environment. *Pathology International* 査読有, 63(8), 2013, 408-414.
DOI:10.1111/pin.12086

[学会発表](計5件)

Nozaki T, Ohura K. Micro RNA-mediated mechanism for direct conversion of dental pulp cells to endocrine lineage cells. *FEBS EMBO 2014 Conference* 2014年8月31日 Paris (France)

岸 悠太、藤原久子、野崎中成、里村一人、藤森浩彰、濱田良樹、益谷美都子。骨芽細胞への分化時におけるポリ(ADP リボース)合成酵素(PARP)の関与。第32回分子病理学研究会・吉野シンポジウム 2013年7月20日 竹林院群芳園(奈良県・吉野郡吉野町)

益谷美都子、野崎中成、荻野秀樹、藤森浩彰、藤原久子、大浦 清。異所性骨形成誘導のモデルマウスを用いた解析。第12回日本再生医療学会総会 2013年3月21日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Nozaki T, Fujimori H, Suzuki H, Watanabe M, Ohura K, Masutani M. Effect of Parp-1 deficiency on trophoblast differentiation of ES cells after injection into the uterus. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月14日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

Nozaki T, Fujimori H, Suzuki H, Watanabe M, Ohura K, Masutani M. Parp-1 deficiency in ES cells induces trophoblast giant cells, tumor growth reduction, and metastatic lesions during teratocarcinoma formation after injection into the uterus. the 4th EMBO Meeting 2012年9月25日 Nice (France)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野崎 中成 (NOZAKI, Tadashige)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：90281683

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

益谷 美都子 (MASUTANI, Mitsuko)
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・生命医科学講座フロンティア生命科学分野・教授
研究者番号：60238904