

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861676

研究課題名(和文) CD10 化学シグナルと Rho 力学シグナルによる脂肪幹細胞の多能性維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of maintenance mechanisms of multi-potency in adipose-derived stem cells by CD10-dependent chemical signal and Rho-dependent mechanical signal

研究代表者

青柳 靖之 (Aoyagi, Yasuyuki)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：30569562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：脂肪幹細胞、脂肪前駆細胞においてshRNA導入によるCD10ノックダウン(KD)システムを確立し、CD10の機能解析を行った。CD10のKDによりエズリン、モエシンの発現が低下し、さらに脂肪分化能が低下した。エズリンは脂肪前駆細胞で脂肪幹細胞よりも発現量が多く、脂肪分化能に関与している可能性が示唆された。一方、スフェロイド形成による力学的環境変化によりRhoA mRNA、エズリンmRNA量の減少を認めた。このことから力学的シグナルとCD10シグナルがエズリンという分子を介してクロストークし、脂肪幹細胞の機能を調節している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Functional analysis of CD10 was performed by lentiviral vector-mediated shRNA knock-down (KD) in adipose-derived stem cells (ASC) and progenitor cells (ccdPA). Among ERM proteins (Ezrin Radixin, and Moesin), Ezrin and Moesin were decreased in the CD10-knocked down cells where amount of CD10 was decreased to less than 10% of untreated control. In the cells, ability for adipogenic differentiation was reduced. Higher amount of Ezrin in ccdPA compared with ASC suggests that Ezrin is involved in adipogenic differentiation of those adipose-derived cells. mRNAs of RhoA and Ezrin were decreased in mechanical environmental change by short-term spheroid culture. These results suggest that activation and/or differentiation in ASC and ccdPA are regulated by cross-talk between mechanical environmental signal and CD10 signal through Ezrin.

研究分野：再生医学

キーワード：脂肪細胞 CD10 エズリン モエシン

1. 研究開始当初の背景

幹前駆細胞を用いた移植再生医療には、多能性維持と移植後の周辺細胞との相互作用による組織再構築に基づいて評価することが治療効果と安全性の両面から求められる。これまで脂肪幹細胞 (ASC) の移植治療への基礎・臨床研究において幹細胞の表面抗原マーカーとして用いられているにも関わらず、多能性維持や機能に関する解析がほとんど行われていない分子がある。その機能の解明はより優れた、もしくは対象疾患・治療指向的な特化型幹前駆細胞の選択に寄与する。ASC は移植組織の再構築において組織の構成細胞となり、多様なサイトカインの分泌を介して、免疫寛容性、アポトーシスの抑制、血管新生、組織前駆細胞の増殖などの多面的な治療効果を発揮し、事実、ASC の存在が移植生着に大きく寄与する。このように疾患に応じた前駆細胞との混合移植がさらなる再生医療の向上を可能とする。

これまで皮下脂肪細胞の *in vitro* 培養とレトロウイルスベクターによる治療用遺伝子導入を組み合わせた遺伝子導入脂肪細胞移植治療法の開発研究をしてきた (TOGTJ, 2011; MGM, 2011; JDI, 2011)。この天井培養法により成熟脂肪細胞の比重特性を利用して得られた前駆脂肪細胞 (ceiling culture-derived proliferative adipocyte, ccdPA) は油滴を持つ脂肪細胞からの純培養であることから、ASC よりもより純度の高い均一な細胞である。これまで、同一ドナーより ccdPA と ASC を獲得し、その分化特性について以下の報告をした (AJP, 2011; ECR, 2012)。本細胞の培養法樹立・特性解析成果により ccdPA をレファレンス細胞とした ASC の多能性の詳細な解析が可能となった。

1. ASC と ccdPA は脂肪細胞への分化刺激に対する応答性が異なる。
2. ASC と ccdPA は骨分化、軟骨分化刺激に同等の反応性を示す。
3. ccdPA は三次元培養で自発的に脂肪細胞に分化する。
4. ccdPA は三次元培養においてレプチン等の脂肪細胞由来の生理的蛋白を分泌する。
5. 細胞外マトリックス濃度が脂肪細胞への

分化を制御する。

以上のことから、2 つの細胞特性を比較評価することで対象疾患、治療目的、安全性に即し、最適な移植治療用細胞を選択・加工することが可能となる。

接着細胞は周囲のマトリックス環境による外部刺激、細胞内部のアクチン細胞骨格による力学的バランスの中で細胞機能を制御する (メカニカルトランスダクション理論)。これに加え組織内の液性因子による多様なシグナルは、細胞内の様々な生理学的シグナルへと変換され増殖、分化、細胞死などに関与する。これが脂肪、骨、筋肉、軟骨などの結合組織の再構築時の間葉系幹細胞の導入、増殖と分化誘導に重要な役割を果たす。

そこで脂肪組織由来の幹前駆脂肪細胞においてほとんど機能解析のなされていない膜貫通シグナル伝達タンパクの一つ CD10 に着目する。再生医療研究の最も重要な課題の一つは、培養された幹前駆細胞の分化特性の維持である。CD10 は乳腺の発達過程に関与する分子であり、CD10 によるソーティングにより、sphere 形成能が高まることが知られている。sphere 形成により細胞には力学的変化が起こり、この変化は Rho 蛋白/Rho キナーゼシグナルに変換され、このシグナルが脂肪、骨芽細胞分化の分岐を決定する (力学的シグナル伝達)。脂肪細胞、骨芽細胞への分化誘導を惹起するデキサメサゾン、Rho キナーゼの下流、モエシンの発現を抑制する。Rho キナーゼ阻害剤は、iPS、ES 細胞の保存性、培養技術を向上させる。

CD10 は膜貫通型プロテアーゼであり、細胞外の生理活性物質の分解に伴い、細胞内へのシグナル伝達 (化学的シグナル伝達) を行う。さらにエズリン/ラディキシン/モエシン (ERM) ファミリーと結合し、CD44 による走化性機能を修飾する。ERM は細胞膜 (脂質、膜蛋白) とアクチンフィラメントとのクロスリンカーとしてシグナル伝達に関与する。上皮細胞でエズリン、肝細胞でラディキシン、内皮細胞でモエシンが有意に発現するが、T 細胞による抗原提示細胞認識にも関与し、その多様な機能は発現組織特異性だけでは説明できない。これらの報告から、CD10 は幹細

胞の多能性維持のみならず、周辺に存在する脂肪細胞、内皮細胞からのシグナルによる幹細胞ニッチの活性化機構に寄与することが示唆される。

## 2. 研究の目的

CD10 のタンパク分解活性に基づく化学的シグナル伝達と Rho 蛋白/Rho キナーゼによる力学的シグナル伝達の両面から、ASC、ccdPA における分化性能の維持・活性化機構を解明する。同時に両方のシグナル伝達に参与する ERM 蛋白群の機能解析を実施し、さらに、ASC、ccdPA の特性を修飾しうる ERM 関連蛋白を同定する。これにより、脂肪組織由来幹前駆細胞を用いた再生移植治療の次世代化の技術基盤を確立する。

## 3. 研究の方法

CD10 からの化学的シグナルと細胞環境からの力学的シグナルがどのように ASC、ccdPA 機能を修飾するのかを解析・評価した。

そのために CD10 の発現抑制するノックダウンシステムを構築した。さらに CD10 による細胞外タンパクの分解に基づくシグナル伝達を阻害する目的で膜貫通ドメイン欠失型 CD10 を作製した。スフェロイド形成により力学的刺激を与える実験を行い関連タンパクの発現、分化能の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)CD10-Knock Down (KD)細胞の作製

CD10 の ASC、ccdPA における機能解析を行うため、レンチウイルスベクターによる shRNA 導入系を確立することとした。6 つのデザインされた shRNA 配列と puromycin 耐性遺伝子を搭載するレンチウイルス (LV) ベクターを作製し、ASC に遺伝子導入した。CD10mRNA 発現をリアルタイム PCR (図 1)、CD10 産生量をフローサイトメトリー(図 2)、ウェスタンブロッティング (図 3) で評価したところ 1 種類の shRNA が効率よく CD10 の発現を抑制することが分かった。

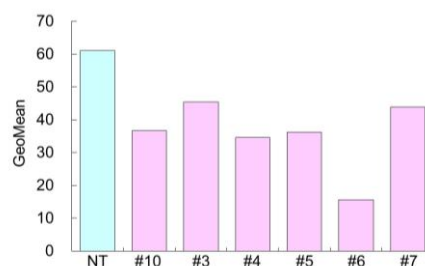


図 1. shRNA 遺伝子導入した ASC の CD10mRNA 発現

Non Target と 6 種類の CD10shRNA 遺伝子を導入した細胞、コントロールとして遺伝子非導入細胞の CD10mRNA 発現 Real-time PCR によりを定量した。内在性コントロールとして 18s RNA を用いた。

(-)、遺伝子非導入細胞; NT, Non Target shRNA 導入細胞; #10, 3, 4, 5, 6, 7, CD10shRNA 導入細胞

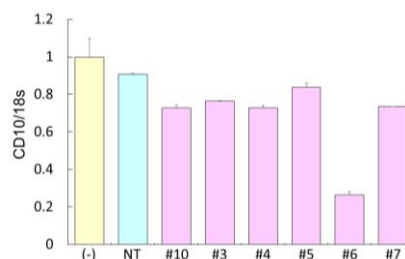


図 2. shRNA 遺伝子導入した ASC の CD10 発現 Non Target と 6 種類の CD10shRNA 遺伝子を導入した細胞について CD10 のフローサイトメトリー解析を行った。

NT, Non Target shRNA 導入細胞; #10, 3, 4, 5, 6, 7, CD10shRNA 導入細胞

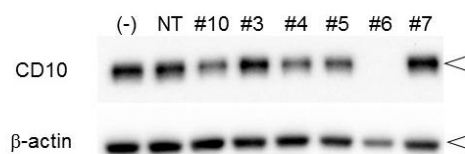


図 3. shRNA 遺伝子導入した ASC の CD10 発現 Non Target と 6 種類の CD10shRNA 遺伝子を導入した細胞、コントロールとして遺伝子非導入細胞から Lysate を調製し、ウェスタンブロットにより CD10 を検出した。

(-)、遺伝子非導入細胞; NT, Non Target shRNA 導入細胞; #10, 3, 4, 5, 6, 7, CD10shRNA 導入細胞

### (2)CD10KD におけるエズリン/ラディキシン/モエシン (ERM) の発現

ASC、ccdPA についてエズリン/ラディキシン/モエシン (ERM) の発現を解析したところ、

エズリンは ASC よりも ccdPA で発現が高い傾向があり、CD10 を KD することで少なくともエズリン、モエシンの遺伝子発現が変化を受けることが分かった (図 4, 5)。

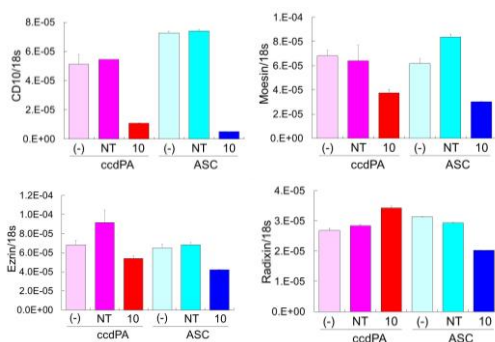


図 4. CD10 KD-ccdPA, ASC の ERM mRNA 発現  
Non Target と CD10shRNA 遺伝子を導入した細胞、コントロールとして遺伝子非導入細胞の CD10mRNA 発現 Real-time PCR によりを定量した。内在性コントロールとして 18s RNA を用いた。

(-), 遺伝子非導入細胞; NT, Non Target shRNA 導入細胞; 10, CD10shRNA 導入細胞

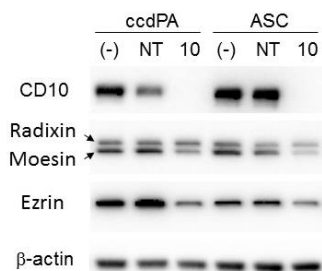


図 5. CD10 KD-ccdPA, ASC の ERM 発現  
Non Target と CD10shRNA 遺伝子を導入した細胞、コントロールとして遺伝子非導入細胞から Lysate を調製し、ウェスタンブロットにより検出した。

(-), 遺伝子非導入細胞; NT, Non Target shRNA 導入細胞; 10, CD10shRNA 導入細胞

また、CD10 の KD された ASC、ccdPA では、脂肪分化能が低下しており (図 6)、CD10 が脂肪分化において重要な役割を果たす可能性が示唆された。また ASC、ccdPA 共に CD10 の KD により検討した範囲では増殖能にあまり影響を受けなかったことから CD10 そのものは細胞の増殖に関与しないと考えられた。

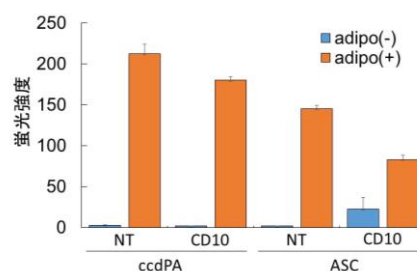


図 6. CD10 KD-ccdPA の脂肪分化  
adipo(-), 分化誘導なし; adipo(+); 分化誘導あり;  
(-), 遺伝子非導入細胞; NT, Non Target shRNA 導入細胞; CD10, CD10shRNA 導入細胞

超低接着培養器を用いたスフェロイド形成による細胞テンションの変化における RhoA、Rock1、ERM、脂肪分化マーカーの mRNA 発現について研究期間終了後引き続き検討したところ、スフェロイド培養初期に RhoA mRNA、エズリン mRNA の減少が認められた。その後の長期培養では大きな差は観察されなかった。

以上のことから、通常接着して増殖する ASC、ccdPA を浮遊状態で培養することによる力学的シグナルの変化によりこれらの細胞において、RhoA とエズリンによる機能変化が生じている可能性が示唆された。今後この現象を検証するため、スフェロイド形成以外の三次元培養による別の力学的シグナルにおける機能解析の必要性が考えられた。

CD10 発現量の変化はモエシン、エズリンの発現に影響を与えた。このことは CD10 による何らかの感知機構が外的刺激となり幹細胞の活性化機構の発現に関与している可能性を示唆する。十分な検証が必要であるが、ASC において、力学的シグナルと CD10 からのシグナルがエズリンを介してクロストークしている可能性も示唆された。

### (3) CD10 および膜貫通ドメイン欠失型 CD10 発現細胞の作製

本研究は CD10 の機能解明を目的としてノックダウンシステムを用いた解析を主に行ってきた。それと並行して CD10 発現 LV ベクターの構築および既報を基に膜貫通ドメインを欠失したコンストラクトの構築を行った。同時に C 末端側に His-Tag を付加したコンストラクトの構築も行った。作製した LV

ベクターにて ASC に遺伝子導入を行い、細胞抽出液にてそれぞれのタンパク発現する細胞を獲得した (図 7)。

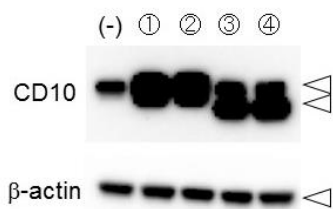


図 7. CD10 および膜貫通ドメイン欠失型 CD10 遺伝子導入 ASC の CD10 発現

遺伝子非導入細胞、CD10 および膜貫通ドメイン欠失型 CD10 遺伝子導入細胞から Lysate を調製し、ウェスタンブロットにより検出した。

(-), 遺伝子非導入細胞; ①, CD10 導入; ②, CD10-His 導入; ③, 欠失型 CD10 導入; ④, 欠失型 CD10-His 導入

膜貫通ドメイン欠失型 CD10 の細胞外分泌が確認され (図 8)、培養上清中に活性が検出された。

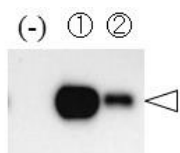


図 8. 膜貫通ドメイン欠失型 CD10 遺伝子導入 ASC 培養上清の CD10 発現

遺伝子非導入細胞および膜貫通ドメイン欠失型 CD10 遺伝子導入細胞の培養上清を用いて免疫沈降ウェスタンブロットにより検出した。

(-), 遺伝子非導入細胞; ①, 欠失型 CD10 導入; ②, 欠失型 CD10-His 導入

この分泌型 CD10 は細胞内へのシグナル伝達を起こさないため、CD10 による外的刺激の感知機構の解明に重要なコンストラクトであると考えられる。

よってこのようなコンストラクトを用いて本研究で観察された脂肪分化能の変化、幹細胞活性化に、自身の基質の分解活性によるシグナル伝達、もしくは CD10 のタンパク量の変化のいずれが重要なかを検証することが可能であると考えられた。

追加検討が必要であるが、CD10 量の減少が幹細胞の走化性に関与するタンパクの発現を抑制していることを示唆する結果が得られており、また CD10 の基質を培養上清に添加することによっても同様の現象が観察さ

れている。以上のことから、幹細胞 niche における活性化に CD10 が関与する可能性について上記コンストラクトを用いて引き続き検証を進めている (論文執筆中)。

## 5. 主な発表論文等 特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青柳 靖之 (AOYAGI, Yasuyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号: 30569562