

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861491

研究課題名(和文)ADSCの骨芽細胞分化促進におけるエピジェネティクス修飾機構の研究

研究課題名(英文)Study of the epigenetics mechanism in the osteoblastic differentiation promotion of ADSC

研究代表者

笹原 資太郎(SASAHARA, Yoshitaro)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70400950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクス調節はDNA配列変化を伴わない、遺伝子発現制御機構である。幹細胞がより高分化する際には、エピジェネティクス調節により発言できない遺伝子領域が増え、分化した成熟細胞へと変化する。SVFおよびccdPAsにおいてエピジェネティクス解析を行った。CpGアイランドにおけるメチル化配列において、RUNX2, OPN, COL1, DLX5においては優位差を認めなかったが、ATF4およびBNP2において優位差を認めた。これに対し、ccdPAsではRUNX2発現やOPN分泌が高値であった。このことから、ATF4の影響下の結果、RUNX2の発現やOPN分泌が促進すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Epigenetics is a gene expression control structure without the DNA sequence change. When a stem cell becomes high interest more, the gene domains that cannot speak by epigenetics adjustment increase and change to the mature cell which differentiated. I performed epigenetics analysis in SVF and ccdPAs. In the methylation sequence in the CpG island, I did not recognize a dominant difference in RUNX2, OPN, COL1, DLX5, but recognized a dominant difference in ATF4 and BNP2. In contrast, RUNX2 expression and OPN secretion were high prices in ccdPAs. From this, it was thought that result under the influence of ATF4, expression and OPN secretion of RUNX2 promoted it.

研究分野：形成外科

キーワード：天井培養由来脂肪幹細胞 脂肪幹細胞 骨分化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織由来幹細胞 (ASCs) は骨髄間葉系幹細胞と同様の多分化能があり、脂肪組織は骨髄に代替した幹細胞の供給源となりうる (Zuk, 2001)。また、脂肪組織は我々形成外科手術の際に余剰組織として、採取することが容易であり、骨髄採取と比較して、侵襲も少なく、患者にとって最適な幹細胞の供給源と考えられる。加え、浅田によると、天井培養由来増殖性脂肪細胞: Ceiling culture derived proliferative adipocyte (ccdPAs) は、ASCs に比べて、高い脂肪分化能を持つことが報告されている (2011)。そのため、ccdPAs は、ASCs に換わる再生医療材料として期待がかかる。

しかし、ASCs の高い骨分化能においては、報告されてるが (Kakudo, 2008)、ccdPAs の骨分化能についての報告はない。

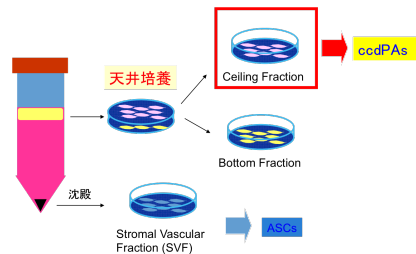
2. 研究の目的

ccdPAs の高い骨分化能が証明されれば、脂肪分化能と同様に、臨床の場において、有用性の高い再生医療材料となることが示唆される。そのために、さまざまな方法を用いて、ccdPAs の骨分化について証明し、ASCs との違いを検討する。

3. 研究の方法

千葉大学倫理規定に従い、同意を得た患者の腹部 (乳房再建時の使用する腹部皮弁の余剰脂肪) から、脂肪細胞を採取する。ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM) に 20% 濃度の胎仔牛血清 (fetal bovine serum: FBS) および 40 μ g/mL ゲンタマイシン (gentamicin) を添加したものを基本培地とした。採取した脂肪細胞は PBS (phosphate buffered saline) にて十分に洗浄し、血管や結合組織などを除去後、コラゲナーゼ処理を行った後、400 \times g 1 分間遠心分離し、その浮遊物を 1 週間天井培養する。これにより得た細胞群を ccdPAs として扱う。遠心分離後の沈殿物 SVF (stromal

vascular fraction) を、通常培養したものを、ASCs として扱う。

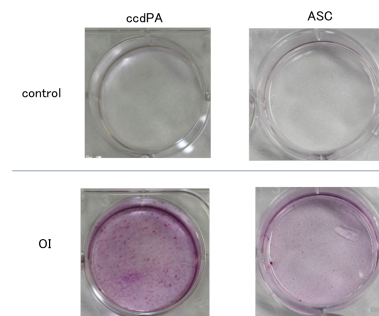


基本培地に 10mM β -glycerophosphate、50mg ascorbate、0.1mM dexamethasone を添加したものを骨分化培地とした。我々は、上記の 3 種野薬剤のいずれが欠けても骨分化しにくいことも証明している。(2014)

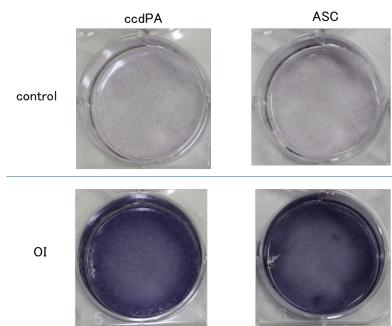
ccdPAs を ASCs とともに、骨分化培地にて骨分化誘導する。2 週間後に control 群と OI (骨分化) 群とに分け、それぞれ染色や RT-PCR、蛋白活性や、DNA のメチル化を示すエピジェネティクス解析などを行った。すべての研究はヘルシンキ宣言に遵守した。

4. 研究成果

平成 26 年、我々は ccdPAs が骨芽細胞にも分化することを報告した。ccdPAs と ASCs を骨分化誘導し、骨形成した細胞のマーカーであるアルカリホスファターゼ染色 (ALP stain) を行い、以下のように ccdPAs での骨分化が証明された。

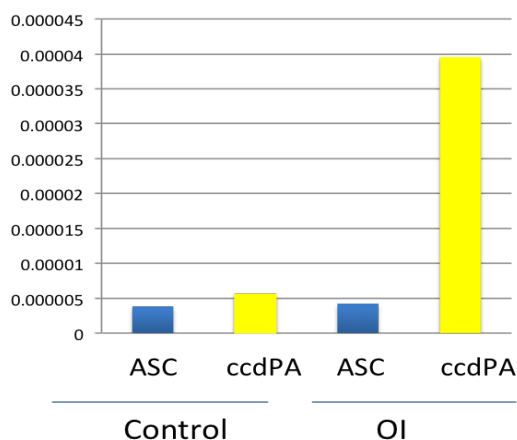


石灰化を表す、アリザリン染色 (AK stain) を行い、以下のように、石灰化が証明された。



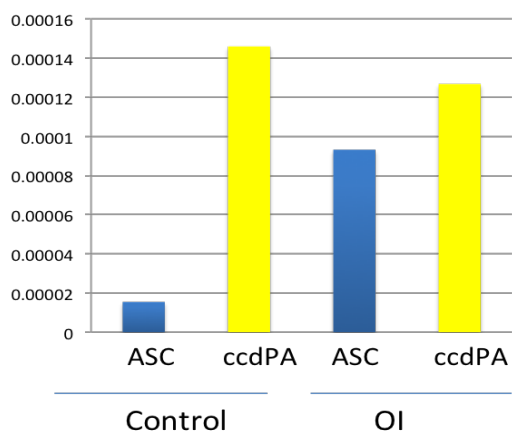
ccdPAs は骨分化のマスターレギュレーターである RUNX2 遺伝子発現が ASCs と比べて有意に高いため、幹細胞としての潜在能力が高いことが示唆された。

m-RNA RUNX2



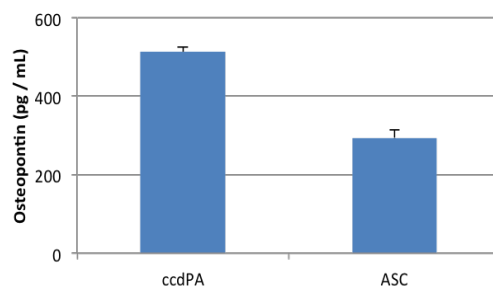
また、骨の主要な細胞外マトリックスであるコラーゲン I の産生も ccdPAs において ASCs と比べて優位差をもって高いことがわかった。

m-RNA COL1



骨形成に関連した分泌の中では

osteopontin の分泌が ccdPAs で ASCs と比べて有意に高値であった。



以上より、ccdPAs は骨分化することが証明され、ASCs よりも骨分化し易いことがわかった。では、なぜ ccdPAs は ASCs より骨分化しやすいのか。それを明らかにするために、近年細胞分化の規定因子として注目されているエピジェネティック修飾に注目し、平成 27 年報告した。

CpG island の DNA メチル化は主要なエピジェネティック修飾のひとつであり、メチル化率が高くなるほどその遺伝子は発現しにくくなる特徴がある。意外なことに骨分化のマスターレギュレーターである RUNX2 遺伝子のメチル化率は ASCs と ccdPAs で有意な差を認めなかった。

Epigenetics Analysis : RUNX2

Probe ID	Map info.	Gene	mean β value		sd (\pm)		p value
			ADSC	sd (\pm)	ccdPAs	sd (\pm)	
cg00631702	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.023	\pm 0.009	0.023	\pm 0.009	0.392
cg03465891	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.068	\pm 0.013	0.078	\pm 0.004	0.458
cg03759918	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.061	\pm 0.004	0.070	\pm 0.006	0.324
cg04074487	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.056	\pm 0.009	0.064	\pm 0.003	0.434
cg05112389	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.120	\pm 0.007	0.128	\pm 0.008	0.104
cg06769739	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.011	\pm 0.004	0.010	\pm 0.007	0.249
cg09534461	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.036	\pm 0.002	0.041	\pm 0.017	0.365
cg10923244	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.035	\pm 0.003	0.045	\pm 0.007	0.088
cg1115967	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.010	\pm 0.004	0.010	\pm 0.007	0.286
cg11806749	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.037	\pm 0.004	0.044	\pm 0.004	0.144
cg13727613	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.015	\pm 0.005	0.017	\pm 0.003	0.409
cg1391849	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.013	\pm 0.007	0.011	\pm 0.006	0.188
cg14047339	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.213	\pm 0.012	0.319	\pm 0.007	0.123
cg14447047	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.015	\pm 0.000	0.016	\pm 0.004	0.322
cg17115147	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.020	\pm 0.002	0.022	\pm 0.004	0.480
cg18037825	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.259	\pm 0.017	0.277	\pm 0.006	0.204
cg19207006	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.015	\pm 0.002	0.019	\pm 0.004	0.120
cg19491151	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.025	\pm 0.001	0.029	\pm 0.006	0.278
cg19569551	chr6:45346195-45346201	RUNX2	0.049	\pm 0.011	0.056	\pm 0.008	0.447
cg21297502	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.068	\pm 0.003	0.076	\pm 0.007	0.310
cg21543659	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.174	\pm 0.009	0.211	\pm 0.031	0.067
cg22456162	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.166	\pm 0.008	0.177	\pm 0.014	0.303
cg23276621	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.050	\pm 0.006	0.061	\pm 0.006	0.052
cg2349130	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.038	\pm 0.005	0.041	\pm 0.007	0.418
cg25494480	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.105	\pm 0.008	0.098	\pm 0.021	0.255
cg26258289	chr6:45389420-45389426	RUNX2	0.216	\pm 0.005	0.285	\pm 0.012	0.187

また、骨分化に関連しているオステオポンチン、コラーゲン 1 , DLX5 遺伝子ともに DNA メチル化率は ccdPA, ASC で優位差を認めなかった

Epigenetics Analysis : OPN/COL1/DLX5

Probe ID	Map info	Gene	mean β value		sd (\pm)	ccdPAs		sd (\pm)	p value
			ASC						
cp0007102	chr1:24180290-24180348	OPK3	0.0403	\pm	0.0037	0.0403	\pm	0.0026	0.299
cp1909823	chr1:24180290-24180348	OPK3	0.0521	\pm	0.0043	0.0509	\pm	0.0096	0.212
cp1992091	chr1:24180290-24180348	OPK3	0.0118	\pm	0.0043	0.0092	\pm	0.0031	0.151
cp0389462	chr1:24180290-24180348	OPK3	0.0466	\pm	0.0227	0.0560	\pm	0.0130	0.339
cp00060281	chr1:74827697-74827908	COL1A1	0.0472	\pm	0.0068	0.0410	\pm	0.0011	0.142
cp00179070	chr1:74827697-74827908	COL1A1	0.0626	\pm	0.0081	0.0769	\pm	0.0099	0.182
cp1500086	chr1:74827697-74827908	COL1A1	0.0515	\pm	0.0059	0.0567	\pm	0.0086	0.271
cp0199290	chr1:74827697-74827908	COL1A1	0.1275	\pm	0.0399	0.2234	\pm	0.0663	0.070
cp0982300	chr1:74827697-74827908	COL1A1	0.0403	\pm	0.0282	0.0897	\pm	0.0506	0.062
cp11027288	chr1:74827697-74827908	COL1A1	0.0570	\pm	0.0031	0.0610	\pm	0.0019	0.101
cp16529179	chr1:74827697-74827908	COL1A1	0.0895	\pm	0.0066	0.0684	\pm	0.0057	0.331
cp1500010	chr1:74827697-74827908	COL1A1	0.0323	\pm	0.0069	0.0467	\pm	0.0173	0.150
cp1905264	chr1:74827697-74827908	COL1A1	0.0323	\pm	0.0041	0.0567	\pm	0.0252	0.159
cp0006022	chr7:9695947-9695919	DLX5	0.049	\pm	0.003	0.042	\pm	0.012	0.220
cp0400032	chr7:9695921-9695951	DLX5	0.364	\pm	0.149	0.321	\pm	0.071	0.340
cp0503940	chr7:9695921-9695951	DLX5	0.372	\pm	0.098	0.374	\pm	0.040	0.487
cp02101466	chr7:96959193-9695246	DLX5	0.288	\pm	0.111	0.230	\pm	0.063	0.269
cp0754287	chr7:96959193-9695919	DLX5	0.057	\pm	0.009	0.042	\pm	0.007	0.196
cp01610303	chr7:96959193-9695246	DLX5	0.264	\pm	0.169	0.206	\pm	0.065	0.320
cp11971354	chr7:96959193-9695246	DLX5	0.381	\pm	0.114	0.368	\pm	0.043	0.433
cp11500797	chr7:96959193-9695246	DLX5	0.338	\pm	0.129	0.317	\pm	0.048	0.409
cp11891385	chr7:96959193-9695246	DLX5	0.337	\pm	0.162	0.296	\pm	0.054	0.358
cp1997899	chr7:9695947-9695919	DLX5	0.044	\pm	0.006	0.046	\pm	0.004	0.406

骨分化の調節因子である ATF4 でメチル化率が ASC と ccdPAs で有意に異なる CpG アイランドが認められた。骨分化を促進する蛋白である BMP2 のメチル化率はむしろ ccdPAs で有意に高いことがわかった。

Epigenetics Analysis :ATF4 /BMP2

Probe ID	Map info	Gene	mean β value		sd (\pm)	ccdPAs		sd (\pm)	p value
			ASC						
cp0577880	chr22:28915622-28917193	ATF4	0.032	\pm	0.005	0.039	\pm	0.005	0.199
cp04122974	chr22:28915622-28917193	ATF4	0.011	\pm	0.001	0.016	\pm	0.004	0.065
cp0693899	chr22:28915622-28917193	ATF4	0.050	\pm	0.004	0.042	\pm	0.003	0.021 *
cp0246833	chr22:28915622-28917193	ATF4	0.108	\pm	0.004	0.102	\pm	0.008	0.170
cp11628116	chr22:28915622-28917193	ATF4	0.052	\pm	0.004	0.058	\pm	0.002	0.114
cp12491991	chr22:28915622-28917193	ATF4	0.017	\pm	0.002	0.016	\pm	0.003	0.404
cp1252294	chr22:28915622-28917193	ATF4	0.019	\pm	0.003	0.020	\pm	0.005	0.399
cp1462160	chr22:28915622-28917193	ATF4	0.325	\pm	0.012	0.318	\pm	0.011	0.320
cp1982172	chr22:28915622-28917193	ATF4	0.039	\pm	0.002	0.042	\pm	0.003	0.188
cp01797527	chr20:674802-6748546	BMP2	0.027	\pm	0.006	0.033	\pm	0.002	0.120
cp06816507	chr20:6750616-6750957	BMP2	0.043	\pm	0.003	0.052	\pm	0.007	0.037 *
cp09211429	chr20:674802-6748546	BMP2	0.062	\pm	0.026	0.097	\pm	0.028	0.049 *
cp13724496	chr20:674802-6748546	BMP2	0.007	\pm	0.002	0.006	\pm	0.005	0.344
cp1774058	chr20:674802-6748546	BMP2	0.070	\pm	0.002	0.079	\pm	0.006	0.115
cp18038133	chr20:6750616-6750957	BMP2	0.062	\pm	0.003	0.057	\pm	0.010	0.328
cp23129274	chr20:674802-6748546	BMP2	0.039	\pm	0.001	0.038	\pm	0.004	0.396
cp04674635	chr20:6750616-6750957	BMP2	0.060	\pm	0.008	0.077	\pm	0.009	0.194

ccdPAs は骨分化のレギュレーターのひとつである ATF4 が ASCs より発現しやすいことが骨分化しやすいと理由のひとつと考えられた。ATF4 により骨分化が促進されることで、二次的に RUNX2, osteopontin の発現が上昇している可能性が考えられる。ATF4 だけで ccdPAs の骨分化能が説明しうるかは不明であり、今後さらなる検討を進め ccdPAs の骨分化能の詳細を明らかにする必要がある。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

笹原資太郎

天井細胞由来増殖性脂肪細胞(ccdPAs)の骨分化能

第24回日本形成外科学会基礎学術集会

2015年10月8・9日

キッセイ分化ホール(長野県・松本市)

笹原資太郎

天井培養由来増殖性脂肪細胞と脂肪幹

細胞骨分化能の比較からみた分化系統における位置

第23回日本形成外科学会基礎学術集会

2014年10月9・10日

岩手県民会館(岩手県・盛岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹原 資太郎 (SASAHARA, Yoshitaro)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70400950

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：