

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15656

研究課題名(和文) 線維芽細胞の未分化性獲得の際のエピジェネティクス変化

研究課題名(英文) Epigenetic change when fibroblasts become undifferentiated

研究代表者

貴志 和生 (Kishi, Kazuo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：40224919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線維芽細胞を用いて、2次元培養および非接着培養による細胞凝集塊を行い、2者の接着・非接着以外の条件を限りなく合わせた上で、2者のDNAメチル化の比較を、網羅的に検討した。その結果、2次元接着培養で3次元培養に比較して増強しているmRNAプロモーター領域が、数多く確認できた。細胞凝集塊形成による未分化能獲得はエピジェネティックな変化によるものである可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：By using fibroblasts, we cultured in adhesive condition using ordinary 2D culture and non-adhesive 3D condition using non-adhesive culture dishes. After the conditions except for adhesion and non-adhesion were adjusted together, we comprehensively observed the differences in DNA methylation of the two condition. As a results, we found various DNA methylated sites in two dimensional culture. From these results, it was supposed that the change into undifferentiated state by culturing on non-adhesive dish comes from epigenetic changes.

研究分野：形成外科

キーワード：epigenetic regeneration

## 1. 研究開始当初の背景

我々は以前に、線維芽細胞を非接着性培養皿で無血清培地による培養を行い、細胞凝集塊を形成させると、毛包誘導能が消失した細胞や、本来毛包誘導能を有していない細胞が、毛包誘導能を回復ないし獲得するという現象を発見した。

また、細胞が凝集塊を形成すると細胞が増殖しなくなり、かつ長期の生存が可能な細胞の冬眠という状態になり、さらにさまざまな幹細胞特異的に働いている膜表面マーカーや転写因子が著しく上昇することを発見した。さらに、線維芽細胞凝集塊に分化誘導をかけると、神経、脂肪、骨、軟骨に分化することを予備実験で確認した。これは生体内では種々の幹細胞に認められる現象である。これらのことから、線維芽細胞が細胞凝集塊を形成することで、*in vitro* で間葉系幹細胞に相当する状態に変化したということの意味する。このように線維芽細胞が、細胞凝集塊を形成することで未分化性を有する細胞に変化する現象は、現象としてはとらえられているが、そのメカニズムは不明であった。

線維芽細胞を非接着性培養皿で無血清培地による培養を行い、細胞凝集塊を形成させることで、多分化能を獲得したり、毛包誘導能を獲得し、培養条件のみで線維芽細胞が未分化性を獲得するという発見は、それ自体が画期的なものであるが、一方で、そのメカニズムは不明のままであった。幹細胞とエピジェネティクスの関係の報告は、近年散見されるようになってきた。これらは、特定の幹細胞がどのような DNA の部位にメチル化しているのかを観察している。一方で培養条件の変化で線維芽細胞が未分化性を獲得したという現象は、いわば脱分化とみられるような現象であるが、このエピジェネティックな変化を観察した研究はない。エピジェネティクスとは、DNA 配列の変化を伴わず、後天的な

修飾により遺伝子発現が制御され維持される仕組みで、その機構には DNA メチル化やヒストン化学修飾などが関与している。細胞環境の変化による細胞の性質変化は、すなわちゲノム変位を伴わないエピジェネティックな変化の可能性と考えられるが、これまで 2 次元培養と細胞凝集塊でエピジェネティック変化を調べた報告はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、線維芽細胞を用いて、2 次元培養および非接着培養による細胞凝集塊を行い、2 者の接着・非接着以外の条件を限りなく合わせた上で、2 者の DNA メチル化の比較を、CpG Island マイクロアレイを用いて、網羅的に検討することを目的とした。さらに、未分化性獲得との関係が示唆されるアクチン重合の状態を変化させることで、未分化性の変化とメチル化の変化を検討することを目的とした。また、以前に表皮細胞とこの線維芽細胞凝集塊を免疫不全マウスに混合移植すると新たに毛包を形成し、細胞凝集塊形成により毛包誘導能を獲得することを示した。しかし培養方法によるこの変化が、何によって引き起こされるか、その原因は不明であった。本研究では、線維芽細胞を用いて、通常の 2 次元接着培養と非接着培養皿による細胞凝集塊形成により、両者の DNA のメチル化にどのような変化がみられるか観察し、未分化性獲得のメカニズムに迫ることを目的とした。また、その制御法についても検討した。

また、通常の 2 次元培養は、細胞が固い培養皿底面に接着し、アクチンが重合したストレスファイバーや SMA を発現し、生体内と違った特殊な環境となる。一方で細胞凝集塊を形成させると、このストレスファイバーや SMA の発現は消失する。このことは、細胞が周囲培養環境によりその性質を変化し、エピジェネティックな変化を来したと考え

られるので、アクチン重合とエビジェネティック変化についても検討した。

### 3. 研究の方法

2次元培養と非接着培養皿による細胞凝集塊のDNAメチル化の網羅的解析を行うためには、可及的に2者の細胞の条件を合わせる必要がある。すなわち、増殖や細胞死などを極力抑え、細胞が細胞皿に接着しているか、それとも細胞同士で接着して浮遊しているかのみの変化にする必要がある。Skps用培地は無血清培地であり、細胞凝集塊を形成すると細胞増殖はほぼ停止し、2次元培養であっても本培地を用いればコンフルエントに達したのちに細胞増殖が停止することがこれまでの予備実験で確認されている。このため、まずマウス皮膚由来線維芽細胞を用いて、通常の2次元培養および非接着培養皿による細胞凝集塊の形成を行い、両者の細胞分裂、細胞死の程度が一定となる培養開始後の時点を決定を行った。

10%ウシ胎仔血清添加DMEM培地で、通常の2次元培養を行い、マウス皮膚由来線維芽細胞を増殖させた。継代数を合わせて、一部はSkps用培養液(DMEM/F-12+bFGF+EGF+B27)の無血清培地で2次元培養を、一部は1%の寒天でプラスチックディッシュをコーティングした非接着性培養皿に、Skps用培養液で浮遊させた線維芽細胞を播種し、細胞凝集塊を形成させた。培地交換は3-4日に一度、培地の1/2量を交換し、4週間まで培養した。それぞれの培養開始後、1週ごとに4週目まで細胞の一部を回収し、BrdU取り込み、PI assay, TUNEL法, を使用して細胞死や増殖が停止する時期の決定を行った。

細胞死と増殖が停止する時期を決めたのちに、それぞれの細胞を4%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定し、一部はwhole mountで免疫染色を行い、一部はパラフィン包埋し、2 $\mu$ mの切片を作成し、ともにこれまで未分化マーカーとして報告されているさまざま

な因子につき免疫染色を行った。具体的には、胚性幹細胞で発現しているSSEA-1, Oct-3, SOX2, Nanog, Klf4, CD133, CXCR4, Nestin, などにつき、免疫多重染色を行った。その後、コンフォーカルマイクロスコープで、細胞凝集塊の中で各タンパクの発現部位の差異について検討した。また、これら因子につき、real time RTPCRを用いて、凝集塊総量の遺伝子発現の変化について定量的に観察した。また、間葉系幹細胞分化誘導試薬(タカラ)を用いて、脂肪、骨、軟骨への分化誘導効率を確認した。

上述の研究で決定された時期の2次元培養および非接着培養皿による細胞凝集塊の形成を行った線維芽細胞から、ゲノムDNAを抽出し、Arraystar社MeDIP-chip/hMeDIP-chipマイクロアレイArraystar Mouse RefSeq Promoter Arrayを用いて、両者のDNAメチル化の変化を網羅的に調べ、メチル化されていた領域の調査を行った。

2次元培養と非接着培養皿による細胞凝集塊の形成で差異のあったメチル化領域の特定を行った後、メチル化された領域が未分化性維持や癌化に関わっている領域なのかを探索した。

DNAメチル化は遺伝子発現の抑制に関与し、ヒストン化学修飾は転写制御やクロマチンの構造変換などを通して遺伝子発現の活性化あるいは抑制に関与する。動物のゲノムDNAではCpG配列のシトシン(C)がメチル化されることが知られていて、遺伝子のプロモーター付近にはCpG配列が高頻度に存在する領域があり、CpGアイランドと呼ばれている。通常、CpGアイランドがメチル化されると遺伝子の転写が抑制される。DNAメチル解析では、主にこのようなCpGアイランドのメチル化状態を解析した。

その後、当該領域とアクチンの重合との関係を調べた。アクチン重合を阻害、または

促進する低分子の投与および、アクチンの重合を促進する Rac-1, Rho, cdc42 などに対する siRNA を用いて、アクチンの重合阻害を試みた。これらの条件で、2次元培養の線維芽細胞のアクチン重合を阻害した細胞を用いて、細胞死の有無、細胞分裂の有無、さらには脂肪、軟骨、骨への分化誘導が可能であるか否かを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

線維芽細胞の2次元接着培養と3次元培養で、上記の方法で細胞増殖と、アポトーシスに有無につき検討を行った。10%FBS 添加培地では、2次元培養では増殖が進行され、コンフルエントに達した後も、細胞が重畳するいわゆるオーバーコンフルエントの状態となった。また3次元培養では、過栄養状態のためか、細胞が脂肪細胞に分化する像が多く認められた。このため、Skp 用の培地に変更し、それぞれの細胞増殖とアポトーシスを観察したところ、培養開始2週目まではそれぞれ細胞分裂が起こっていたが、3週目でそれぞれ細胞分裂が確認できなくなった。また、この時点では、アポトーシスを起こしている細胞もほとんど見られなかった。このため、培養開始3週後の線維芽細胞の未分化マーカーの発現を免疫染色で確認したところ、SSEA-1, SOX2, CD133, CXCR4, および Nestin は陽性に染色されたが、Nanog と Klf4 は染色されなかった。さらに、real time PCR で3次元培養を行った線維芽細胞と、2次元培養を行った線維芽細胞の未分化マーカーの発現の差異を観察したところ、免疫染色の結果と一致して、3次元培養で未分化マーカーの発現が認められた。3次元培養を行った線維芽細胞を再び単一の細胞に浮遊させ、接着培養後に、軟骨、骨、脂肪への分化誘導を行ったところ、一部の細胞にそれぞれの系統への分化が確認された。このため、マウス皮膚由来線維芽細胞では、無血清培地に変更後、3

週目の比較が適切であると考えられた。

そこで、無血清培地変更後のそれぞれの培養細胞から、ゲノム DNA を回収し、Arraystar 社 MeDIP-chip/hMeDIP-chip マイクロアレイ Arraystar Mouse RefSeq Promoter Array を用いて、外注で解析を行った。その結果、2次元接着培養で3次元培養に比較して増強している mRNA プロモーター領域が、546か所、3次元培養で2次元培養に比較して増強している mRNA プロモーター領域が251か所確認できた。このうち、2次元培養では、actin 重合に関わる因子のプロモーター領域にメチル化が確認された。また、3次元培養では、CD133, Sox2 のプロモーター領域の活性化が確認された。

##### (2) 得られた結果の国内外における位置づけとインパクト

今回の結果から、2次元培養で観察されたアクチンの重合は、DNA メチル化によるものであることが推察された。また、未分化マーカーはその一部であるが、未分化マーカーの mRNA 領域のメチル化によるものであることが推察できた。これらのことから培養方法の変更という単純な方法で、mRNA プロモーター領域の変化を調節できる可能性が示唆され、幹細胞制御機構へのインパクトは大きいものと考えられる。

##### (3) 今後の展望

今後は、3次元培養後も確認できなかった未分化マーカーの制御を培養方法の工夫することで、さらに効率の良い制御方法の検討を行っていきたい。

#### 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 0 件)

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

貴志 和生 (Kazuo Kishi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40224919