

令和元年6月14日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17219

研究課題名(和文) マルチオミクス解析による間葉系幹細胞の分化制御メカニズムの探索

研究課題名(英文) Multi-omics profiling reveals unique features of multipotent mesenchymal stromal cells from oral and maxillofacial tissue transcriptomes

研究代表者

鬼塚 理 (ONIZUKA, SATORU)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10779317

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)：本研究では、分化能の異なる腸骨由来、顎骨由来MSCsに対して、次世代シーケンサーを用いて、パスウェイ解析やGO解析等により顎骨由来MSCs特異的な遺伝子発現パターンを絞り、LHX8やMSX1といった顎骨の発生に重要な転写因子が顎骨由来MSCsの特性を反映していることを明らかにした。これらの遺伝子発現はChIP-seqによるエピゲノム解析においても転写活性が認められた。さらには、腸骨等の体幹部のMSCsと比較して、顎骨領域のMSCsはHOX遺伝子発現が著しく欠如していることから、同遺伝子も特定のMSCsの特性に影響を与えていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から各組織由来MSCsの特性の違いは、由来となる組織の特性をある程度引き継いでいることがわかった。細胞内での制御機構は複雑かつダイナミックな変化であり、トランスクリプトミクスの視点のみでは全容の解明には至らないと考えられる。さらにエピゲノミクスなアプローチも行い、より詳細な発現プロファイルを得ることで、分化に重要な新規転写因子の同定や、骨芽細胞分化における指標を選定し、限られた細胞供給源からでも特定の組織再生に適した細胞治療が行える。即ち、歯科領域のターゲットである顎骨再建に最適な細胞ソースの提言なども可能になる。

研究成果の概要(英文)：Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are attractive candidates for therapeutic clinical applications. Although the minimum criteria for defining MSCs have been defined, their characteristics are known to vary depending on their tissue of origin. Here, we show variation in transcriptome profiles of human MSCs derived from several anatomical locations such as the jaw bone, and iliac bone. We analyzed RNA-sequencing and ChIP-seq data of several MSC types and found that those from tissues of the maxillofacial region were HOX-negative, while those from other tissues were HOX-positive. We also identified the genes strongly expressed in maxillofacial tissue-derived MSCs were involved in the craniofacial development. Although stromal cells from different anatomical sources are generally categorized as MSCs, their differentiation potential and biological functions vary. We suggested that MSCs may retain a memory of the developmental process, including gene expression profiles.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 トランスクリプトミクス エピゲノミクス 骨芽細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂は先天性異常の疾患であり、審美的な問題だけでなく、哺乳障害、発音異常の問題も生じることが知られている。さらに顎裂を伴う場合には歯列不正があるため、矯正治療が必要になるが、顎堤の欠損範囲が大きい場合には骨移植術が行われる。顎裂部骨移植術は良好な骨形成を得て歯牙の支持性を得るだけでなく歯牙の萌出や移動・誘導・顎裂の保定を可能にすることである。手術時期は一般的に永久歯が萌出する混合歯列期であるが、十分な移植骨量が確保できないことや移植骨の吸収などにより、一度の手術で矯正歯科治療に十分な骨形成が得られるとは限らず、複数回に及ぶ場合もある。現在、移植骨は自家骨使用が多く、腸骨海綿骨が第一選択であるとされているが、腸骨採取による侵襲は少ない。そのため新たな骨再生療法として、細胞を用いた治療が注目されている。

間葉系幹細胞(MSCs)は骨芽細胞へ分化が可能であり、様々な組織から単離可能であることが報告されている(Pittenger ら *Science* 1999)。先行研究では腸骨海綿骨・顎骨(上顎骨、下顎骨)組織から線維芽細胞様細胞の単離・培養が可能であり、これらの細胞も MSCs の特性を有していることがわかっている(Shimakura ら *J Craniofac Surg* 2003)。しかし、これらの細胞は同じ MSCs としての性質はあるものの、分化能に差があることが知られている。さらには、MSCs を用いた移植実験では再生能が異なることも知られており、再生医療に用いる際の細胞ソースの選定が重要であると考えられる。問題点として、MSCs については一定の基準は制定されていないものの、必要最低条件であり、細胞の性質は規格化されておらず、あらゆる組織から MSCs が単離できる現在では、ある一定の指標が必要である。

過去の報告では顎骨と腸骨の骨髄由来 MSCs を比較検討した際に、腸骨由来 MSCs では骨芽細胞だけでなく、軟骨・脂肪細胞への良好な分化を *in vitro* で確認できているが、顎骨由来 MSCs では軟骨・脂肪細胞への分化能力が著しく低いことがわかっている(Matsubara ら *J Bone Miner Res* 2005)。さらに、顎骨と体幹骨では骨化がそれぞれ異なっており、由来組織の性質が MSCs の遺伝子発現パターンに影響することにより、分化や増殖といった能力にも大きく影響していることが示唆されている(Leucht ら *Development* 2008)。このことから、MSCs の分化に関しては特定の遺伝子により制御されていることが考えられるが、単一の因子だけでなく、様々な因子が複雑に関与しているため、いまだ不明な点が多い。そこで申請者らは分化能の異なる腸骨海綿骨由来、下顎骨由来、上顎骨由来の MSCs に対して次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)を行った。

サンプルは腸骨由来 MSCs (I-MSCs)、上顎骨由来 MSCs (Mx-MSCs)、下顎骨由来 MSCs (Md-MSCs) を、それぞれ3検体ずつ用いて Ion Proton (Thermo Fisher Scientific)により RNA-seq を実施した。得られたデータは Tophat2-Cufflinks パイプラインにより、マッピングと発現変動解析を行い、遺伝子発現は Fragments per kilobase of exon per million mapped reads (FPKM) 値により定量化した。FPKM 1 の遺伝子を解析対象とし、12,676 種認めた。顎骨と腸骨とでは膜内骨化と軟骨内骨化と骨化過程が異なるため、Mx-MSCs・Md-MSCs と I-MSCs の発現比較を行い、2群間で有意な発現変動を認めた遺伝子 (Differentially expressed genes; DEGs) についてまとめたところ、I-MSCs vs. Md-MSCs は 365、I-MSCs vs. Mx-MSCs は 973 の DEGs を認めた。またそれぞれの DEGs の中から、Mx-MSCs・Md-MSCs 両群と比較して I-MSCs で遺伝子発現が上昇している遺伝子は 140 種存在した(図1)。これらの 140 遺伝子の中で特に発現変動の大きい遺伝子を選別したところ、I-MSCs vs. Md-MSCs 群、I-MSCs vs. Mx-MSCs 群どちらも HOX 遺伝子が多く認められた(図2)。そこで各サンプルにおける HOX 遺伝子の発現を調べてみたところ、Md-MSCs、Mx-MSCs の顎骨由来サンプルでは多くの HOX 遺伝子が発現していないことがわかった。

前述の予備実験の研究結果から、HOX 遺伝子発現の有無が顎骨由来と腸骨由来 MSCs の特性の違いにつながることを示唆される。先行研究では Hox 遺伝子は軟骨内骨化である四肢の骨形成において重要な役割を担っていることがわかっている(Goff・Tabian ら *Development* 1997)。また Msx1 (Hox7) や Msx2 (Hox8) は神経堤細胞を由来とし、膜内骨化を示す顎顔面骨において、骨形成やパターンニングに重要であるとされているが(Satokata ら *Nat Genet* 1994; Foerst-Potts ら *Dev Dyn* 1997)、一方で他の Hox 遺伝子の強制発現により成長発育に異常を認め、口蓋裂や開眼等の表現型を示すことも報告されている(Balling ら *Cell* 1989)。これらのことから膜内骨化と軟骨内骨化ではそれぞれ異なる HOX 遺伝子群に制御されており、その後の骨芽細胞分化過程の違いに影響していると考えられるが、どのような HOX 遺伝子が MSCs の骨芽細胞を制御しているかについて詳細は明らかにされていない。さらに単一の遺伝子のみではなく、ヒストン修飾、DNA メチル化や miRNA 等のエピジェネティクスな制御も含めた複合的な作用により、MSCs の分化の方向性が決定していると考えられており、メカニズムの全容解明には至らない。

近年、このような細胞内での複雑な制御機構に対して、トランスクリプトーム・プロテオーム・エピゲノム等の異なる階層の網羅的解析(オミクス解析)データを統合し、包括的にデータを解析するマルチオミクス解析に注目が集まっている。これらの技術により癌や他の疾患を対象とした研究分野では新たな知見も得られている(Kikutake ら *Plos One* 2016)ため、本研究においてもトランスクリプトミクス(RNA-seq)とエピゲノミクス(ChIP-seq)のマルチスケールな解析が重要であると考えられる。これらの解析を通して、MSCs の骨芽細胞分化制御メカニズムを解明することにより、骨再生において適した組織由来細胞の同定や、新規の骨芽細胞・軟骨細胞分化の決定を担う転写因子・分泌タンパクなどの発見につながると考えられる。

2. 研究の目的

近年、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析(オミクス解析)は目覚ましい発展を遂げており、さらにトランスクリプトーム、エピゲノム、プロテオームといった異なる階層のデータを包括的に解析するマルチオミクス解析に注目が集まっている。そこで本研究では、分化能の異なる腸骨由来、顎骨由来 MSCs に対して、次世代シーケンサーを使用したトランスクリプトミクス(RNA-seq)とエピゲノミクス(ChIP-seq)の2つの視点からマルチスケールな解析を行い、骨芽細胞分化の制御メカニズムを包括的に探索する。また、細胞の由来となる組織特異的な遺伝子発現パターンを同定することにより、組織再生により適した細胞ソース選定の手がかりを見出すことである。

3. 研究の方法

本研究では、間葉系幹細胞(MSCs)の分化の方向性を決定している遺伝子制御メカニズムを次世代シーケンサーによる解析と、分子生物学的手法の双方向から検証し、解明することを目指す。

(1)RNA-seq データに関してネットワーク解析やパスウェイ解析等を用いて更に詳細な解析を行い、MSCsの分化方向性を制御している他の因子を同定する。

(2)各細胞の分化能を考慮し、RNA-seqの結果から同定された骨芽細胞分化制御遺伝子に対して、ヒストン修飾によるエピジェネティクスな制御機構をChIP-seqにより明らかにする。また必要であれば、特定の転写因子についてもChIP-seqを実施する。

平成29年度では対象サンプルをそれぞれ3検体ずつ用いて、RNA-seqとChIP-seqを実施する。

(1) 分化能の異なる MSCs 間における遺伝子発現の詳細な解析

これまでに得られた次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)データについて、公共のデータベースや有償ツール等を用いて、さらに詳細な解析を行っていく。

膜内骨化により骨形成を行う上顎骨・下顎骨由来 MSCs(Mx-MSCs/Md-MSCs)では、軟骨内骨化により骨形成を行う腸骨由来 MSCs(I-MSCs)と比較して軟骨細胞への分化が負に制御されていることが想定される。そのため選定されたDEGsがそれぞれ骨芽細胞分化を制御、もしくは軟骨細胞分化を制御しているかについて過去の文献やデータベースを用いて検討する。

各MSCsが本来有している細胞表面レセプターやシグナル伝達因子に関しても分化を制御していることが想定されるため、パスウェイ解析により有力な因子を選定する。

(2) 骨芽細胞分化の制御メカニズムに関するエピゲノミクスレベルの検討

I-MSCs群とMx-MSCs/Md-MSCs群でそれぞれ発現上昇しているDEGsが、ヒストン修飾による転写活性、または抑制作用の影響を受けているかについて、クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)によるエピジェネティクスな制御メカニズムの探索を行う。

各MSCsを骨芽細胞分化誘導培地(OIM)にて4日培養後、DNA-タンパク質複合体を固定し、ヒストン修飾に關与する抗体(H3K4me1, H3K9me3, H3K9/14ac, K3K27-me3, H3K36me3)により免疫沈降した後、次世代シーケンサーによるChIP-seqを行う。さらに可能であれば分化制御に関わっていると特定される転写因子が、転写因子-DNA間相互作用により他のDEGsを制御しているかについて、転写因子特異的な抗体を用いてChIP-seqを施行する。

平成30年度ではスーパーコンピュータを用いてそれぞれのデータを統合して解析する。

(3) *in silico*での包括的なデータ解析

RNA-seqとChIP-seqから得られたデータを統合し、MSCsの骨芽細胞分化制御メカニズム解明のためトランスクリプトミクス・エピゲノミクスの双方の観点からアプローチする。またRNA-seqの結果から、特定の酵素活性が、ヒストン修飾に影響しているかを調査する。なお、これらのデータ量は膨大になるが、スーパーコンピュータシステム(東京大学医科学研究所所有)を用いて、計算処理を高速に行うことが可能になる。

ChIP-seqから得られたデータに対して、BowtieやMACSといったマッピングやピークコール同定のツールを用いて、各MSCsでのヒストン修飾状態を明確にし、遺伝子の転写が活性、もしくは抑制されているかについてデータの集計を行う。

RNA-seqのデータと照らし合わせて、特にエピジェネティクスに遺伝子発現が制御されているかについて評価する。

具体的には、RNA-seqで選定された、I-MSCs特異的なDEGsがヒストンアセチル化やヒストンのリジン残基のメチル化によって転写を制御されているかを解析し、ヒストン修飾により制御されている遺伝子群を抽出する。

ヒストン修飾により制御されている遺伝子群については、メチル基転移酵素やアセチル基転移酵素などの関与も考慮に入れて、RNA-seqデータをフィードバックし、これらの情報についてもデータ解析を行う。

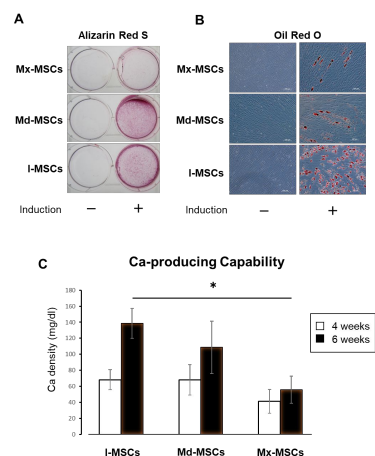


Figure 1
3種類のMSCsは骨芽細胞分化能(A)と脂肪細胞分化能(B)を有しており、骨芽細胞分化誘導時にはカルシウム産生能があることを認めた。

4. 研究成果

本研究で用いた Mx-MSCs、Md-MSCs、I-MSCs の 3 種類の間葉系幹細胞はすべて MSCs 様の特性を有していることが分かったものの、その分化能には差異を認めており、I-MSCs は脂肪分化能が高い反面、顎骨由来の MSCs である Mx-MSCs と Md-MSCs は脂肪分化能が低いことが分かった。また骨形成に重要であるとされるカルシウムの産生は Mx-MSCs が著しく低いということが分かった (Fig.1)。

RNA-seq の解析では、GO 解析により I-MSCs では長管骨の前後軸を決定する遺伝子や、骨格形成の発生に関与する遺伝子が多く上がったことが分かった (Fig.2)。さらにより多くの MSCs と比較解析するために、データベースより ESCs、ESCs 由来 MSCs、骨髄由来 MSCs (BM-MSCs)、歯根膜由来 MSCs (PDL-MSCs) のシーケンスデータを取得し、多群間による RNA-seq 解析を行ったところ、顎顔面領域の組織由来である Mx-MSCs、Md-MSCs、PDL-MSCs では HOX 遺伝子の発現が著しく欠如しており、エピゲノムレベルでも発現が抑制されていることがわかった (Fig.3)。また、顎骨領域の MSCs は、顎顔面の発生に関与する遺伝子発現が比較的高発現であることから、MSCs は由来となる組織の遺伝子プログラムを引き継いでいることがわかった。

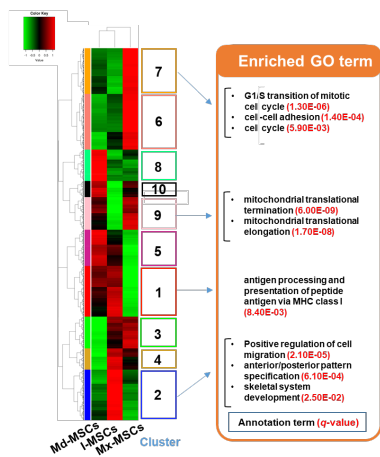


Figure 2
遺伝子発現パターンから 10 のクラスターに分類され、各クラスターは特定の Gene Ontology (GO) term を有している。

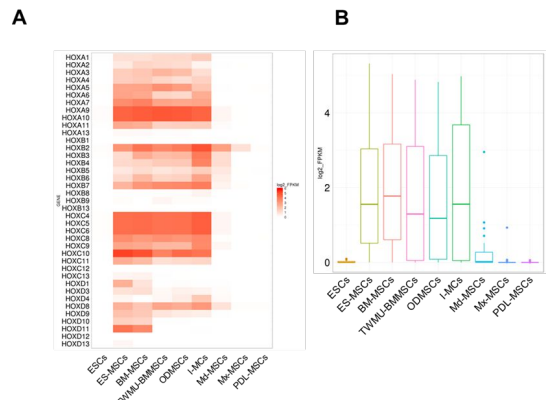


Figure 3
全 9 サンプルにおける HOX 遺伝子ファミリーの発現分布 (A) と全 HOX 遺伝子の発現強度 (B) を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

鬼塚 理、岩田 隆紀：細胞シートを用いた歯周組織の再生。膜 43(2): 56-62, 2018

〔学会発表〕(計 1 件)

Whole transcriptome analysis of MSCs derived from different types of tissue reveals unique profiles.

Onizuka S, Yamazaki Y, Sugimoto T, Sone Y, Takeda A, Park SJ, Nakai K, Iwata T, Yamato M, Okano T.

The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2017 Annual Meeting 2017 年 9 月 8-11 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。