

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07846

研究課題名(和文) KLF4遺伝子が制御する脂肪分化抑制機構の解明と新規骨再生治療戦略の確立

研究課題名(英文) Identification of the role of transcription factor, KLF4 in human mesenchymal stem cells

研究代表者

宮本 憲一 (MIYAMOTO, KENICHI)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：00424185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨髄由来間葉系幹細胞における転写因子、KLF4の機能解析を行った。shRNAを用いたKLF4の発現抑制により、細胞増殖率の上昇、脂肪分化率の顕著な上昇が観察された。次に、KLF4を強制発現させた間葉系幹細胞におけるマイクロアレイデータを解析した。その結果、細胞増殖に関連した遺伝子群はKLF4によってその発現が抑制されることから、KLF4発現抑制実験の結果を裏付けることができた。また、複数の細胞内シグナル経路に関する受容体遺伝子群の発現抑制も同定されたことから、KLF4は間葉系幹細胞の多能性維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞は、組織再生や炎症抑制などを目的として様々な分野で注目されているものの、幹細胞としての生物学的理解は乏しい。そこで、本研究では間葉系幹細胞でも発現していることが知られている転写因子、KLF4の発現抑制が間葉系幹細胞に及ぼす性質変化を解析した。その結果、KLF4は細胞増殖、および脂肪分化の抑制に寄与していることを見出した。幹細胞の性質を強固に維持することは、将来的な移植治療に不可欠な要素であり、必然的にその評価基準を確立することも重要であるため、本研究成果はその礎になるであろうと期待される。

研究成果の概要(英文)：Understanding of the mechanism of stemness maintenance in mesenchymal stem cells (MSC) is important for the future cellular therapies.

In this study, I focused on the transcription factor, KLF4 and analyzed the effects of KLF4 knock-down by short hairpin RNA in human bone marrow-derived MSC. Those MSCs showed significantly increased the proliferation rate and the adipogenic differentiation. The osteogenic differentiation was also increased, but not significant. Further, the microarray data in KLF4 overexpressed MSC indicated that KLF4 suppresses the genes for cell cycle and some receptors for cellular signaling pathways. These results suggest that KLF4 has an important function for the multipotency of MSC.

研究分野：細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 KLF4 細胞増殖 脂肪分化

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal Stem Cells) は、増殖性と培養皿への接着性、および繊維芽細胞様の形態を有し、*in vitro*において脂肪、骨、軟骨への分化能を示すことを定義とする組織幹細胞である。また組織幹細胞は移植後も腫瘍化のリスクも極めて低いため、MSCは骨再生医療への有力な細胞ソースとして注目され、国内外の様々な医療分野で盛んに研究されている。一般的に、組織幹細胞の数は非常に少なく、移植治療に用いるためには*in vitro*で本来の多能性を維持しながらの培養が重要である。しかし、そのような培養条件は未だ確立されておらず、MSCの幹細胞としての機能維持メカニズムに関する理解も未だ乏しい。

一方、我々の研究室ではヒト骨髄由来単核球細胞からフローサイトメトリーを用いて、単一細胞からMSCを単離する方法を採用している。これは、一般的に行われる骨髄由来単核球細胞を培養ディッシュに直接播種するMSCの単離法に比べ、より洗練されたMSCを単離することができる。これにより、細胞増殖率の異なる3種類のMSCサブタイプ (REC、MEC、SEC) が得られる。また、これらMSCサブタイプにおけるマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現プロファイルからKLF4がMECに特徴的な発現を示すことがわかった。KLF4は、胚性幹細胞のマーカー遺伝子として広く知られている転写因子であるが、MSCにおける機能的役割についてはよくわかっていない。

2. 研究の目的

現在知られているMSCとは、2006年に国際細胞治療学会が提唱した増殖性と培養皿への接着性、および繊維芽細胞様の形態を有し、*in vitro*において脂肪、骨、軟骨への分化能を示す細胞である。しかし、このようなMSCの性質は具体的にどのような分子メカニズムによって制御、維持されているのかはほとんどわかっていない。我々が研究で用いるMSCは、単一細胞から単離された細胞であるため、広く用いられている雑多な細胞集団であるMSCより詳細な解析が可能であると期待できる。そこで、本研究では骨髄由来MSCにおけるKLF4の機能的役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、我々が用いている3種類の骨髄由来MSCサブタイプ (REC、MEC、SEC) の中で、KLF4の発現が顕著に高いMECを用いて行った。

1) 脂肪・骨分化誘導におけるKLF4の発現解析

*In vitro*での脂肪、骨芽細胞への分化誘導を14日間行い、分化誘導中の経時的なKLF4の発現量変化をmRNA、タンパク質レベルで調べた。

2) shRNAによるKLF4ノックダウン

KLF4の発現抑制によるMSCへの影響を調べるため、レンチウイルスベクターを用いてMECでKLF4に対するshRNAを強制発現し、それによるMECの細胞増殖率、分化能への影響を解析した。

3) マイクロアレイによるKLF4の下流遺伝子の探索

過去に発表された、別の研究グループによるKLF4を強制発現した骨髄由来間葉系幹細胞についての論文 (Voutila J. et al., Mol Ther Nucleic Acids., 2012) の添付データから、KLF4の発現量に影響を受ける遺伝子群を抽出し、KLF4を強制抑制したMECでのそれら遺伝子群の発現量変化を検証した。

4. 研究成果

1) 脂肪・骨分化誘導におけるKLF4の発現解析

脂肪分化誘導によるKLF4の発現量は、誘導開始後1日目から明らかな低下が観察され、14日後まで大幅な発現量変化は認められなかった。また、脂肪分化誘導開始後から24hr以内の発現量変化についても調べたところ、誘導開始後、3hr後まで一過的な発現量上昇が認められたが、その後は時間経過に伴った発現量低下が観察された。このような発現量変化は、タンパク質レベルでも同様の結果が得られた。

骨分化誘導においては、脂肪分化誘導時と比べると分化誘導開始後から比較的高く発現していることが観察された。また、脂肪分化同様、分化誘導開始から24hr以内の発現量変化についても調べた。その結果、脂肪分化誘導時と同様の傾向がmRNA、タンパク質レベルともに観察された。これらの結果から、脂肪、骨分化誘導開始から24hr後にKLF4の発現量は顕著に低下することがわかった (図1)。

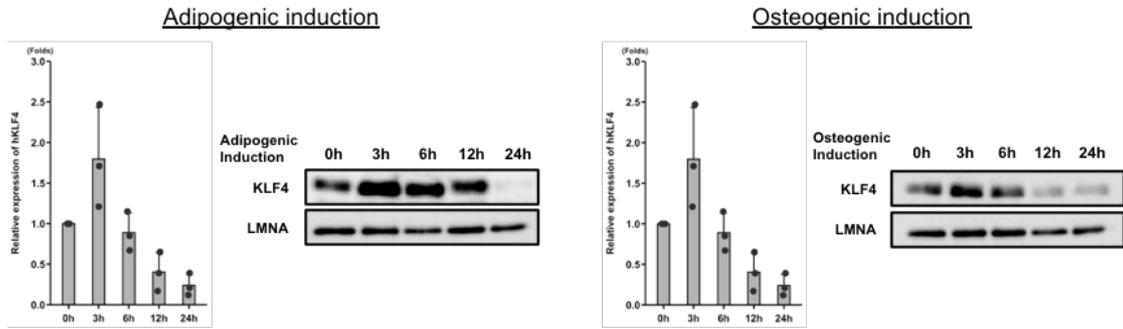


図1 脂肪・骨分化誘導 24hrにおけるKLF4の発現変動

2) shRNAによるKLF4ノックダウン

KLF4を発現抑制したMEC (KLF4-KD)において、10日間培養し経時的に細胞数を計測したところ、コントロールに比べ顕著な増殖率の上昇が観察された。また、その裏付けとして、分裂途中の細胞マーカーの一つであるMKI-67遺伝子について定量PCR (qPCR)を行った結果、KLF4-KD細胞で明らかな発現量上昇が認められた。このことから、KLF4はMSCの細胞分裂を抑制していることがわかった。次に、KLF4-KD細胞の脂肪分化および骨分化誘導における影響を調べた。14日間の脂肪分化誘導において、7日後、14日後での脂肪細胞をオイルレッドO染色から、分化誘導後7日でKLF4-KD細胞に顕著に高い染色率が認められ、分化誘導後14日では有意な差は認められなかったものの、KLF4-KD細胞で高い傾向が観察された。

一方、骨分化誘導においては、21日間の誘導期間で14日後、21日後のカルシウム沈着をアリザリンレッドS染色で評価した。その結果、両時点で有意な差は認められなかったが、脂肪分化同様、KLF4-KD細胞で高い染色傾向が観察された。これらの結果から、KLF4は、MSCの分化、少なくとも脂肪分化を抑制していることが示唆された (図2)。

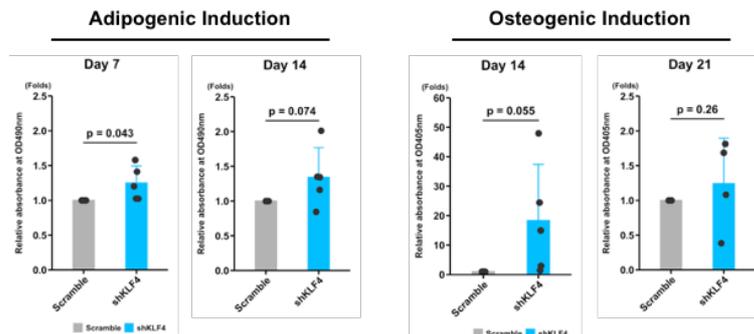


図2 KLF4発現抑制による脂肪・骨分化率の変化

4) マイクロアレイによるKLF4の下流遺伝子の探索

KLF4によって制御される遺伝子群を同定するため、KLF4を強制発現させたMSC (KLF4-OE)のマイクロアレイデータを解析した。そうして得られた遺伝子群は、KLF4-KD細胞では逆の挙動を示すものと解釈することができる。つまり、KLF4-OE細胞で発現低下した遺伝子群は、KLF4-KD細胞では発現上昇していると予想される。そこで、そのような遺伝子群についてqPCRにより検証したところ、調べた7つの遺伝子中、5つの遺伝子について予想通りKLF4-KD細胞において発現が顕著に上昇していた。このことから、解析したマイクロアレイデータはKLF4-KD細胞にも有用であることが示された。次に、MECと比較してKLF4の発現が低いRECやSECに特徴的な遺伝子群の中にKLF4によって制御される遺伝子群がどの程度含まれているかをGene set enrichment analysisを用いて調べた。その結果、RECに特徴的な遺伝子群にKLF4の制御下にある遺伝子群が有意に濃縮されていることがわかった。このことは、我々が用いているMSCサブタイプの中のRECとMECの性質の違いは、KLF4の発現量が大きく関与していることを示唆しており、MSCサブタイプの関係性を理解する重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------