

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19646

研究課題名（和文）ステムセルエイジングの制御に向けた間葉系幹細胞未分化性維持機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of undifferentiated maintaining mechanism of stem cell towards the control of stem cell aging

研究代表者

窪木 拓男（Kuboki, Takuo）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：老化による間葉系幹細胞（MSCs）の能力低下が、加齢変化に伴う様々な疾患の発症に関与していることから、如何にMSCsの老化を防ぐかが重要な課題である。そこで本申請研究では、骨髄由来MSCs（BMSCs）の幹細胞性維持に必須な転写因子を同定することを目的とする。若齢マウスおよび老齢マウス由来MSCsの比較、ヒトBMSCsとヒト皮膚線維芽細胞の比較より、若齢マウス由来BMSCとヒトBMSCsに高発現している転写因子を抽出した。さらに、iPS干渉法を応用し、BMSCに重要な転写因子の抽出を行った。現在、BMSCsにおけるこれらの転写因子の機能を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究の成果は、幹細胞の老化を防ぐことによって、各種加齢性疾患の予防や治療に寄与するという全く新しい概念の提供に繋がると考える。また、本研究成果のさらなる発展により、MSCsの未分化性を維持する技術の開発やMSCsの誘導技術の応用に繋がると考える。これにより、全世界が目指しているiPS細胞からがん化しにくいMSCsを大量に作製するという夢の技術に結びつく可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Stem cells are required for lifelong homeostasis and regeneration of organs and tissues in mammals. However, aging of stem cells reduces cellular function and results in dysfunctional organs and tissues. Therefore, maintenance of the stemness of stem cells is of crucial importance, although its mechanisms are still unclear. The aim of this study was to identify the master regulator for the maintenance of stemness of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). First, we compared the RNA expression patterns between BMSCs derived from young and old mice, as well as between human BMSCs and human dermal fibroblasts using RNA-seq, and found that 30 transcription factors were highly expressed in BMSCs derived from young mice and in human BMSCs. Next, we found that several transcription factors could inhibit the induction to pluripotent stem (iPS) cells using iPS interfering method. The detailed function of these transcription factors in BMSCs are now being investigated.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：幹細胞 老化 iPS干渉 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国は超高齢社会に突入し、加齢性疾患（骨粗鬆症、歯周病、サルコペニア等）の増加が社会問題となっている。近年、この加齢変化が引き起こす疾患群に共通する本質的な変化として、ステムセルエイジングが注目されるようになった。我々は骨髄中の間葉系幹細胞（MSCs）が、組織の恒常性維持に寄与するのみならず、全身の免疫や炎症を調節するために重要な働きをなすことを報告してきた（Akiyama et al., *Cell Stem Cells*, 2012）。また、加齢に伴い、MSCs の免疫調節能が著明に低下すること、さらには、骨芽細胞分化能が低下し脂肪細胞分化に偏向するため、脂肪髄を呈することを報告してきた。したがって、未分化な MSCs のフラクシオンをいかに保つかが、これらの加齢性疾患の予防と治療に寄与するものと考えられるが、この MSCs の未分化性維持機構の分子基盤は、世界の多くの科学者の多大なる努力にもかかわらず十分明らかとなっていない。

そこで我々は、骨髄内の MSCs の未分化性維持機構を解明することを目的に研究を進め以下の事を明らかにしてきた。

1. DNMT3a が MSCs の未分化性維持に関与し、DNMT3a によって未分化性が保たれた MSCs は、脂肪細胞ではなく骨芽細胞に特異的に分化誘導される事を明らかにした（Hara et al., *PLoS ONE*, 2013, 一部未発表データ）。
2. 骨芽細胞の起源となる MSCs の未分化マーカーを新たに同定（Prx1・Sca1 共陽性 MSC=未分化 MSCs）し、MSCs から骨芽細胞が作られる詳細な過程を明らかにした（Takarada et al., *Development*, 2016）。

2. 研究の目的

本申請研究では、DNMT3a が MSCs の未分化性を維持する、若齢 MSCs の幹細胞性が高いなどの複数条件を利用した MSCs 未分化性維持に関わる転写因子の絞り込みを行う。次に、iPS 細胞樹立技術を逆手に取ったマスター遺伝子同定法（iPS 干渉）を駆使して、未だ誰もなし得ることのできなかつた間葉系幹細胞の未分化性維持に関わるマスター遺伝子を同定することを目的とする。本研究の発展は、骨髄内に骨造成を必要とする口腔インプラント治療や人工関節置換術のみならず、自己 MSCs の免疫調節能低下により起因する各種炎症性・退行性疾患の予防や治療に大きく寄与できると考える。

3. 研究の方法

(1) MSCs の未分化性維持に関わる転写因子の探索

エピジェネティック的観点からの探索

これまでの解析結果から、DNMT3a の遺伝子発現量は、若齢マウス由来 MSCs において有意に高く、DNMT3a を強制発現させた未分化 MSCs は骨芽細胞に分化誘導されるが、脂肪細胞への分化は抑制されることを明らかにしてきた。そのため、DNMT3a により転写領域のメチル化の on/off が制御されている遺伝子が MSCs の未分化性維持に関わっている可能性が高い。そこで、DNMT3a を強制発現した MSCs および、コントロールベクターを強制発現した MSCs から QIAGEN の Blood & Cell Culture DNA Mini Kit を用いて genomic DNA を抽出し、DNA メチル化アレイを実施する。

老化という時間軸の観点からの探索

若齢マウス骨髄由来 MSCs は老齢マウス骨髄由来 MSCs と比較し、未分化性が高いことをこれまで明らかにしてきた。そこで、若齢マウス骨髄および老齢マウス骨髄より MSCs をセルソーターにて単離し、RNA を精製し、RNA-seq 解析を実施する。

細胞間比較の観点からの探索

間葉系幹細胞の一つである、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hBMSCs）と間葉系細胞の一つであるヒト成人由来皮膚線維芽細胞（hADFs）の違いを明らかにすることが、MSCs に特異的な転写因子の発見に繋がると考える。そこで、hBMSCs と hADFs より RNA を精製し、RNA-seq 解析を実施する。

(2) 山中 4 因子および実験 1 にて抽出された転写因子の発現ベクターの作製およびレトロウイルスの作製

山中 4 因子および実験 1 にて抽出された転写因子の発現ベクターの作製

iPS 細胞へ誘導するのに必要な Nanog, Oct3/4, Sox2, Klf4 および実験 1 にて抽出された転写因子のレトロウイルスベクターを作製する。具体的には, Addgene より購入した pMXs-gw コンストラクトを用い, Gateway システムを用いて, レトロウイルス用のベクターを作製する。ヒト Gateway エントリークローンは独立行政法人 製品評価技術基盤機構から分与していただく。

レトロウイルスの作製および確認

レトロウイルスの作製には, Platinum レトロウイルス発現システム (Cell Biolabs Inc.) を用いる。具体的には, (2)- で作製したレトロウイルスベクターと pCMV-VSV-G ベクターを, PEI Max を用いて Plat-GP 細胞にトランスフェクションする。12 時間後に培地を交換し, さらに 24 時間培養し, 培地を回収する。そして, PEG it (System Biosciences) を用いてレトロウイルスを 10 倍濃縮して, -80 にて保存する。また, 完成したウイルスが機能するか, hBMSCs に遺伝子導入し, 3-6 日後に RNA を回収し, 定量性 RT-PCR 法にて評価する。

hBMSCs の iPS 細胞への誘導方法の確立

(2)- にて作製した Nanog, Oct3/4, Sox2, Klf4 (山中 4 因子) のレトロウイルスを hBMSCs の培地に加え, スピンフェクション法にて遺伝子導入する。そして, 2 日後にマイトマイシン C 処理した SNL 細胞を, 遺伝子導入した hBMSCs 上に播種する。培養 4 日後に, bFGF を含む PrimateES 培地に交換し, 約 1 ヶ月間培養し, コロニー形成の有無, Alkaline Phosphatase (AP) 染色の染色性を指標に評価する。

(3) iPS 干渉法による hBMSCs に必須な転写因子の絞り込み

実験(1)で抽出された 30 転写因子を一つずつ山中 4 因子と一緒に hBMSCs に遺伝子導入し, iPS 細胞への誘導を阻害する (iPS 干渉) 転写因子を抽出する。

(4) hBMSCs への誘導法の検討

実験(1)で抽出された 30 転写因子および実験(3)で絞り込まれた転写因子を hADF に遺伝子導入し, hBMSCs に誘導されるか, hBMSCs に特異的に発現している表面抗原である CD146 および多分化能を指標に評価する。

4. 研究成果

(1) MSCs の未分化性維持に関わる転写因子の探索

エピジェネティクスの観点からの探索

DNMT3a を強制発現した MSCs および, コントロールベクターを強制発現した MSCs から genomic DNA を抽出し, DNA メチル化アレイを実施した。そして, DNMT3a によってメチル化が off になっている転写因子を抽出した。

老化という時間軸の観点からの探索

若齢マウス骨髄および老齢マウス骨髄よりセルソーターにて単離した MSCs から RNA を精製し, RNA-seq 解析を実施した。本結果から, 若齢マウス由来 MSCs に高発現する転写因子を抽出した。

細胞間比較の観点からの探索

hBMSCs と hADFs より RNA を精製し, RNA-seq 解析を実施した。そして, hBMSCs に高発現している転写因子を抽出した。

実験 - の結果から, MSCs に重要な転写因子として, 30 因子を抽出した。

(2) 山中 4 因子および実験 1 にて抽出された転写因子の発現ベクターの作製およびレトロウイルスの作製

山中 4 因子および実験 1 にて抽出された転写因子の発現ベクターの作製

Gateway システムを用いて作製したレトロウイルス用のベクターが目的のものであるかをシーケンサーにて確認し、全てのレトロウイルスベクターの作製が成功していることを確認した。

レトロウイルスの作製および確認

-80 に保存したレトロウイルスを hBMSCs に遺伝子導入し、3-6 日後に RNA を回収した。そして、定量性 RT-PCR 法にて全てのウイルスで目的の遺伝子が強制発現できていることを確認した。

レトロウイルスの確認

培養時間、ウイルス量、細胞数等、様々な条件を検討し、hBMSCs を iPS 細胞に効率よく誘導する条件を確立した。その条件で誘導した iPS 細胞の写真および AP 染色の結果を図 1 に示す。

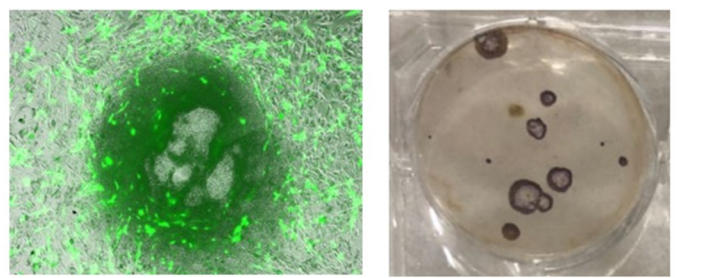


図1. 山中4因子とGFPを遺伝子導入し、28日間培養した。蛍光顕微鏡 (GFP)と位相差顕微鏡の画像をmergeした像を左図に示す。AP染色の染色結果を右図に示す。

(3) iPS 干渉法による hBMSCs に必須な転写因子の絞り込み

実験(1)で抽出した 30 転写因子の中に、iPS 細胞への誘導を阻害する (iPS 干渉)転写因子がいくつか存在することが明らかとなった。

(4) hBMSCs への誘導法の検討

フローサイトメトリー解析の結果、幹細胞マーカーと知られる CD146 の発現は、hADF5 は 5-10%程度に対し、hBMSCs は 85-95%程度であることを明らかにした。現在、本結果に基づき、様々な転写因子の組み合わせを hADF5 に遺伝子導入し、CD146 の発現を上昇させることが可能な転写因子セットの探索を行っている。

今後、MSCs の機能の一つである多分化能等も指標に入れ評価し、MSCs の未分化性維持に必須の転写因子を同定する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuboki T, Ichikawa T, Baba K, Fujisawa M, Sato H, Aita H, Koyama S, Hideshima M, Sato Y, Wake H, Kimura-Ono A, Nagao K, Kodaira-Ueda Y, Tamaki K, Sadamori S, Tsuga K, Nishi Y, Sawase T, Koshino H, Masumi SI, Sakurai K, Ishibashi K, Ohyama T, Akagawa Y, Hirai T, Sasaki K, Koyano K, Yatani H, Matsumura H	4. 巻 62(2)
2. 論文標題 A multi-centered epidemiological study evaluating the validity of the treatment difficulty indices developed by the Japan Prosthodontic Society.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Reserach	6. 最初と最後の頁 162-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komori T, Ono M, Hara ES, Ueda J, Nguyen HTT, Nguyen HT, Yonezawa T, Maeba T, Ono A, Takarada T, Momota R, Maekawa K, Kuboki T, Oohashi T	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Type IV collagen 6 chain is a regulator of keratin 10 in keratinization of oral mucosal epithelium.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Y, Hara E.S, Yoshioka Y, Nguyen H.T, Noshio S, Komori T, Ishibashi K, Oohashi T, Ono M, Kuboki T.	4. 巻 207
2. 論文標題 DNA Methylation-Based Regulation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Chondrogenic Differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells Tissues Organs	6. 最初と最後の頁 115-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000502885. Epub 2019 Oct 1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kuboki T
2. 発表標題 Biological Regenerative Medicine in Dental Practice -to Attain Reliable and Sophisticated Dental Therapy-.
3. 学会等名 Special Invited Lecture in ACTA 2018. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuboki T
2. 発表標題 Collaboration between Soft Tissue Management and Oral Implant Therapy to Attain Optium Esthetic Result.
3. 学会等名 Special Lecture in Haiphong 2018. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 枝松 緑, 小川美帆, 井出亮太郎, 窪木拓男, 大橋俊孝, 辻 孝, 大野充昭
2. 発表標題 scRNA-Seq解析を応用したマウス歯胚発生メカニズムの解明の試み
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ha Thi Thu Nguyen, Mitsuaki Ono, Emilio Satoshi Hara, Taishi Komori, Midori Edamatsu, Tomoko Yonezawa, Aya Kimura-Ono, Kenji Maekawa, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 Type XVIII collagen modulates the keratinization of oral mucosa
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
研究 分担 者	大野 充昭 (Ono Mitsuaki) (60613156)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宝田 剛志 (Takarada Takeshi) (30377428)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・研究教授 (15301)	
研究分担者	渡辺 亮 (Watanabe Akira) (60506765)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	
研究分担者	大野 彩（木村彩） (Ono Aya) (20584626)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	
研究分担者	秋山 謙太郎 (Akiyama Kentaro) (70423291)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	升井 伸治 (Masui Shinji) (20342850)	山梨大学・大学院総合研究部・特任准教授 (13501)	