

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06444

研究課題名(和文)細胞骨格の再構築による細胞分化および脱分化機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of cell differentiation and dedifferentiation by restructuring the cytoskeleton in vitro

研究代表者

加野 浩一郎(KANO, Koichiro)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80271039

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)：本研究は、細胞の「かたち」の変化が脱分化および多能性獲得といった細胞がもつ機能の転換を決定するかを明らかにする目的で行われた。ブタ卵胞顆粒層細胞(pGC)は培養皿底面に接着する培養6時間後に接着斑および線維状(F)アクチンを形成すると、アロマターゼ遺伝子などpGC特異的遺伝子群の発現が急速に低下した。一方、細胞骨格(CA)の形成に関与する遺伝子群は細胞が伸長する培養12時間後まで急速に増加した。pGCが脱分化する培養12時間後までに発現変動する遺伝子群の上流因子を解析した結果、細胞形態形成および細胞増殖に関与する2つの転写調節因子が抽出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「細胞は特異的な転写因子の発現によって機能的および形態的に分化する」と考えられているなかで、本研究によって、メカノストレスが普遍的に体細胞の分化運命決定を制御する分子メカニズムを明らかにすることは、細胞分化および多能性獲得における新しい概念を生み出すことができる。また、核内転写因子による細胞機能制御の分子メカニズムについては、既に多くの研究がなされているが、本研究で実施するメカノストレスが惹起する体細胞リプログラミングの普遍的な分子メカニズムの解明に取り組むことは、外来遺伝子の導入を必要としない新規の人工多能性細胞の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to determine whether changes in "cell shape" determine the conversion of cellular functions such as dedifferentiation and multipotency. When porcine follicular granulosa cells (pGC) formed focal adhesion and F-actin after 6 hours of culture on the bottom of the culture dish, the expression of pGC-specific genes, such as aromatase genes, was decreased rapidly. In contrast, the expression of genes involved in cytoskeleton (CA) formation rapidly increased until 12 hours of culture, when cells elongated. We analyzed the upstream regions of genes whose expression increased significantly until 12 hours of culture when pGC de-differentiated. As a result, two transcriptional regulator genes involved in cell shape and cell proliferation were extracted.

研究分野：動物生命科学

キーワード：細胞接着 増殖 脱分化 多能性獲得 転写調節因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、体細胞に複数の転写因子遺伝子を導入することによって、多能性細胞 (iPS細胞) あるいは機能的な分化細胞へと直接リプログラミングを誘導できることが明らかにされている (Takahashi and Yamanaka, 2006; Ieda et al., 2010)。このことは、導入した転写因子の発現によって、元々の細胞に特異的な遺伝子セットの発現パターンから各々の分化状態特異的な遺伝子セットの発現パターンへと変化することを示している。すなわち、細胞の運命決定は主たる転写因子の発現によって直接制御される。我々は、前駆脂肪細胞株において、細胞のかたちを決定するアクチン細胞骨格の動態を制御するRhoA/ROCKシグナルが不活化し、線維状のF-アクチンファイバー (F-form) が脱重合することによって、単量体G-アクチン (G-form) が増加し、そのG-アクチンが転写調節因子のMKL1と直接結合して核移行および転写調節活性を阻害することによって、脂肪分化マスター転写因子のPPAR γ の発現をONにし、脂肪細胞へと終末分化することを見出した (Nobusue et al., 2014)。これらのことは、細胞の形態という物理的要素が直接転写を制御し、細胞運命を決定するという極めてユニークなメカニズムであることを示している。従って、MKL1はアクチン動態に応答するメカノセンサー分子としてだけでなく、細胞骨格の動態および張力を直接制御するメカノストレス誘導因子として働き、体細胞の運命に関与すると考えられる。また、我々は、終末分化した成熟脂肪細胞および卵胞顆粒層細胞を体外培養することで、自発的に脱分化誘導することによって、間葉系幹細胞に類似した多能性細胞を簡便かつ大量に取得できることを報告した (Matsumoto et al., 2008; Oki et al., 2012)。これらの結果は、iPS細胞作製で示された転写因子遺伝子の導入による制御とは異なる仕組みによって、終末分化した体細胞がリプログラミングすることを示唆している。また、この過程において、それぞれの分化細胞に特異的な細胞形態を変化させて、いずれも線維芽細胞様の形態を示すことから、細胞形態の変化が自発的な脱分化および多能性獲得を誘導すると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、MKL1の発現制御により生じるメカノストレスが、どのような分子メカニズムを介して、細胞の運命決定さらにはリプログラミングを制御しているか、そのメカノバイオロジー機構の一端を解明することを目的とした。具体的には、ブタ卵胞顆粒層細胞 (pGC) の脱分化過程において観察される細胞接着、細胞の伸長および細胞増殖時におけるpGCの遺伝子発現の経時的変化を網羅的に解析した。脱分化に伴って発現変動する遺伝子群の上流域に存在する転写調節因子 (脱分化制御因子) の抽出を試みた。

3. 研究の方法

(1) ブタpGCの脱分化過程における遺伝子発現プロファイルの取得

生後 6~7 ヶ月齢のブタ卵巣から直径 4~6mm の胞状卵胞を切り出し、卵胞内の壁顆粒層細胞を採取したのち、コラゲナーゼ処理して pGC を単離した。採取直後、培養 6、12、18 および 24 時間後に pGC の細胞形態およびアクチン細胞骨格の形成状況を観察したのち、全 mRNA を抽出した。その後、それぞれの mRNA をマイクロアレイ (GeneChip Porcine Genome Array) を用いて遺伝子発現プロファイルを取得した。

(2) 遺伝子発現プロファイルの解析

統計処理ソフトの R を用いて、取得したマイクロアレイデータを正規化処理したのち、主成分分

析、クラスター解析して pGC の脱分化過程における遺伝子発現状況を調べた。

(3) ブタのマイクロアレイプローブにおけるアノテーション情報の取得と付与

ブタのマイクロアレイチップに搭載されているプローブの情報は、Affymetrix 社から取得した。ヒトの遺伝子機能情報は、真核生物のゲノムデータベースである Ensembl BioMart を用いて取得した。また、ブタおよびヒト cDNA の配列相同性検索については、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) の tblastx を用いて行った。ブタのプローブ ID に対応するヒトの遺伝子機能情報の付与については、データ分析・可視化ツールソフトである TIBCO Spotfire を用いて取得した。

(4) 発現差のある遺伝子群の抽出

発現差のある遺伝子群の抽出は、TIBCO Spotfire を使用して行なった。上記 (2) で各クラスターに分類されたサンプルデータの遺伝子発現強度を平均化し、各クラスター間で 2 倍以上発現が変動した遺伝子群の上流域に存在する因子群を抽出した。ついで、各培養時間後における pGC の間において 2 倍以上発現変動した遺伝子群を Ingenuity pathway analysis (IPA) によって解析した。

4. 研究成果

(1) pGC の脱分化過程における細胞形態および遺伝子発現プロファイルの変化

培養 0、6、12、18 および 24 時間後の pGC の細胞形態の変化を観察するとともに、遺伝子発現状況をマイクロアレイ (MA) 解析して調べた。その結果、培養 6 時間後、pGC の約 60% が培養皿底面に付着した。培養 12 時間後には、ほとんどの pGC が培養皿底面に付着し、一部では細胞が伸展した。

培養 18 および 24 時間後になると細胞が伸長し、線維芽細胞様の形態を示す pGC が観察された。遺伝子発現プロファイルは、培養 0 時間後から pGC が培養皿の底面に付着した培養 6 時間後において著しく変化した。その後、pGC の細胞形態は培養時間の経過に伴って伸長し、培養時間の経過に伴って GEP は培養 24 時間後に類似した遺伝子発現状況へと変化することが明らかになった (図 1)。

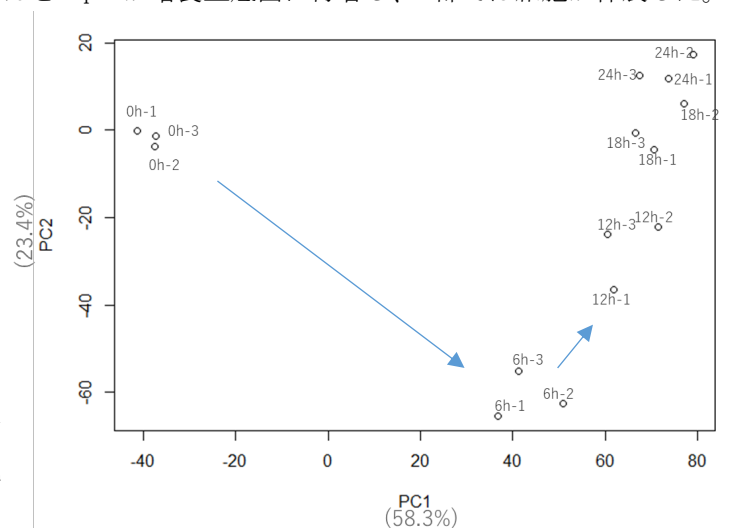


図 1. pGC の脱分化過程における遺伝子発現状況

(2) pGC 特異的遺伝子および細胞骨格形成に関連する (CA) 遺伝子の発現解析

培養 0 時間後における pGC 特異的遺伝子であるアロマターゼ遺伝子の発現は高い値を示したが、pGC が培養皿の底面に付着した培養 6 時間後に著しく低下した。その後、培養時間の経過に伴ってアロマターゼ遺伝子の発現は低下し、培養 24 時間後には発現が認められなくなった。

培養 0 時間後の pGC に接着斑およびアクチンファイバーは観察されなかった。培養 6 時間後の pGC は培養皿へ接着し、一部の細胞では接着斑およびアクチンファイバーが観察された。また、F アクチンなどの CA 遺伝子の発現は培養 6 から 12 時間後まで急速に増加した。以上の結果から、pGC は培養皿に付着すると細胞骨格を再構築することによって脱分化が誘導されることが示唆された。

(3)pGC の脱分化を誘導する因子の抽出

上記(1)および(2)の結果から、培養 6 から 12 時間後に発現変動する遺伝子群の上流因子を IPA によって解析した。その結果、アクチン細胞骨格の形成および細胞増殖に関与する 2 つの転写調節因子の抽出に成功した。以上の結果から、pGC は 2 つの転写調節因子によって培養 6 時間以内に脱分化が惹起されることが示唆された。

<引用文献>

1. Takahashi & Yamanaka, *Cell*, 126(4):663-676, 2006.
2. Ieda et al., *Cell*, 142(3):375-386, 2010.
3. Nobusue et al., *Nat Commun*, 5:3368, 2014.
4. Matsumoto et al., *J Cell Physiol*, 215(1):210-222, 2008.
5. Oki et al., *Biochem J*, 447(2):239-248, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Oki Yoshinao, Hagiwara Reiko, Matsumaru Takashi, Kano Koichiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Effect of volatile fatty acids on adipocyte differentiation in bovine dedifferentiated fat (DFAT) cells in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 5~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanimoto Koji, Matsumoto Taro, Nagaoka Yuki, Kazama Tomohiko, Yamamoto Chii, Kano Koichiro, Nagaoka Masahiro, Saito Shu, Tokuhashi Yasuaki, Nakanishi Kazuyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Phenotypic and functional properties of dedifferentiated fat cells derived from infrapatellar fat pad	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 35~46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.j.reth.2021.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Murata Yasutaka, Obinata Daisuke, Matsumoto Taro, Ikado Yuichiro, Kano Koichiro, Fukuda Noboru, Yamaguchi Kenya, Takahashi Satoru	4. 巻 54
2. 論文標題 Urethral injection of dedifferentiated fat cells ameliorates sphincter damage and voiding dysfunction in a rat model of persistence stress urinary incontinence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Urology and Nephrology	6. 最初と最後の頁 789~797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11255-021-03083-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hagiwara Reiko, Oki Yoshinao, Matsumaru Takashi, Ibayashi Shiho, Kano Koichiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Generation of metabolically functional hepatocyte like cells from dedifferentiated fat cells by Foxa2, Hnf4a and Sall1 transduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 811-824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishioka Shigeki, Hosokawa Takashi, Ikeda Taro, Konuma Noriyoshi, Kaneda Hide, Ohashi Kensuke, Furuya Takeshi, Masuko Takayuki, Taniguchi Hiroaki, Kano Koichiro, Koshinaga Tsugumichi, Matsumoto Taro	4. 巻 36
2. 論文標題 Therapeutic potential of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells for inflammatory bowel disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 799-807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-020-04681-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Rei, Kitanaka Taku, Namba Shinichi, Kitanaka Nanako, Sato Masaki, Shibukawa Yoshiyuki, Masuhiro Yoshikazu, Kano Koichiro, Matsumoto Taro, Sugiya Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 All-trans retinoic acid induces reprogramming of canine dedifferentiated cells into neuron-like cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunitomi Haruko, Oki Yoshinao, Onishi Nobuyuki, Kano Koichiro, Banno Kouji, Aoki Daisuke, Saya Hideyuki, Nobusue Hiroyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 The insulin PI3K Rac1 axis contributes to terminal adipocyte differentiation through regulation of actin cytoskeleton dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 165 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Google Scholar
<https://scholar.google.com/citations?user=anqclM3wAAAAJ&hl=en>

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
---------	---------