

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02471

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の基質の硬さ依存的な分化誘導機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of rigidity-dependent differentiation of mesenchymal stem cells

研究代表者

水野 健作 (Mizuno, Kensaku)

東北大学・生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：70128396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、間葉系幹細胞(MSC)の基質の硬さ依存的な分化誘導機構を解明し、細胞の力覚応答の分子機構を解明することを目的とした。特に、力覚応答におけるアクチン骨格再構築の制御機構を解明するため、Rhoファミリーの活性化因子であるRhoGEF分子群について、MSCの脂肪細胞分化に關与するものを網羅的に探索した。その結果、脂肪細胞分化の促進に寄与するRhoGEFを7種類、抑制に寄与するRhoGEFを14種類同定した。後者のうち10種はRhoAに対するGEFであり、そのうち6種は力覚応答への関与が報告されており、これらのRhoGEFは、基質の硬さ依存的なMSCの分化を制御し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

本研究によって、アクチン骨格の再構築を介して間葉系幹細胞(MSC)の脂肪細胞分化を促進及び抑制するRhoGEFを多数同定することに成功した。MSCは、成体から単離することが可能な多能性の幹細胞であり、再生医療の有望なシースであるが、その分化誘導や未分化状態を維持して培養することが未だ困難である。今回の成果は、MSCが外部の力学的環境に応じて分化方向を決定する新たな分子機構の発見につながるるとともに、MSCを効率良く任意の細胞へ分化させる方法や多分化能を維持して大量に培養する技術の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our research aimed to elucidate the molecular mechanism of substrate stiffness-dependent differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) through actin cytoskeletal remodeling. RhoGEFs, activators of Rho small GTPases, contribute to each function of actin remodeling that has diversified during evolution in higher organisms. We comprehensively searched for the RhoGEFs that are involved in adipocyte differentiation of MSCs using RNA interference method, and identified 7 and 14 RhoGEFs as contributing to the promotion and suppression of adipocyte differentiation, respectively. Ten of the 14 RhoGEFs that inhibit adipocyte differentiation are RhoA-targeting GEFs, six of which were reported to be involved in mechanical stress responses. These results suggest that these RhoGEFs regulate MSC differentiation in a manner dependent on substrate stiffness.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 脂肪細胞分化 アクチン骨格 Rho RhoGEF 力覚応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)は、多分化能を有する体性幹細胞であり、液性因子による分化誘導とともに、外環境の硬さの違いによって分化する方向が変化することが知られている。すなわち、軟らかい基質上で培養すると脂肪細胞や神経細胞へ分化し、硬い基質上で培養すると筋肉や骨の細胞へ分化する。このような応答は、細胞が基質の硬さという機械的刺激を感知して応答する力覚応答の一つであり、未分化な幹細胞が自身のおかれた力学的環境に合わせて適切な分化方向を決定する重要な制御機構である。しかし、MSCが、接着する基質の硬さを感知する機構や、硬さに応じて分化方向を決定しシグナルを伝達する機構は未だ不明な点が多く残されている。細胞が機械的な刺激を感知し応答するには、細胞の接着部位に連結した細胞骨格構造の変化が必要であり、特にアクチン骨格はその感知から応答に至る様々な過程に深く関与していることが示唆されている。私たちはこれまで、細胞の力覚応答におけるアクチン骨格の再構築の制御機構について、低分子量G蛋白質Rhoファミリーの活性化因子であるRhoGEFに注目して研究を行ってきた。RhoGEFはヒトゲノムに約80種類存在するが、これは進化の過程で複雑になった細胞機能に応じてRhoGEFが多様化したと考えられ、基質の硬さに依存したMSCの分化の制御についても特異的に作用するRhoGEFが存在すると推測される。しかし、RhoGEFの遺伝子数の多さから、MSCの分化に関与するRhoGEFについての知見は限られており、その作用機序はほとんど不明である。これらの背景から、細胞の力覚応答機構、特にアクチン骨格の再構築を介して基質の硬さに応答したMSCの分化を制御する分子機構を解明するために、特異的に働くRhoGEFを網羅的に探索・同定し、そのRhoGEFを中心に上流と下流のシグナル経路を解析し、力覚応答に関わるシグナル伝達機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、MSCの分化誘導において、基質の硬さ依存的な分化誘導とその方向の決定に関与するアクチン骨格の再構築を介した分子機構の解明を目的とする。特に、アクチン骨格の再構築を制御するRhoファミリーの活性制御に注目し、Rhoファミリーの活性化因子であるRhoGEFについて、MSCの分化に関与するものを網羅的に探索する。この解析から見出したRhoGEFについて、その上流と下流で働く分子を同定し、基質の硬さを感知してMSCの分化誘導を行うセンサー機構とその分化方向を決定するシグナル伝達経路の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞の分化誘導と分化の定量解析

Lonza社より購入したヒト骨髄由来間葉系幹細胞を10%の血清を含むDMEMで培養した。分化誘導には10回以内の継代回数の細胞を用いた。脂肪細胞、骨細胞への分化誘導は各々の分化誘導培地を用いた。初日に10%のFBSのみを含むDMEMを用いて播種を行い、翌日に各誘導培地へ交換し、その後は3日に1度培地交換を行い、14日間の培養により分化を誘導した。脂肪細胞分化の

定量は、Oil Red Oで細胞内の油滴を染色した細胞の明視野画像を二値化して視野内の油滴部分の面積を測定し、その値を視野内の細胞数で除した値を用いた。

(2) MSCの脂肪細胞分化に關与するRhoGEFの発現抑制によるスクリーニング

ヒトRhoGEFのほぼ全てに相当する73種類のRhoGEFについて、各々2つの異なる配列のsiRNAを購入して用いた (Thermo Fisher社 Silencer® Select siRNA)。Negative ControlのsiRNAとして、Silencer® Select Negative Control #1 siRNAを用いた。siRNAの細胞への導入はRNAiMax (Invitrogen)を用いた。48 well plateに培養したMSCに対して各siRNAを終濃度20 nMで導入後、増殖培地、または、脂肪細胞分化誘導培地で14日間培養し、Oil Red Oによる細胞内の油滴とDAPIによる核の染色を行った。これを3回繰り返し、脂肪細胞分化の程度を解析した。

(3) 基質の硬さを調節したハイドロゲルの作製

基質の硬さを調整するためにアクリルアミドゲルを用いた。硬さの調整は、2.5 kPa, 10 kPaの場合、アクリルアミド、ビスアクリルアミドの比率を各々4% : 0.15%, 10% : 0.1%で重合させた。ゲル表面にSulfo-SANPAHを紫外線照射してクロスリンクし、その後、フィブロネクチンを結合させ、MSCを播種する基質面とした。

(4) 脂肪細胞分化誘導とYAPの細胞内局在に対する基質の硬さの影響の解析

硬さの異なるアクリルアミドゲル上に播種したMSCを分化誘導培地で14日間培養後、固定し、細胞内の油滴と核を各々Lipi-Deep RedとDAPIで染色し、さらに、YAPを特異的抗体で蛍光染色し、油滴の形成とYAPの細胞内局在の相関を解析した。

4. 研究成果

(1) MSCの分化誘導に対するRhoGEFの発現抑制による解析方法の確立

本研究では、約 80 種類存在する RhoGEF の中から MSC の分化誘導に關与するものを網羅的に探索するため、再現性が良く、同時に多サンプルの解析が可能なアッセイ方法が求められた。MSC は、骨細胞と脂肪細胞への分化がよく研究されており、薬剤・化学物質による分化誘導および分化マーカーによる評価系が確立されていることから、これらの分化誘導の再現性を検証

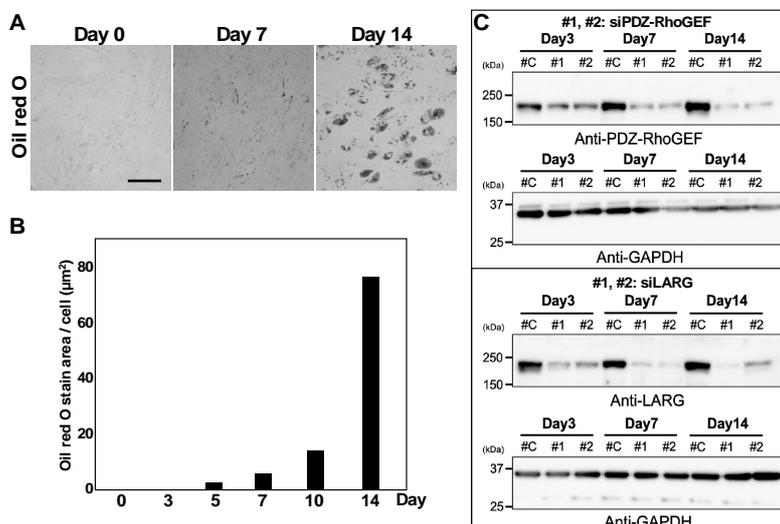


図1. 脂肪細胞分化過程に關与するRhoGEFのスクリーニングの条件検討。A. MSCの脂肪細胞への分化のタイムコース。MSCを分化誘導培地で示した日数培養し、細胞内の油滴をOil red Oにより染色した。Scale bar: 500 µm。B. Aの培養条件の細胞について、1視野内のOil red Oの染色面積を視野内の細胞数で除した値の培養日数による変化を示す。C. siRNAによる発現抑制の効果の持続日数の検討。コントロールsiRNA (#C)とヒトPDZ-RhoGEFとヒトLARGに対する各2種類のsiRNAをSMCに導入し、7日ごと14日後のPDZ-RhoGEF、LARGの発現量を各々の特異的抗体で検出した。

した。その結果、骨芽細胞への分化誘導は多サンプルの処理では安定した結果が得られなかったのに対し、脂肪細胞への分化誘導は、安定して再現することや脂肪細胞への分化の程度を細胞内の油滴の大きさに簡便に定量的に検出できることが明らかになった(図 1A, B)。そのため、まず、脂肪細胞への分化を対象に、関与する RhoGEF のスクリーニングを行うこととした。また、MSC の脂肪細胞への分化誘導は、2 週間程度の時間がかかるため、siRNA による発現抑制の持続効果を同時に検討した。発現抑制の検討は、内在性の蛋白質を抗体で検出することができる PDZ-RhoGEF と LARG について行った。siRNA を導入後、その発現の低下の持続期間を解析した結果、分化誘導が十分観察できる 14 日後でも発現抑制の効果が持続することを確認した(図 1C)。

(2) 発現抑制による間葉系幹細胞の脂肪細胞分化に関与するRhoGEFの網羅的探索

前項の条件を元に、入手できた73種類のRhoGEFに対するsiRNAを用いて発現抑制を行い脂肪細胞分化への影響を解析した。各々の遺伝子について2種類の配列の異なるsiRNAを用い、ネガティブコントロールにはヒトゲノムに存在しない配列を用いた。発現抑制を行った細胞を増殖培地、または、分化誘導培地で14日間培養し、細胞内に形成された油滴の形成を定量的に測定した。その結果、増殖培地にて培養したMSCでは、発現抑制によって脂肪細胞分化誘導するRhoGEFは存在しなかった。これに対し、分化誘導培地で培養した場合、程度は異なるが脂肪細胞分化を促進するものと抑制するものが検出された(図2)。脂肪細胞分化に対する影響の判断基準として、コントロールに対する油滴形成の程度に閾値を設けて選別し、脂肪細胞分化を促進した14種類と抑制した7種類を以後の解析対象とした(図2)。

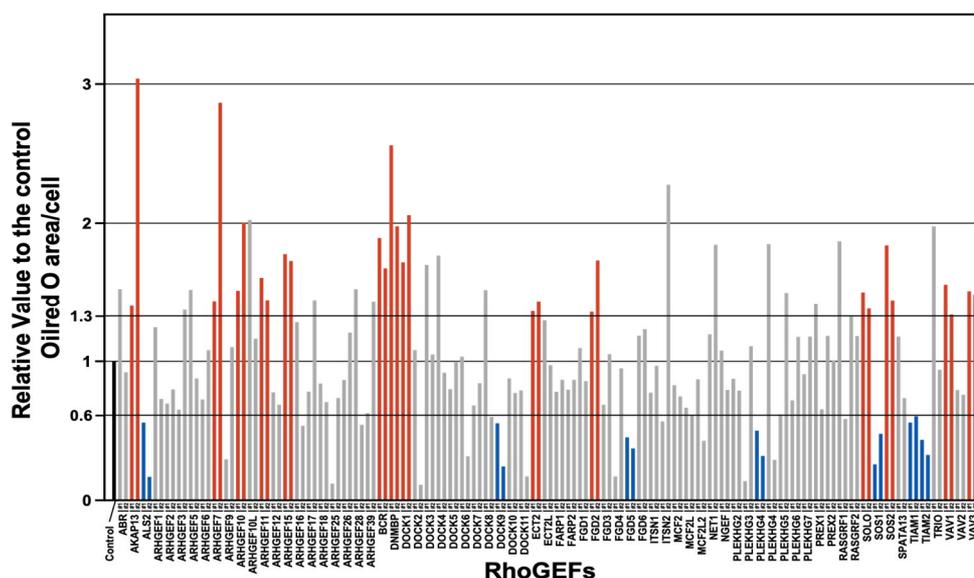


図2. 脂肪細胞分化過程に関与するRhoGEFのスクリーニング。MSCに各RhoGEFにつき2種類のsiRNAを導入した細胞を14日間分化誘導培地で培養し、Oil Red Oにより細胞内の油滴を染色した。Control siRNAを導入したMSCにおける1細胞あたりのOil Red Oの染色面積を1として、各siRNAを導入した細胞の相対値を算出した。この実験を3回行い、その平均値を示している。この中で、2種類のsiRNAともに値がコントロールよりも1.3倍高いものを脂肪細胞分化が促進されたもの(赤)、0.6倍よりも小さいものを脂肪細胞分化が抑制されたもの(青)と定義した。

(3) 脂肪細胞分化に関する RhoGEF の機能による分類

今回の発現抑制によるスクリーニングで脂肪細胞分化を促進した14種類のうち10種類はRhoAのGEFであり、脂肪細胞分化を抑制する7種類にはRhoAのGEFは同定されなかった。脂肪細胞への分化に対してRhoAは分化の抑制に働くことが示されていることから、これらのRhoGEFはRhoAの活性化を介して脂肪細胞への分化を抑制していると考えられる。これに対し、脂肪細胞分化を抑制したものはRac1とCdc42のGEFであることから、これらのRhoGEFによるRac1とCdc42の活性化は、脂肪細胞分化を促進することが示唆された。また、発現抑制により脂肪細胞分化を促進した10種類のRhoAの

GEFのうち6種類が基質の硬さや力覚応答に関わるRhoGEFとして報告されているものであった。これらの中に基質の硬さに依存して脂肪細胞分化の抑制に関与するRhoGEFが存在することが示唆された(表1)。

脂肪細胞分化促進		脂肪細胞分化抑制	
Protein Symbol	標的 RhoGTPase	Protein Symbol	標的 RhoGTPase
AKAP13 *	RhoA	ALS2*	Rac1
ARHGEF10 *	RhoA	FGD5	Rac1
ARHGEF11 *	RhoA	SOS1	Rac1
ARHGEF15 *	RhoA	TIAM1	Rac1
BCR *	RhoA	TIAM2	Rac1
ECT2	RhoA	DOCK9	Cdc42
SOLO *	RhoA	PLEKHG4	Cdc42
VAV3	RhoA/Rac1		
VAV1	RhoA/Cdc42		
ARHGEF7	RhoA		
DOCK1	Rac1		
SOS2	Rac1		
DNMBP	Cdc42		
FGD2	Cdc42		

* 機械刺激応答に関与することが報告されているもの

(4) 基質の硬さによる脂肪細胞分化誘導とYAPの局在変化

網羅的なスクリーニングによって得られたRhoGEFの中から、基質の硬さによる脂肪細胞分化の抑制、促進に働くものを同定するために、基質の硬さに依存した脂肪細胞分化に対するRhoGEFの働きを解析する方法を検討した。購入したMSCでは、基質の硬さのみで分化誘導が起こらないことから、アクリルアミドを用いたハイドロゲルによって硬さを調整した基質を作製し、それらの上で分化培地にてMSCを培養することで、分化の程度に差異が生じるかを検討した。その結果、軟らかい基質上で培養したMSCは、脂肪細胞分化が促進される傾向が見られた(図3)。

また、硬い基質上では核内に移行し脂肪細胞分化を抑制することが知られている転写調節因子YAPの細胞内局在を解析した。その結果、脂肪細胞に分化したMSCでは、YAPの核移行が抑制されていることが示された(図3)。このように基質の硬さを調節して分化誘導を行うことで、今回同定したRhoGEFの基質の硬さ依存的な脂肪細胞分化における機能解析を進めることができると思われる。

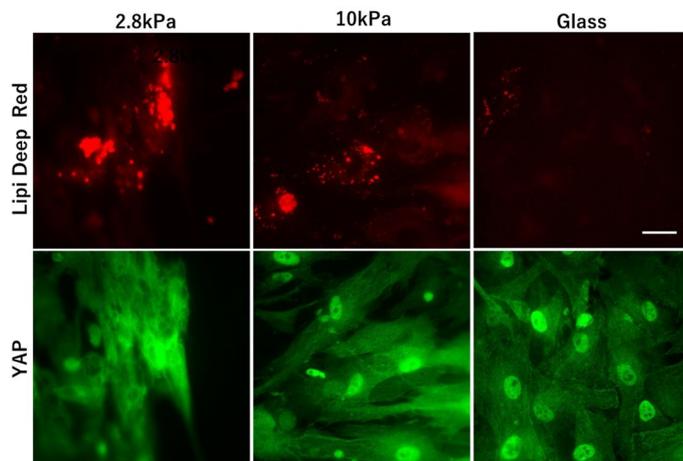


図3. MSCの脂肪細胞分化とYAPの細胞内局在変化に対する基質の硬さの影響。MSCを硬さの異なるアクリルアミドゲルとガラスに播種し、脂肪細胞への分化誘導培地で培養し、9日間培養後、Lipi Deep Redにより細胞内の油滴を染色し、同時に、YAPを特異的抗体で染色した。Scale bar: 25 μ m.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ninomiya K, Ohta K, Kawasaki U, Chiba S, Inoue T, Kuranaga E, Ohashi K, Mizuno K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Calcium influx promotes PLEKHG4B localization to cell-cell junctions and regulates the integrity of junctional actin filaments.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Cell	6. 最初と最後の頁 ar24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E23-05-0154	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 該当する

1. 著者名 Kunitomi, A., Chiba, S., Higashitani, N., Higashitani, A., Sato, S., Mizuno, K., and Ohashi, K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Solo regulates the localization and activity of PDZ-RhoGEF for actin cytoskeletal remodeling in response to substrate stiffness.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Cell	6. 最初と最後の頁 ar87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E23-11-0421	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15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大橋 一正、磯崎 友亮、小野 菜摘、小松 聖武、國富 葵、小廣 健太、鹿子嶋 克彦、水野 健作
2. 発表標題 細胞接着部位を介した力覚応答制御におけるRhoGEF, Solo の機能解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二宮 小牧、太田 海、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 PLEKHG4B による細胞間接着形成過程のアクチン骨格再構築メカニズム
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國富 葵、佐藤 博紀、東谷 なほ子、東谷 篤志、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 力覚応答機構に関するRhoGEF, Soloの相互作用タンパク質の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎 右京、小松 聖武、丸田 陸、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 力覚応答に関する RhoGEF, Soloの細胞間接着部位への局在機構の解明
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國富 葵、佐藤 博紀、東谷 なほ子、東谷 篤志、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 メカノストレス応答に関する RhoGEF, Soloのプロテオーム解析による結合タンパク質の同定と機能解析
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 祥太郎、鈴木 充喜、二宮 小牧、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 Screening of RhoGEFs involved in adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二宮 小牧、太田 海、大橋 一正、水野 健作
2. 発表標題 Calcium influx promotes junctional localization of Cdc42-targeting GEF, PLEKHG4B, to organize junctional action structure in epithelial cells
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國富 葵、佐藤 博紀、東谷 なほ子、東谷 篤志、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 Analysis of interaction between PDZ-RhoGEF and Solo, a RhoGEF involved in mechanoresponse
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川崎 右京、丸田 陸、小松 聖武、水野 健作、大橋 一正
2. 発表標題 Solo, a RhoGEF involved in mechanoresponse, requires plakoglobin to localize to cell-cell adhesion sites
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazumasa Ohashi, Aoi Kunitomi, Ukyo Kawasaki, Riku Maruta, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno
2. 発表標題 Functions and molecular mechanisms of Solo, a RhoGEF, in mechanical stress responses
3. 学会等名 International Symposium on Mechanobiology for Human Health: 8 years progress in The AMED-CREST/PRIME project on mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大橋一正、川崎右京、丸田陸、國富葵、千葉秀平、水野健作
2. 発表標題 Function of Solo, a RhoGEF, in mechanotransduction via actin and keratin cytoskeletal remodeling
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 國富 葵、千葉秀平、東谷篤志、東谷なほ子、水野健作、大橋一正
2. 発表標題 メカノストレス応答に関するRhoGEF, SoloはPDZ-RhoGEFと共役してアクチン骨格を制御する
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 國富葵、千葉秀平、東谷篤志、東谷なほ子、水野健作、大橋一正
2. 発表標題 SoloとPDZ-RhoGEFの相互作用を介したメカノストレス応答におけるアクチン骨格の制御機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川崎右京、小松聖武、丸田 陸、水野健作、大橋一正
2. 発表標題 RhoGEF, Soloは細胞間接着部位でケラチン繊維網を構築して上皮細胞層に機械的強度を与える
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kunitomi A., Chiba S., Higashitani A., Higashitani N., Mizuno K., Ohashi K.
2. 発表標題 The interaction of Solo and PDZ-RhoGEF regulates actin cytoskeletal remodeling in mechanical stress response
3. 学会等名 Cell Bio 2023- An ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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

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		
米国	Johns Hopkins University		