

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592068

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞の多分化能を制御する転写因子の機能解析

研究課題名（英文） functional analysis of transcription factors which control multipotency of mesenchymal stem cells

研究代表者

河本 健 (TAKESHI KAWAMOTO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：50224861

研究成果の概要（和文）：

未分化な間葉系幹細胞で発現が高い転写因子に注目して、その過剰発現およびノックダウンの影響について検討した。いくつかの遺伝子のノックダウンでは、細胞増殖および骨分化能の低下が認められた。転写制御のカスケードの中での相互の調節を検討したところ、SIM2 が上位に位置していた。これらのことから、これらの間葉系幹細胞特異的転写因子が、増殖・分化の調節に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

To analyze the function of mesenchymal stem cell-specific transcription factors, we performed overexpression and knockdown experiments of these factors. Knockdown of some transcription factors inhibited growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. SIM2 seems to be the master gene in the cascade of transcriptional regulation in the stem cells. These results indicate that these transcription factors are involved in the growth and differentiation of mesenchymal stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：間葉系幹細胞，細胞分化，転写因子，再生医療

1. 研究開始当初の背景

未分化な間葉系幹細胞(MSC)は、骨・軟骨・脂肪・その他の様々な細胞に分化する能力（多分化能）を持ち、口腔組織の発生・成長・再生において重要な働きを果たしている。さらに、再生医療のための細胞のソースとしても有用である。骨分化・軟骨分化・脂肪分

化などの分化制御の調節機構は、近年、分子レベルで明らかにされてきたが、一方、分化する前の未分化細胞の制御機構については、あまり解明されていない。しかし、過去の研究成果を再生医療など応用するためには、未分化な細胞がどのように制御されているのかを解明することが必須である。

間葉系幹細胞の特徴はその多分化能にあるが、その能力はいかにして未分化性を維持したまま自己複製するかという能力に大きく依存している。われわれは、未分化な間葉系幹細胞で発現が高い9つの転写因子 (SOX11, ETV1, ETV5, HMGA2, FOXP1, GATA6, KLF12, PRDM16, SIM2) を間葉系幹細胞の未分化制御転写因子 (MSC 転写因子) として同定した。我々は、これらの転写因子が転写因子ネットワークを形成しているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

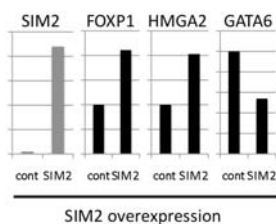
我々が同定した MSC 転写因子の中でも、ネットワークの重要な位置を占めると思われる FOXP1, SIM2, HMGA2, GATA6, ETV1, SOX11 に焦点を絞る。これらの間葉系幹細胞などに導入過剰発現し、その遺伝子が他のマーカー遺伝子発現への影響や、細胞の分化能の増殖能・分化能に対する影響を検討する。さらに siRNA を導入しこれらの転写因子のノックダウンの影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) クローニング：これらの遺伝子の cDNA を RT-PCR 法で増幅してクローニングした。さらにシーケンスによってそれを確認した。
 (2) ウイルスベクターの作成：これらをレンチウイルスベクター pLenti6 にクローニングした。
 (3) 作成したベクターをウイルス産生細胞に導入して、培養上清からウイルスを回収した。
 (4) 間葉系幹細胞に作成したウイルスを導入して高発現を行った。
 (5) ウイルス導入細胞から RNA を回収し、導入遺伝子の過剰発現および間葉系幹細胞のマーカー遺伝子の発現の変化を探索した。
 (6) siRNA を導入して RNA を回収し、同様の検討を行った。
 (7) 導入細胞において細胞増殖を WST8 アッセイで検討した。
 (8) 導入細胞を骨分化誘導し、分化に対する影響を検討した。

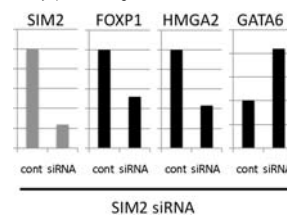
4. 研究成果

(1) SIM2 過剰発現の影響：SIM2 発現ウイルスを間葉系幹細胞に導入したところ、SIM2 が数 100 倍過剰発現した。間葉系幹細胞特異的転写因子である FOXP1 と HMGA2 を約 2 倍発現が上昇した。逆に GATA6 の発現は 50% 低下した。

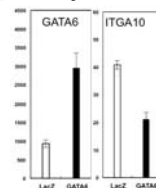


(2) SIM2 ノックダウンの影響：SIM2 siRNA を間葉系幹細胞に導入したところ、SIM2 の発現が 80% 低下した。また、FOXP1 と HMGA2 の発

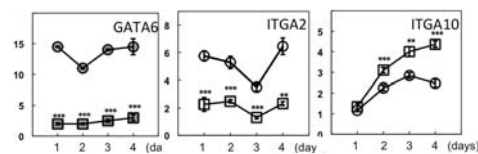
現は 50% 低下した。逆に GATA6 の発現は 2 倍に上昇した。



(3) GATA6 過剰発現の影響：GATA6 発現ウイルスを間葉系幹細胞に導入したところ、GATA6 の発現が 5 倍過剰発現した。間葉系幹細胞の分化に関連がある ITGA10 の発現が 50% 低下した。

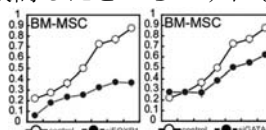


(4) GATA6 のノックダウンの影響：GATA6 siRNA を間葉系幹細胞に導入したところ、GATA6 の発現が 4 日間低下し続けた。その結果、間葉系幹細胞マーカーである ITGA2 の発現が大幅に低下した。逆に ITGA10 の発現は 2 倍に上昇した。

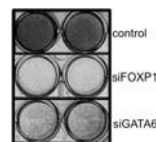


(5) その他のウイルスベクターの影響：HMGA2, ETV1, SOX11 のウイルスベクターも導入したが、マーカー遺伝子の動きはあまり顕著ではなかった。

(6) 間葉系幹細胞増殖への影響：FOXP1 および GATA6 に対する siRNA を導入して細胞増殖を検討したところいずれも低下した。



(7) 間葉系幹細胞分化への影響：細胞の骨分化を誘導し、アリザリンレッドによって評価した。いずれも骨分化を著しく抑制した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

(1) Ueno, T., Nakashima, A., Doi, S., Kawamoto, T., Honda, K., Yokoyama, Y., Doi,

T., Higashi, Y., Yorioka, N., Kato, Y., Kohno, N., and Masaki, T. (2013) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF-beta1 signaling. *Kidney Int.* 査読有り, in press. DOI: 10.1038/ki.2013.81.

(2) Sato, F., Kawamura, H., Wu, Y., Sato, H., Jin, D., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Seino, H., Morohashi, S., Kato, Y., and Kijima, H. (2012) The basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 inhibits TGF-beta-induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells. *Int. J. Mol. Med.* 査読有り, 30, 495-501, DOI: 10.3892/ijmm.2012.1037.

(3) Sato, F., Sato, H., Jin, D., Bhawal, U.K., Wu, Y., Noshiro, M., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Seino, H., Morohashi, S., Kato, Y., and Kijima, H. (2012) Smad3 and Snail show circadian expression in human gingival fibroblasts, human mesenchymal stem cell, and in mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有り, 419, 441-446, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.076.

(4) Ueshima, T., Kawamoto, T., Honda, K.K., Noshiro, M., Fujimoto, K., Nakao, S., Ichinose, N., Hashimoto, S., Gotoh, O., and Kato, Y. (2012) Identification of a new clock-related element EL-box involved in circadian regulation by BMAL1/CLOCK and HES1. *Gene* 査読有り, 510, 118-125, DOI: 10.1016/j.gene.2012.08.022.

(5) Wu, Y., Sato, F., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Seino, H., Morohashi, S., Kato, Y., and Kijima, H. (2012) BHLH transcription factor DEC2 regulates pro-apoptotic factor Bim in human oral cancer HSC-3 cells. *Biomed Res.* 査読有り, 33, 75-82, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22572381>.

(6) Wu, Y., Sato, F., Yamada, T., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Seino, H., Morohashi, S., Hakamada, K., Abiko, Y., Kato, Y., and Kijima, H. (2012) The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* 41, 1337-1346, DOI: 10.3892/ijo.2012.1559.

(7) Bhawal, U.K., Sato, F., Arakawa, Y., Fujimoto, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., Ito, Y., Sasahira, T., Sakurai, T., Kobayashi, M., Kashima, I., Kijima, H.,

Kuniyasu, H., Abiko, Y., Kato, Y., and Sato, S. (2011) Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates cyclin D1. *J. Pathol.* 査読有り, 224, 420-429, DOI: 10.1002/path.2878

(8) Suehiro, F., Nishimura, M., Kawamoto, T., Kanawa, M., Yoshizawa, Y., Murata, H., and Kato, Y. (2011) Impact of zinc fingers and homeoboxes 3 on the regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Stem Cells Dev.* 査読有り, 20, 1539-1547, DOI: 10.1089/scd.2010.0279.

(9) Wu, Y., Sato, F., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Morohashi, S., Kato, Y., and Kijima, H. (2011) Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 regulate the paclitaxel-induced apoptotic pathway of MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 査読有り, 27, 491-495, DOI: 10.3892/ijmm.2011.617.

(10) Bhawal, U.K., Ito, Y., Tanimoto, K., Sato, F., Fujimoto, K., Kawamoto, T., Sasahira, T., Hamada, N., Kuniyasu, H., Arakawa, H., Kato, Y., and Abiko, Y. (2012) IL-1beta-mediated up-regulation of DEC1 in human gingiva cells via the Akt pathway. *J. Cell. Biochem.* 査読有り, 113, 3246-3253, DOI: 10.1002/jcb.24205.

(11) Ozaki, N., Noshiro, M., Kawamoto, T., Nakashima, A., Honda, K., Fukuzaki-Dohi, U., Honma, S., Fujimoto, K., Tanimoto, K., Tanne, K., and Kato, Y. (2012) Regulation of basic helix-loop-helix transcription factors Dec1 and Dec2 by RORalpha and their roles in adipogenesis (dagger). *Genes Cells.* 査読有り, 17, 109-121, DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01574.x.

〔学会発表〕 (計 7 件)

(1) 間葉系幹細胞の軟骨分化における DEC2 の役割: 笹本智子、藤本勝巳、金輪真佐美、河本健、能城光秀、道田将彦、尾崎徳継、丹根一夫、加藤幸夫: 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 13~14 日 広島市

(2) 間葉系幹細胞の増殖・分化ならびにインテグリン発現に対する転写因子 GATA6 の作用: 道田将彦、河本健、能城光秀、藤本勝巳、金輪真佐美、尾崎徳継、笹本智子、丹根一夫、加藤幸夫: 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 13~14 日 広島市

(3) Transcription factors regulating differentiation of MSC.: Kawamoto T., Kubo H., Iwata Y., Fujimoto K., Noshiro M., Kato Y.: 3rd International Workshop on

BioDental Education & Research Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences 2011年1月28～30日 広島市

(4) Identification of HMGA2 and SIM2 interaction in MSC.: Saskianti T., Kawamoto T., Kato Y.: 3rd International Workshop on BioDental Education & Research Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences 2011年1月28～30日 広島市

(5) Expression profiles of nuclear receptors and their functions in rat growth plate Chondrocytes.: Ozaki N., Noshiro M., Honda K., Hayashibara K., Kawamoto T., Fujimoto K., Tanne K., Kato Y.: 3rd International Workshop on BioDental Education & Research Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences 2011年1月28～30日 広島市

(6) Inhibitory Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Progression of Experimental Peritoneal Fibrosis in a Rat Model :Ueno T., Nakashima A., Taniguchi Y., Kawamoto T., Kato Y., Yorioka N. : 3rd annual meeting of American Society of Nephrology, Denver, USA. Nov. 18-21, 2010.

(7) 骨髄・滑膜由来間葉系幹細胞におけるインテグリン遺伝子発現への転写因子 GATA6 の作用 : 道田 将彦、河本 健、久保 裕嗣、金輪 真佐美、丹根 一夫、加藤 幸夫 : 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会 2010 年 5 月 14-15 日 山口市

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河本 健 (TAKESHI KAWAMOTO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号 : 50224861

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :