

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 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659336

研究課題名（和文）エピジェネティクス情報を活用した間葉系幹細胞のリプログラミング誘導技術の基盤形成

研究課題名（英文）Investigation for development of technique reprogramming of mesenchymal stem cells using epigenetic analyses

研究代表者

西村 理行 (NISHIMURA RIKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：60294112

研究成果の概要（和文）：未分化間葉系幹細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋肉細胞などに分化する多分化能を有している。一方、線維芽細胞は、この多分化能を有していない。本研究計画では、この点に着目して、線維芽細胞と未分化間葉系幹細胞の発現プロファイルならびにエピジェネティック情報を比較検討し、未分化間葉系幹細胞の多分化能に必要な因子の探索とその機能解析を試みた。さらにその因子を用いて、未分化間葉系幹細胞へのリプログラミングの可能性を検討した。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells (MSCs) have an unique ability to differentiate into several different cell lineage including osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and myocytes. In contrast, most of fibroblasts lack the ability. We focused on this difference between MSCs and fibroblasts, and examined differences of expression profiles and epigenetic information, in order to understand the molecules that are necessary for multipotent activity of MSCs. In addition, we attempted to approach the reprogramming of MSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	510,000	3,410,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：エピジェネティクス、転写、未分化間葉系幹細胞、骨芽細胞、軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞、腱細胞および線維芽細胞に分化可能な細胞である。近年、多分化能を有する間葉系幹細胞を、骨、軟骨、筋肉組織の再生医療に応用する技術開発に期待が集まっている。間葉系幹細胞からそれぞれの細胞への分化プログラムの制御機構に関する

研究は、この10年間に急速に進歩を遂げている。その中でも、それぞれの細胞系譜の分化に必須な転写因子が、数々と同定され、分化プログラムの分子メカニズムが明確になりつつある。骨芽細胞への分化には、Runx2やOsterixが必須である。また軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞への分化には、Sox9およびRunx2、C/EBPファミリーおよびPPAR γ 、MyoD

ファミリーがマスター遺伝子として機能している。研究代表者らも、間葉系幹細胞から骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化プログラムの制御機構の解明に大きな貢献を果たしてきた。最近 Runx2、Osterix、Sox9、C/EBP β 、PPAR γ などの転写因子を、間葉系幹細胞株 C3H10T1/2、C2C12、ST2 に過剰発現すると、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化が誘導されるが、線維芽細胞株 NIH3T3 や Balb/c3T3 にこれらマスター遺伝子を過剰発現しても分化が誘導されないことを見出した。この実験結果は、上記マスター遺伝子が分化誘導能を発揮するために必要な分子群が、間葉系幹細胞に存在するが、線維芽細胞においては発現していないことを物語っている。したがって、間葉系幹細胞と線維芽細胞において、発現を異にする分子群を明らかにし、間葉系幹細胞の遺伝子発現動態とエピジェネティクス情報を線維芽細胞に反映させることが可能となれば、線維芽細胞を間葉系幹細胞にリプログラミングすることが可能になると期待された。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞と線維芽細胞のエピジェネティクス情報と遺伝子発現プロファイルを解析し、間葉系幹細胞が多分化能を維持するために必要な分子群を網羅的に同定する。同定された分子を分子細胞生物学的に検討し、機能的役割の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 未分化間葉系幹細胞と線維芽細胞のエピジェネティクス情報および遺伝子プロファイルの解明を実施するために、Balb/c、NIH3T3、ST2 および C3H10T1/2 細胞より RNA を抽出、精製し、Solexa シークエンサーによる網羅的解析を実施した。

(2) Solexa シークエンサーによる網羅的解析により、線維芽細胞である Balb/c ならびに NIH3T3 細胞では発現が低いが、多分可能を有する ST2 あるいは C3H10T1/2 細胞で高い発現を示した分子を候補遺伝子とした。

(3) 候補遺伝子を遺伝子データベース、疾患データベース、ゲノムデータならびに文献的検討を加えて、研究対象の遺伝子を絞り込んだ。その中でも、C/EBP α ならびに Arid5b が重要な役割を果たしていると考えられたので、それぞれのアデノウイルスを作製し、細胞に過剰発現し、その機能的役割を検討した。特に骨芽細胞あるいは軟骨細胞への分化に焦点を当てて検討を行った。骨芽細胞分化は、アルカリフォスファターゼ活性、ならびに Runx2、Osterix、骨シアロタンパク質、オステオカルシンなどの骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現を指標に検索した。遺伝子発現は、リアルタイム PCR によって解析を実施した。

軟骨細胞分化は、アルシアンブルー染色、アリザリンレッド染色、ならびに二型コラーゲン、十型コラーゲン、アグリカン、Sox9、Sox5、Sox6、インディアンヘッジホッグ、PTH 関連タンパク質などの軟骨細胞のマーカー遺伝子の発現を指標に検討を行った。

(4) これら転写因子と骨芽細胞あるいは軟骨細胞のマスター遺伝子である Runx2 あるいは Sox9 との相互関連をレーザー共焦点顕微鏡を用いた共局在ならびに免疫共沈降法にて検索を行った。

(5) 分子的機能を明らかにするために、クロマチン免疫沈降法により、ヒストン修飾に対する関与を検討した。

(6) Arid5b に関しては、in vivo における役割を検討するために、ドミナントネガティブ型 Arid5b を過剰発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを作製し、その表現型を病理組織学的、分子細胞生物学的に解析した。また、Arid5b ノックアウトマウスの骨及び軟骨の表現型も解析を行った。

4. 研究成果

(1) Solexa シークエンサーによる解析の結果、骨芽細胞、軟骨細胞あるいは、脂肪細胞への分化能を有する ST2 細胞、C3H10T1/2 細胞において有意に発現が高い転写因子群の存在を見出した。これら未分化間葉系幹細胞に発現している転写因子の発現は、分化形質を欠く、NIH3T3 細胞、Balbc3T3 細胞では低かった。その中でも、C/EBP α ならびに Arid5b の発現に特異的な差異を認めた。

(2) C/EBP α に対する検討を進めるためにリアルタイムPCR解析を実施した結果、C/EBP α は、多分化能を有するST2細胞、C3H10T1/2細胞において高い発現を有していることが確認された。そこでC/EBP α の機能的役割を明らかにするために、アデノウイルスシステムを用いてC/EBP α をC3H10T1/2細胞に過剰発現すると、骨芽細胞および脂肪細胞への分化が誘導された。その効果は、骨形成因子BMP2によって、著明に増強された。一方、C/EBP α のドミナントネガティブ変異体の過剰発現は、C3H10T1/2細胞の骨芽細胞および脂肪細胞への分化能を著しく阻害した。したがって、未分化間葉系幹細胞の多分化能の維持には、C/EBP α が重要な役割を果たしていること示唆された。

(3) in situ hybridization 解析の結果、Arid5b は、マウス胎児肢芽の軟骨原器に高発現していることが見出された。さらに、リアルタイム PCR 解析により、Arid5b が軟骨細胞に豊富に発現していることが示された。したがって、軟骨細胞分化過程において Arid5b が重要な役割を果たしていることが示唆された。Arid5b を未分化間葉系細胞に過剰発現すると、軟骨細胞への分化が促進された。ま

た Arid5b は、転写因子 Sox9 と物理的に結合すること、細胞核内で共局在すること、Sox9 の転写活性を促進させることが明らかとなった。したがって Arid5b は、Sox9 と協調的に、未分化間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化を促していると考えられた。また Arid5b ノックアウトマウスを解析した結果、内軟骨性骨化過程における Arid5b の重要性も確認された。Arid5b の分子作用メカニズムを検討した結果、Arid5b は二型コラーゲン遺伝子などの軟骨細胞特異的遺伝子のヒストン脱メチル化を制御し、軟骨細胞分化を誘導している可能性が認められた。

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 10 件)

- ① 西村 理行、波多 賢二、高島 利加子、吉田 倫子 (2012) 内軟骨性骨形成過程における転写因子の役割と機能制御. *Clinical Calcium* 22: 643-652 査読なし
- ② Nishimura R, Hata K, Mastubara T, Wakabayashi M, Yoneda T (2012) Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signaling and transcription factors. *J Biochem* : 151: 247-254 査読あり
- ③ Nishimura R, Hata K, Ono K, Amano K, Takigawa Y, Wakabayashi M, Takashima R, Yoneda T (2012) Regulation of endochondral ossification by transcription factors. *Frontiers in Bioscience* : 印刷中 査読あり
- ④ Murakami T, Hino S, Nishimura R, Yoneda T, Wanaka A, Imaizumi K (2011) Distinct mechanisms are responsible for osteopenia and growth retardation in OASIS-deficient mice. *Bone* 48: 514-523 査読あり
- ⑤ Amano K, Hata K, Muramatsu S, Wakabayashi M, Takigawa Y, Ono K, Nakanishi M, Takashima R, Kogo M, Matsuda A, Nishimura R, Yoneda T (2011) Arid5a cooperates with Sox9 to stimulate chondrocyte-specific transcription. *Mol Biol Cell* 22: 1300-1311 査読あり
- ⑥ 西村 理行 (2011) 骨芽細胞の分化制御機構. *Clinical Calcium* 21: 103-112 査読なし
- ⑦ Wang X, Suzawa T, Ohtsuka H, Zhao B, Miyamoto Y, Miyauchi T, Nishimura R, Inoue T, Nakamura M, Baba K, Kamiyo R. (2010) Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via Intracellular pH-dependent JNK signaling pathway. *J Cell Physiol* 225: 709-719 査

読あり

- ⑧ Matsubara T, Ikeda F, Hata K, Nakanishi M, Okada M, Yasuda H, Nishimura R, Yoneda T. (2010) Cbp recruitment of Csk into lipid rafts is critical to c-Src kinase activity and bone resorption in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 25: 1068-1076 査読あり
- ⑨ Takigawa Y, Hata K, Muramatsu S, Amano K, Ono K, Wakabayashi M, Matsuda A, Takada K, Nishimura R, Yoneda T. (2010) A transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling transcription factory with Sox9. *J Cell Sci* 123: 3780-3788 査読あり
- ⑩ 西村 理行 (2010) オステオポンチン、オステオネクチン. 血液・尿化学検査 日本臨牀増刊号 233-235 査読なし

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takashima R, Hata K, Wakabayashi M, Nakanishi M, Ono K, Amano K, Whitson R, Maeda Y, Nishimura R, Yoneda T. The transcription factor Arid5B is a novel partner of Sox9 in endochondral bone formation. American Society for Bone and Mineral Research 2011 Annual Meeting, San Diego Convention Center, 23年9月16~20日
- ② Takashima R, Hata K, Wakabayashi M, Nakanishi M, Ono K, Amano K, Whitson R, Maeda Y, Nishimura R, Yoneda T. The transcription factor Arid5b modulates endochondral bone formation in cooperation with Sox9. Joint 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting & ANZBMS Annual Meeting, 23年9月4~8日 Australia, Gold Coast
- ③ 高島理加子、波多 賢二、若林 真、小野 孝一郎、天野 克比古、中西 雅子、前田芳信、西村 理行、米田 俊之 Arid5b は Sox9 の転写機能を促進することにより軟骨細胞分化を制御する. 第29回日本骨代謝学会 大阪国際会議場 23年7月28日~30日
- ④ 西村 理行. 「骨格形成過程における転写因子の制御機構」第84回日本内分泌学会 学術総会 シンポジウム 23年4月22日 神戸国際会議場・神戸国際展示場
- ⑤ Nishimura R. : Regulation of bone development by Sox9 and Osterix. 7th Bone Biology Forum 22年8月20日 Fuji Institute of Education and Training
- ⑥ 西村 理行. 「骨形成過程における転写因子調節機構」第29回日本骨代謝学会 シンポジウム、22年7月23日 京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 理行 (NISHIMURA RIKO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：60294112

(2) 連携研究者

米田 俊之 (YONEDA TOSHIYUKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：80142313
波多 賢二 (HATA KENJI)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：80444496