

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成 23 年度 ～ 平成 25 年度

課題番号：23659938

研究課題名（和文）

DNA メチル化解析による培養間葉系幹細胞のミニマム・リプログラミング技術の開発

研究課題名（英文）

Minimal reprogramming of cultured MSC based on DNA methylation analysis

研究代表者

星 和人 (HOSHI KAZUTO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：30344451

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、必要最低限のリプログラミングによって培養間葉系幹細胞(MSC)をリセットし、この細胞を細胞源として用いて安全で確実な再生医療技術を確立することである。本研究では、培養ラット MSC の DNA メチル化をゲノムワイドで解析し、細胞劣化にともなうメチル化変動部位を同定した。DNA 脱メチル化刺激を用い、この部位のメチル化状態を改善する方法を検討し、ブタ骨再生モデルに応用した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this research is to establish safe and reliable technology for regenerative medicine using the cultured mesenchymal stem cells (MSCs), which are reset by minimum reprogramming. In this research, we analyzed DNA methylation of cultured rat MSCs genome-widely, and identified the variations of methylation with cell deterioration. By using stimulus to DNA demethylation, we examined a method to improve the state of the methylation, and applied the method to a bone regeneration model in pig.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医療・間葉系幹細胞・DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域の骨再生医療の細胞源としては骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)が用いられることが多い。しかし MSC は培養中に骨分化能が減弱し、いわゆる「細胞劣化」の状態になってしまうことが知られている。細胞劣化現象において、多くの遺伝子や表面マーカーの発現変動が報告されており、申請者らも、細胞の継代培養を続けると FGF-18 や CD151 などの発現が増減することを明らかにした [Yamaoka, Fujihara, Takato, Hoshi et al

Cell Prolif in press]。しかし、これらの所見は細胞劣化の結果を観察したに過ぎず、再生医療製品の製造に不可欠な細胞培養で、なぜ組織形成に必要な遺伝子がことごとく減少してしまうのかという本質的疑問は依然、全く解明されていない。このように、培養に伴う細胞劣化の原因解明やそれに対する対策は再生医療の重要な課題となっている。

2. 研究の目的

これまで遺伝子の発現は遺伝子配列そのものによって制御されると考えられてきた。しかし、近年、DNA のメチル化、ヒストンの化学修飾、などの遺伝子配列の外で行われる制御、いわゆる「エピジェネティック」な制御が重要な役割を担うことが知られるようになった。申請者らは、MSC 細胞劣化も、細胞培養という非生理的な環境におかれるために生じる DNA の過剰なメチル化による遺伝子発現抑制が原因であると仮説している。本研究では、プロモーターの DNA メチル化をゲノムワイドで解析し、細胞劣化にともなうメチル化変動部位を同定する。さらに、これまで iPS 細胞樹立に使われたリプログラミング因子や、既知の DNA 脱メチル化薬剤を単独あるいは組み合わせて、iPS 細胞作製のときのような全ゲノムではなく、細胞劣化に伴うメチル化部位のみを特異的に改善する、必要最低限（ミニマム）のリプログラミングを実現する。これらによって、より安全で確実な再生医療技術を確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

培養 MSC のプロモーターの DNA メチル化をゲノムワイドで解析し、細胞劣化にともなうメチル化変動部位を同定した。さらに、これまで iPS 細胞樹立に使われたリプログラミング因子や、既知の DNA 脱メチル化刺激を単独あるいは組み合わせて、この部位のメチル化状態を特異的に改善するミニマム・リプログラミングの技術を確立し、骨再生動物実験モデルで検討した。

4. 研究成果

培養に伴う細胞劣化による DNA メチル化変動部位の同定をおこなった。MSC は SD ラット 4 週齢オスの両側大腿骨及び脛骨より単離し、ノンコートディッシュに播種、増殖培地 (DMEM+10% FBS +1ng/mL bFGF) にて培養した。ラット 4 匹より回収した細胞を 1 ロットとし、これを 6 回繰り返した。

P0 および P2 での骨・軟骨分化誘導効率については、ペレットを作製し、1 本あたり 22 万細胞を 15mL コニカルチューブに遠心した。ペレットの培養にあったっては、軟骨分

化誘導培地を 1.5mL 添加し、1 回培地を半量交換したのち 1 週間培養後にサンプルを回収し、Isogen にて RNA を回収した。リアルタイム PCR (Sybergreen) にて遺伝子発現を定量評価し、軟骨分化マーカーである aggrecan や col2 および軟骨初期分化マーカー sox9 の発現が P0 よりも P2 で低下するロットを認め、継代数が進むにつれて分化誘導に抵抗性を示すことが確認され、細胞劣化が検証された。

ついで、P0 および P2 で DNA の回収 (Qiagen DNaseasy Blood& Tissue kit) を行った。DNA については、メチレーションアレイ (Nimblegen) にて 15061 のプロモーター領域について網羅的メチル化解析を行った。サンプルの解析にあたり、データにてメチル化ピーク値を検出した領域のうち転写開始点より 300 bp 以内の遺伝子 77 個を絞り込み、さらに P2/P0 のピーク値の比が 4/6 ロット以上で低下しているないし 3/6 ロット以上で増加している 22 遺伝子を絞り込んだ。このうち、MSC において継代により発現傾向に変化がある遺伝子を PCR にて同定した。

DNA 脱メチル化刺激については、同効果が期待される刺激として、アテロコラーゲン 3 次元包埋培養刺激を加えた。アテロコラーゲンに 3 次元包埋することに、培養 MSC に一定の分化誘導がかかることを確認した。さらに、ブタと同一遺伝子背景のブタ由来 MSC が入手できたので、骨欠損部にアテロコラーゲン 3 次元包埋培養した培養 MSC を投与したところ、欠損部位に骨再生が確認できた。

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 15 件)

- (1) Abe, M. et al The efficacy of dental therapy for an adult case of Henoch-Schonlein purpura. Oral Science International、査読有、9 巻、2012、59-62
DOI:10.1016/S1348-8643(12)00027-4
- (2) Ogasawara, T. et al Nanog promotes

- osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *J Cell Physiol* 査読有、228 卷、2013、163-171
DOI: 10.1002/jcp.24116
- (3) Kanazawa, S. et al Tissue responses against tissue-engineered cartilage consisting of chondrocytes encapsulated within non-absorbable hydrogel. *J Tissue Eng Regen Med*、査読有、7 卷、2013、1-9
DOI: 10.1002/term.458
- (4) Yonenaga, K. et al Application of floating cells for improved harvest in human chondrocyte culture. *Biomed Res* 査読有、33 卷、2012、281-289
- (5) Yokoi, M. et al Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product. *J Tissue Eng Regen Med* 査読有、6 卷、2012、550-558
DOI: 10.1002/term.460
- (6) Yanagisawa, H. et al Matrix remodeling and cytological changes during spontaneous cartilage repair. *J Electron Microsc (Tokyo)*、査読有、61 卷、2012、237-248
DOI: 10.1093/jmicro/dfs044
- (7) Tanaka, Y. et al Evaluation of the implant type tissue-engineered cartilage by scanning acoustic microscopy. *J Biosci Bioeng*、査読有、113 卷、2012、252-257
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.10.011
- (8) Sugiyama, M. et al Secondary repair of an oblique facial cleft with absorbable mesh tray and particulate cancellous bone and marrow. 査読有、9 卷、2012、63-66
DOI:10.1016/S1348-8643(12)00030-4
- (9) Ochiai, H. et al Inhibition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression by prolonged transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) administration suppresses osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 査読有、287 卷、2012、22654-22661
DOI: 10.1074/jbc.M111.279091
- (10) Mori, Y. et al Mandibular body ostectomy for correction of mandibular prognathism - a technical note. *Oral Science International* 査読有、9 卷、2012、21-25
DOI:10.1016/S1348-8643(12)00005-5
- (11) Ko, E. C. et al BMP-2 embedded atelocollagen scaffold for tissue-engineered cartilage cultured in the medium containing insulin and triiodothyronine--a new protocol for three-dimensional in vitro culture of human chondrocytes. *Tissue Eng Part C Methods* 査読有、18 卷、2012、374-386
DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0217
- (12) Iwata, K. et al The development of a serum-free medium utilizing the interaction between growth factors and biomaterials. *Biomaterials* 査読有、33 卷、2012、444-454
DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.09.056
- (13) Asawa, Y. et al Early-stage foreign body reaction against biodegradable polymer scaffolds affects tissue regeneration during the autologous transplantation of tissue-engineered cartilage in the canine model. *Cell Transplant* 査読有、21 卷、2012、1431-1442
DOI: 10.3727/096368912X640574
- (14) Amizuka, N. et al Histological

aspects of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification Frontiers in Biosciences 査読有、E4 巻、2012, 2085-2100

- (15) Ko, E.C. et al Administration of the insulin into the scaffold atelocollagen for tissue-engineered cartilage J Biomed Master Res A 査読有、97 巻、2011, 186-192

[学会発表] (計 9 件)

- ① OPTIMAL COMBINATIONS OF SCAFFOLDS AND GROWTH FACTORS FOR TISSUE ENGINEERING OF CARTILAGE
- ② Innovation of Cartilage Regenerative Medicine by Implant-type Tissue-engineered Cartilage
- ③ 自己血清を軟骨再生医療の臨床展開と安全性確保の試み
- ④ Research and Development of Self-maturing Device for Cartilage Regeneration That Makes Active Use of Biological Factors in Host Environment
- ⑤ 再生医療と生殖補助医療との相互補完は可能か— 生殖補助医療の現状に学ぶ
- ⑥ 生分解性ポリマー足場素材を用いたインプラント型再生軟骨の研究開発と臨床導入
- ⑦ 足場素材導入による軟骨再生医療の新展開—唇裂鼻変形に対するインプラント型再生軟骨による治療
- ⑧ DEVELOPMENT OF IMPLANT-TYPE TISSUE-ENGINEERED CARTILAGE APPLIED FOR THE CORRECTION OF THE CLEFT LIP-NOSE PATIENTS
- ⑨ Development of implant-type tissue-engineered cartilage applied for the nasal correction of the cleft lip and palate patients

[図書] (計 1 件)

- (1) 星和人, 他, 朝倉書店、再生医療叢書 第 6 巻 骨格系 第 2 章 軟骨細胞を使った軟骨再生(顎・顔面)、2012、

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 生理活性因子を固定する混合ハイドロゲルと細胞機能向上のための培養方法
発明者: 星和人, 他
権利者: 東京大学, 他
種類: 特許
番号: 61/769360
出願年月日: 2013 年 2 月 26 日
国内外の別: 外国

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/ct-e/t-e/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星 和人 (HOSHI KAZUTO)
東京大学医学部附属病院・准教授
研究者番号: 30344451

(2) 研究分担者

高戸 毅 (TAKATO TSUYOSHI)
東京大学医学部附属病院・教授
研究者番号: 90171454

森 良之 (MORI YOSHIYUKI)
東京大学医学部附属病院・准教授
研究者番号: 70251296

藤原 夕子 (HUJIHARA YUKO)
東京大学医学部附属病院・助教授
研究者番号: 50466744

(3) 連携研究者

なし