

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25505001

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の分化スイッチ制御に関わる遺伝子の解析

研究課題名(英文) Analysis of differentiation control gene in mesenchymal stromal cells

研究代表者

赤澤 智宏 (AKAZAWA, Chihiro)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号：80291160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSCs)は、間葉系への細胞に分化する能力を有し、様々な組織で未分化状態を維持している組織幹細胞である。MSCsは、in vitroで培養された細胞を用いて定義されているため、その性質について実験ごとの相違が生じている。本実験では、ヒトおよびマウスMSCsを予期的に分離し、MSCsについての未分化維持について、クローナルな解析を行った。その結果、未分化なMSCsにはTeneurin-4(Ten-4)遺伝子が発現しており、分化後に発現が低下していることが分かった。本実験の結果により、MSCsの未分化時にTen-4遺伝子が一部役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stromal cells (MSCs) have the differentiation ability to mesenchymal lineage cells in culture and maintain the quiescent state in adult tissues. Because MSCs have been defined using cells cultured in vitro, discrepancies have arisen between studies concerning their properties. Using prospective isolation method for human and mouse MSCs, we performed the clonal analysis of MSCs about maintaining the quiescence. Clonal characterization of MSCs demonstrated that the transmembrane protein teneurin-4 (Ten-4) is highly expressed in the quiescent MSCs. The cell culture analysis showed that Ten-4 was downregulated in MSC after differentiation. Our findings revealed that Ten-4 player a role in maintaining the quiescence of MSCs.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 遺伝子制御

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) は骨・軟骨・脂肪などの間質細胞への分化能を有している組織幹細胞であるが、培養条件により神経・骨格筋・心筋など、間質以外の細胞への分化能も示す事が示されている。MSCs は、その多分化能から、様々な組織難治性疾患に対する細胞治療ソースとして注目され、臨床応用を目指した研究が国内外で盛んに行われている。しかしながら、臨床応用のために必須である安全で効率的な MSCs の分化制御についての基礎的な研究はほとんど進んでいないのが現状である。その1つの理由として、MSCs 特異的な遺伝子マーカーが同定されていない点にある。一般的に用いられている MSC の分離法は骨髄細胞を培養皿上で培養後、付着増殖した細胞を MSCs とみなすとされており、実際にこの方法で得られた細胞集団は、前駆細胞・血液細胞等の雑多な集団であり、データのバラつきを生む原因となっている。

研究代表者が組織するチームでは、これまでにフローサイトメーターによる細胞分離技術を活用した組織幹細胞分離に関する研究を精力的に行ってきたおり、マウスおよびヒト骨髄細胞より特異抗原を指標にフローサイトメトリーを用いて MSCs を直接分離する技術を確立した(研究分担者・馬淵)(JEM, 2009: Nature Protocols, 2012: Inflammation and Regeneration, 2009)。純化した MSC は、長期増殖能力をもち、また効率良く脂肪・骨・軟骨等、間葉系細胞への多分化能を示す。この分離技術を用いることによって、短時間で均一な MSC 集団を得ることができ、正確な幹細胞の分化機能の解析が可能となる。

2 型膜貫通型タンパク質である Teneur in-4 (Ten-4) は、中枢神経系や中胚葉系組織等の様々な組織に発現している。Teneur in ファミリーのひとつである Ten-4 は、中枢神経系で髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの分化を調節し、中枢神経系の髄鞘形成に必須である。本研究室において、Ten-4 欠損マウスの解析が成され、このマウスでは中枢神経系のオリゴデンドロサイトの分化異常による、ミエリン鞘の形成不全が起こり、ふるえ(振戦)を呈することがわかった(研究分担者・鈴木)(J. Neuroscience, 2012)。また、Ten-4 が中胚葉由来の骨格筋組織において未分化で多分化能を有する筋衛星細胞で発現していることが報告された(J Mol Hist, 2012)。最近の我々のデータにより、Ten-4 は間葉系組織(軟骨)にも発現していることを

確認している。

以上の予備的データを踏まえ、間葉系幹細胞における分化制御に Ten-4 遺伝子の発現が何か影響があるのではないかと考え、本研究にて詳細に解析することに至った。

2. 研究の目的

本研究ではこれまで申請者らが開発した細胞分離技術を活用し、その未分化性維持や分化の方向決定の分子機構を体系的に解明することによって、幹細胞・前駆細胞・成熟細胞のふるまい(未分化性維持、分化の方向性決定)をコントロールするメカニズムを理解する。本研究では、下記の点について明らかにする。

- (1) 間葉系幹細胞における Ten-4 の発現解析
- (2) 培養間葉系幹細胞における Ten-4 の発現解析
- (3) 分化誘導後の Ten-4 遺伝子の発現解析
- (4) Ten-4 ノックアウトマウスの解析

3. 研究の方法

フローサイトメーターを用いてヒト骨髄細胞より特異抗原 (LNGFR・THY-1) を指標に、間葉系幹細胞を直接分離する。また、これまでの解析より、単一細胞培養後の LNGFR・THY-1 共陽性細胞は、増殖能力を低下すること無く増え続け、約 10 継代以上培養可能であることを確認している。間葉系幹細胞の分化制御に Ten-4 が関与しているかどうか調べるため、フローサイトメーターで分離した直後の間葉系幹細胞から RNA を採取し、Ten-4 遺伝子の遺伝子発現を解析する。また、Ten-4 遺伝子による間葉系幹細胞の有する分化能への影響を調べるため、骨・軟骨・脂肪へ分化させた細胞からも RNA を採取し、同様に Ten-4 遺伝子の発現変化を観察する。

Ten-4 欠損マウスの間葉系組織を免疫学的手法で解析し、間葉系組織の発達に与える影響を調べる。特に、骨髄内における間葉系幹細胞の存在比率をフローサイトメーターにより定量的に解析する。以上の方法により、マウスおよびヒト間葉系幹細胞において間葉系幹細胞の働きと Ten-4 遺伝子の相関を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 間葉系幹細胞における Ten-4 の発現解析

まず始めに、生体内での間葉系幹細胞の Ten-4 の遺伝子発現を調べるため、ヒト骨髄細胞より間葉系幹細胞 (LNGFR⁺THY-1⁺分画) と間

葉系前駆細胞 (LNGFR⁺THY-1⁻分画) を分離し、RNAを採取した。それらのサンプルを用いて網羅的遺伝子解析を行い、間葉系幹細胞のみで優位に発現している 98 遺伝子を同定した。この遺伝子群の中には、細胞周期、分化、アポトーシス関連の遺伝子が含まれていたが、その中に「Ten-4」が含まれていることを確認した。Ten-4の遺伝子発現を調べてみると、間葉系前駆細胞と比較し、間葉系幹細胞では2.5倍の発現量が観察された(図1)。

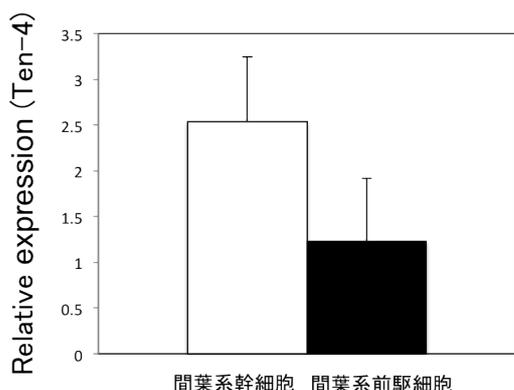


図1: 骨髄より予期的に分離された細胞集団の Ten-4 遺伝子発現解析

(2) 培養間葉系幹細胞細胞における Ten-4 の解析

培養後の間葉系幹細胞においても Ten-4 の発現が見られるかどうかを観察するために、1 細胞由来の間葉系幹細胞に対し、遺伝子発現解析を行うことにした。間葉系幹細胞 (LNGFR⁺THY-1⁺分画) を 96well プレートに single cell sorting を行うと、6 個に 1 個の割合でコロニーを得ることが可能である (Mabuchi et al. Stem Cell Reports. 2013)。この単一細胞由来のクローンを詳細に解析すると、増殖能と分化能が高いクローン (REC) と、増殖能・分化能が低下したクローン (MEC/SEC) があることが分かっている。これらのクローンごとに Ten-4 の遺伝子発現を調べてみると、REC での Ten-4 の発現が他のクローンに比べて高い値を示すことが分かった(図2)。

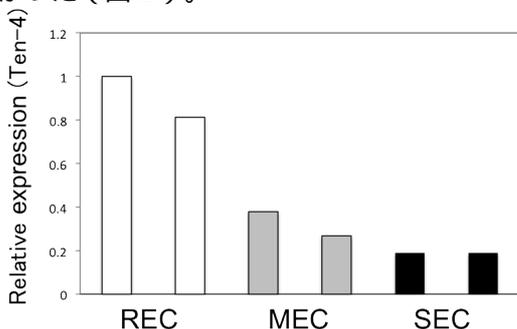


図2: Single Cell Sortingにより得られた間葉系幹細胞クローンにおける Ten-4 遺伝子の発現

(3) 分化誘導後の Ten-4 遺伝子の発現解析

REC細胞は各分化誘導培地で刺激を行うことにより、脂肪・骨には2週間、軟骨には3週間で分化することが可能である。RECを骨・軟骨・脂肪の細胞へ分化させた際に、Ten-4遺伝子がどのような発現変化するかを観察するために、分化後のREC由来細胞からRNAを採取し、解析を試みた。その結果、分化誘導前と比較し、分化誘導後においてTen-4の発現低下が確認された。2クローンを用いて同一細胞ラインによる解析を行ったが、どちらも同様な結果が得られた(図3)。

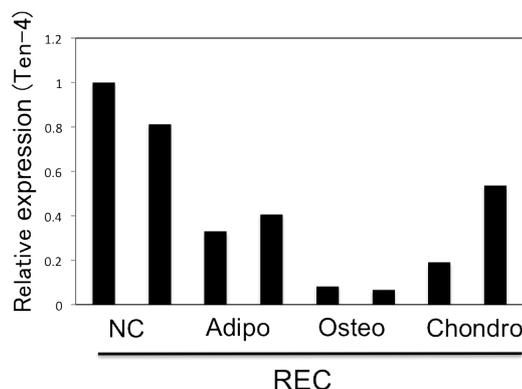


図3: 分化細胞における Ten-4 遺伝子の発現解析

(4) Ten-4 ノックアウトマウスの解析

研究分担者(鈴木)結果より、Ten-4欠損マウスは、中枢神経系のオリゴデンドロサイトの分化異常による、ミエリン鞘の形成不全が起こり、ふるえ(振戦)を呈することがわかっている(J. Neuroscience, 2012)。成体マウス骨髄をコラゲナーゼ処理することで、骨髄由来細胞を採取した。得られた細胞に対し、表面抗原に対する抗体にて染色し、フローサイトメーターを用いて間葉系幹細胞を分離した。間葉系幹細胞 (PDGFRa+Sca-1+細胞) の割合を調べたところ、野生型に比べてノックアウトマウスではやや低下していることが分かった。分離した間葉系幹細胞を培養皿上で培養すると、野生型・欠損型について、どちらも増殖能力にさほど大きな差は無い事が分かった。現在、長期培養した際の細胞老化、および骨・軟骨・脂肪への分化能力についての解析を行っているところである。Ten-4ノックアウトマウスの解析によりTen-4 シグナルが間葉系幹細胞の発生段階において分化能や自己複製能力に重要な役割を果たしているかどうかの関与を解析する予定である。

< 考察と今後の展望 >

従来法である付着培養によって得られた細胞集団のうちほとんどの細胞は分化能が低く、

分裂速度が遅い上にその回数も限られているため、培養条件、個々の手技によってはアウトプットにばらつきがでるが、今回高純度なMSCを純化する技術を用いることによって、単一細胞自体の特性、純度、細胞由来蛋白質の同定など、基準となる指標を明確に示すことが可能になった。

MSCは間質の組織ばかりでなく、骨格筋・神経などへ分化誘導が可能である。我々は、この能力を担う機構として、筋肉や神経への分化する際、間質系と共通の分化スイッチ機構を持っているのではないかと予想している。Ten-4の機能は神経系以外ではほとんど解析されておらず、本研究により、組織間での分化スイッチ機構の共有というユニークな現象を解明する可能性を大いに秘めている。

本研究から得られた知見を元に、引き続きMSCの分化スイッチの分子機構を体系的に解明することは、学術的ばかりでなく、幹細胞を用いた安全な先進医療を確立する上でも大きな意義を持つ。

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 16 件)

1. Ogata Y, Mabuchi Y, Yoshida M, Suto EG, Suzuki N, Muneta T, Sekiya I, and Akazawa C. Purified human synovium mesenchymal stem cells as a good resource for cartilage regeneration. Plos One. 2015 Jun 8; 10(6):e0129096. (査読有)
doi: [10.1371/journal.pone.0129096](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129096).

2. Ishii K, Suzuki N, Mabuchi Y, Ito N, Fukada S, Okano H, Takeda S, and Akazawa C. Suppressive Function of Teneurin-4 in Proliferation and Differentiation of Muscle Satellite Cells for Tissue Regeneration. Stem Cells. 2015 Oct; 33(10):3017-27. (査読有)
doi: [10.1002/stem.2058](https://doi.org/10.1002/stem.2058).

3. Ito Y, Inoue N, Inoue YU, Nakamura S, Matsuda Y, Inagaki M, Ohkubo T, Asami J, Terakawa YW, Kohsaka S, Goto Y, Akazawa C, Inoue T, and Inoue K. Additive dominant effect of a SOX10 mutation underlies a complex phenotype of PCWH. Neurobiol Dis. 2015 Aug;80:1-14. (査読有)
doi: [10.1016/j.nbd.2015.04.013](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.013).

4. Ozeki N, Muneta T, Matsuta S, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, Mabuchi Y,

Akazawa C, Kobayashi E, Saito T, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration augmented by an autologous achilles tendon graft in a rat partial meniscus defect model. Stem Cells. 2015 Jun;33(6):1927-38. (査読有)
doi: [10.1002/stem.2030](https://doi.org/10.1002/stem.2030).

5. Suto EG, Mabuchi Y, Suzuki N, Koyanagi A, Kawabata Y, Ogata Y, Ozeki Y, Muneta Y, Sekiya I, Akazawa C. High capacity of purified mesenchymal stem cells for cartilage regeneration. Inflammation and Regeneration Mar; 34(2):78-85. (査読有)

6. Lin X, Yang T, Wang S, Wang Z, Yun Y, Sun L, Zhou Y, Xu X, Akazawa C, Hong W, and Wang T. RILP interacts with HOPS complex via VPS41 subunit to regulate endocytic trafficking. Sci Rep. 2014 Dec 2;4:7282.

(査読有)
doi: [10.1038/srep07282](https://doi.org/10.1038/srep07282).

7. Suzuki N, Mizuniwa C, Ishii K, Nakagawa Y, Tsuji K, Muneta T, Sekiya I, and Akazawa C. Teneurin-4, a transmembrane protein, is a novel regulator that suppresses chondrogenic differentiation. J Orthop Res. 2014 Jul;32(7):915-22. (査読有)
doi: [10.1002/jor.22616](https://doi.org/10.1002/jor.22616).

8. Suzuki R, Miyahara K, Murakami H, Doi T, Lane GJ, Mabuchi Y, Suzuki N, Yamataka A, and Akazawa C. Abnormal neural crest innervation in Sox10-Venus mice with all-trans retinoic acid-induced anorectal malformations. Pediatr Surg Int. 2014 Feb;30(2):189-95. (査読有)
doi: [10.1007/s00383-013-3452-z](https://doi.org/10.1007/s00383-013-3452-z).

9. Suzuki N, Numakawa T, Chou J, de Vega S, Mizuniwa C, Sekimoto K, Adachi N, Kunugi H, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y, and Akazawa C. Teneurin-4 promotes cellular protrusion formation and neurite outgrowth through focal adhesion kinase signaling. FASEB J. 2014 Mar; 28(3):1386-97. (査読有)
doi: [10.1096/fj.13-241034](https://doi.org/10.1096/fj.13-241034).

10. Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, and Matsuzaki Y. LNGFR(+)THY-1(+)VCAM-1(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. Stem Cell

Reports.2013 Jul 11;1(2):152-65. (査読有)
doi: [10.1016/j.stemcr.2013.06.001](https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.06.001).

11.Nakazawa N, Miyahara K, Okawada M, Yamataka A, Suzuki R, Akazawa C, Tomikawa-Ichikawa N, and Arikawa-Hirasawa E. Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. *Pediatr Surg Int*.2013 Nov;29(11):1205-8. (査読有)
doi: [10.1007/s00383-013-3388-3](https://doi.org/10.1007/s00383-013-3388-3).

12.Sato H, Shibata M, Shimizu T, Shibata S, Toriumi H, Ebine T, Kuroi T, Iwashita T, Funakubo M, Kayama Y, Akazawa C, Wajima K, Nakagawa T, Okano H, and Suzuki N. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience*.2013 Sep 17; 248: 345-58. (査読有)
doi: [10.1016/j.neuroscience.2013.06.010](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.010).

13.Mabuchi Y, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, and Matsuzaki Y. Prospective isolation of murine and human bone marrow mesenchymal stem cells based on surface markers. *Stem Cells Int*.2013;2013:507301. (査読有)
doi: [10.1155/2013/507301](https://doi.org/10.1155/2013/507301).

14.Ohtomo R, Mori T, Shibata S, Tsuta K, Maeshima AM, Akazawa C, Watabe Y, Honda K, Yamada T, Yoshimoto S, Asai M, Okano H, Kanai Y, and Tsuda H. SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis. *Mod Pathol*. 2013 Aug; 26(8): 1041-50. (査読有)
doi: [10.1038/modpathol.2013.54](https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.54).

15. Ishii K, Doi T, Inoue K, Okawada M, Lane GJ, Yamataka A, and Akazawa C. Correlation between multiple RET mutations and severity of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*.2013 Feb;29(2):157-63. (査読有)
doi: [10.1007/s00383-012-3196-1](https://doi.org/10.1007/s00383-012-3196-1).

16.Miyahara K, Kato Y, Suzuki R, Akazawa C, Tanaka N, Koga H, Doi T, Lane GJ, and Yamataka A. Anorectal neural crest derived cell behavior after the migration of vagal neural crest derived cells is surgically disrupted: implications for the etiology of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg*

Int.2013 Jan;29(1):9-12. (査読有)
doi: [10.1007/s00383-012-3201-8](https://doi.org/10.1007/s00383-012-3201-8).

〔学会発表〕(計 45 件)

国際学会 : 8 件 (下記) 国内 : 37 件 (省略)

1.Yusuke Ogata, Yo Mabuchi, Mayu Yoshida, Eriko Grace Suto, Nobuharu Suzuki, Takeshi Muneta, Ichiro Sekiya, and Chihiro Akazawa Purification of human knee synovium-derived mesenchymal stem cells and potency for cartilage regenerative therapy. The 10th New York Stem Cell Foundation Annual Meeting, Rockefeller University 2015.10.28. New York(USA)

2.Kana Ishii, Nobuharu Suzuki, Yo Mabuchi, Naomi Kikura, Naoki Ito, Shin'ich Takeda, and Chihiro Akazawa. Teneurin-4 is a Regulator of Muscle Stem Cell during Muscle Regeneration. The 10th New York Stem Cell Foundation Annual Meeting, Rockefeller University 2015.10.28. New York(USA)

3.Eriko Grace Suto, Yo Mabuchi, Nobuharu Suzuki, Asuka Koyanagi, Yoshiko Kawabata, Takeshi Muneta, Ichiro Sekiya, and Chihiro Akazawa. Purified Mesenchymal Stem Cells maintain purity and have high ability of chondrogenic regeneration after prolonged culture. The 9th New York Stem Cell Foundation Annual Meeting, Rockefeller University 2014.10.22. New York(USA)

4.Kana Ishii, Nobuharu Suzuki, Yo Mabuchi, Naomi Kikura, Naoki Ito, Shin'ich Takeda, and Chihiro Akazawa. Suppressive Function of Teneurin-4, a Muscle Satellite Cell Protein, in Cell Proliferation and Differentiation during Myogenesis. The 9th New York Stem Cell Foundation Annual Meeting, Rockefeller University 2014.10.22. New York(USA)

5.Chihiro Akazawa. The New Japanese Regulation for Regenerative Medicine The 9th New York Stem Cell Foundation Annual Meeting, Rockefeller University 2014.10.22. New York(USA)

6.Chihiro Akazawa. Large Scale iPSC Initiatives Around the World. 12th Annual Meeting of ISSCR.

2014.6.18. Vancouver(Canada)

7.Kana Ishii, Nobuharu Suzuki, Yo Mabuchi, and Chihiro Akazawa. Teneurin-4 is a novel suppressor of myogenesis. Experimental Biology 2014, San Diego Convention Center 2014.4.30. San Diego(USA)

8.Kaori Sekimoto, Nobuharu Suzuki, Yo Mabuchi, and Chihiro Akazawa. In vitro Analysis of Differentiation of Oligodendrocytes and Astrocytes Using Sox10-Venus Mice. Experimental Biology 2014, San Diego Convention Center 2014.4.30. San Diego(USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称：筋衛生細胞培養用材料および筋衛生細胞の培養法

発明者：赤澤智宏、鈴木喜晴、馬淵洋、石井佳菜、関矢一郎

権利者：赤澤智宏、鈴木喜晴、馬淵洋、石井佳菜、関矢一郎

種類：特許

番号：2015-216609

出願年月日：2015年11月4日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://akazawalab.com/publication/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤澤 智宏 (AKAZAWA, Chihiro)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号：80291160

(2) 研究分担者

鈴木 喜晴 (SUZUKI, Nobuharu)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授

研究者番号：30596565

馬淵 洋 (MABUCHI, Yo)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・助教

研究者番号：50424172

(3) 連携研究者

()

研究者番号：