

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860763

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞の異所性石灰化におけるDNAメチル化異常の解析と新規治療法への応用

研究課題名(英文) DNA methylation analysis in Ectopic Calcification of Adipose-Derived Stem Cells

研究代表者

福與 俊介 (Fukuyo, Shunsuke)

産業医科大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：00449943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：健常人脂肪由来間葉系幹細胞を骨芽細胞分化に誘導する実験系において、IL-6/STAT3シグナル刺激を加えることで、有意な骨芽細胞分化促進が観察され、脱メチル化酵素であるTET1 mRNAの発現上昇効果の抑制と自己複製能マーカーであるOct3/4 mRNAの発現抑制効果の持続を認めた。脂肪分化抑制因子や脂肪細胞分化マーカーへの影響は認めなかった。健常人細胞ではIL-6/STAT3シグナル刺激による脂肪分化促進・抑制因子の破綻効果は確認できなかったが、TET1の発現を抑制することで自己複製を制御して分化を促進していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In using human adipose-derived stem cells cultured in osteoblast induction medium, Administration of interleukin (IL)-6 stimulation significantly accelerated osteoblast differentiation in human adipose-derived stem cells through Suppressed elevation of expression TET1 mRNA levels as methylcytosine dioxygenase and maintained suppression of expression Oct3/4 mRNA levels as self-renewing marker. There were no effect for suppression factor of adipogenesis and adipose differentiation marker.

研究分野：膠原病・リウマチ学

キーワード：脂肪由来間葉系幹細胞 異所性石灰化 DNAメチル化 インターロイキン6

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己免疫疾患による異所性石灰化の治療法は未だに確立されておらず、新たな視点からの治療開発が望まれる。石灰化病変に骨芽細胞分化に関わる因子が検出され、本来骨組織でのみ発現する骨芽細胞分化が異所性に発現していることがわかった。病変部位には炎症性細胞浸潤による炎症性サイトカインが産生されており、抗サイトカイン治療が異所性石灰化に有効であるという報告(文献1)からも、炎症性サイトカインによる骨芽細胞様の分化機序を介した石灰化という仮説を支持する。脂肪由来間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化する際に遺伝子(*SAA1*, *PTPRS*, *PIWIL2*)promotor 領域の DNA methylation が重要であると報告(文献4)されている。本来脂肪分化に向かうはずの脂肪由来幹細胞が、機能異常や異常な刺激によって、骨芽細胞に誘導促進される際に、患者検体において、これらの遺伝子の DNA methylation の異常が見られる可能性が十分に考えられ、これらのメカニズムを in vitro および in vivo で解明することで、自己免疫疾患による異所性石灰化治療のブレイクスルーを期待する。

(2) 間葉系幹細胞はその特徴である多分化能を有する事から、国内外ともに再生医療における研究が幅広く行われているが、病因を対象とした研究を行っている施設はほぼないのが現状である。我々の施設は間葉系幹細胞を用いて骨組織の再生医療の研究を行い、その有用性を報告(文献2、3)してきたが、一方で間葉系幹細胞は環境や起源によって正常な骨芽細胞分化を行えないことを見出した。以上を持って、当施設で行っている間葉系幹細胞研究の経験と新たに取得したエピゲノム解析のノウハウから本研究手法の構築を発想するに至った。

2. 研究の目的

(1) ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を用いた in vitro での解析：ヒト脂肪由来間葉系幹細胞における骨芽細胞様分化を誘導する炎症性サイトカインの作用メカニズムの解析、脂肪細胞分化・骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現、細胞内シグナル、脂肪分化抑制因子の作用・脂肪細胞分化・骨芽細胞分化における DNA methylation の解析

(2) 患者検体を用いた病因解明：患者検体を用いた病因分子の網羅的な解析、有効かつ簡便な診断方法、新規治療方法の開発。

3. 研究の方法

(1) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を使用した in vitro での解析：ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の培養液に炎症性サイトカイン(IL-6/TNF /IL-1 /IL-17)を添加し、石灰化作用を評価：骨芽細胞分化マーカー(*Runx2*, *Msx2*, *Col1a*, *BSP*, *Osteocalcin*, *RANKL*)RT-PCR、石灰化評価(アリザリンレッドS染色、アルカリフォスファターゼ染色)、脂肪細胞分化マーカー(*PARR*、*C/EBP*, *aP2*)RT-PCR、細胞内シグナル経路(*Wnt canonical pathway*、*MAPK*等)western blotting

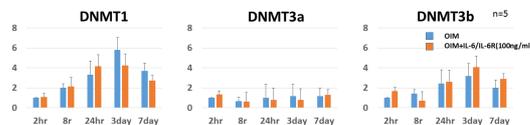
DNA methylation(*SAA1*, *PTPRS*, *PIWIL2*)の解析(Bisulfite sequencing / pyro sequencing / CpG micro array / MS-PCR等)

(2) 患者検体を用いた病因解明：患者検体(血清・組織)における病因因子(骨芽細胞分化促進因子(WNT pathway)もしくは抑制因子(*futuinA*)の破綻・脂肪分化促進因子(*PPAR* /*C/EBP/aPL*)の破綻・DNA methylation の異常等)を計測し、異所性石灰化の患者背景や重症度・罹病期間等と比較し相関関係を検討する。病因因子(*SAA1*, *PTPRS*, *PIWIL2*)の DNA methylation の解析(Bisulfite sequencing / pyro sequencing / CpG micro array / MS-PCR等)を行う。

4. 研究成果

(1) 健常人脂肪由来間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化する過程において、骨芽細胞分化誘導のみを行った場合と骨芽細胞分化誘導系に炎症性サイトカイン刺激(IL-6 シグナル経路) を添加した場合の DNA methylation を RT-PCR 法による mRNA の発現レベルを比較した。骨芽細胞分化誘導で、DNMT (DNA methyltransferase)1、DNMT3b mRNA の発現レベルは刺激3日後をピークに上昇を認めしたが、IL-6/sIL-6R 刺激による影響は認めなかった。DNMT3a mRNA の発現レベルはいずれの場合でも変化は認めなかった。

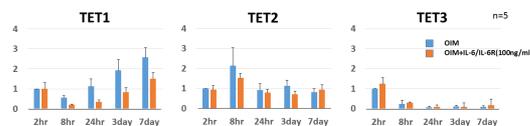
OIM刺激によるDNMT1/DNMT3bの上昇、IL-6/IL-6R刺激による影響は認めない



ADSC(1x10⁶cells)をOIM(骨芽細胞分化誘導培地)にIL-6/sIL-6R(100ng/ml)添加して培養
TET1, TET2, TET3 (DNA脱メチル化酵素)をRT-PCR法で培養2hr, 8hr, 24hr, 3day, 7dayで評価

(2) TET (ten-eleven translation)1、TET2、TET3 mRNA の発現レベルは、骨芽細胞分化誘導で刺激後8時間をピークに上昇が認められたが、IL-6/sIL-6R 刺激により TET1 mRNA の発現レベル上昇の抑制効果を認めた。

IL-6/IL-6R刺激はOIM刺激によるTET1上昇効果を抑制する

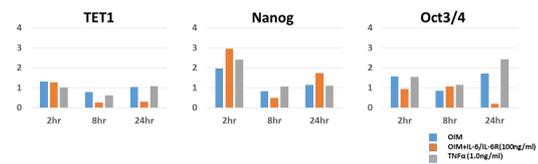


ADSC(1x10⁶cells)をOIM(骨芽細胞分化誘導培地)にIL-6/sIL-6R(100ng/ml)添加して培養
TET1, TET2, TET3 (DNA脱メチル化酵素)をRT-PCR法で培養2hr, 8hr, 24hr, 3day, 7dayで評価

(3) 次に、幹細胞の self-renewing marker である Nanog、Oct3/4 遺伝子の転写制御を確認したところ、Nanog mRNA の発現レベルは骨芽細胞分化誘導系のみ、IL-6/sIL-6R 刺激の両方で刺激後8時間をピークに抑制が認められたが、Oct3/4 mRNA の発現レベルはIL-6/sIL-6R 刺激でのみ特異的に低下が認められた。これはTNF 刺激では認めなかった。

脂肪分化抑制因子 (WNT family) や脂肪細胞分化マーカー (PPAR) への影響はなかった。

IL-6/IL-6R刺激はOct3/4発現を抑制する



ADSC(1x10⁶cells)をOIM(骨芽細胞分化誘導培地)にIL-6/sIL-6R(100ng/ml), TNFα(1.0ng/ml)添加して培養
TET1, TET2, TET3 (DNA脱メチル化酵素)をRT-PCR法で培養2hr, 8hr, 24hr, 3day, 7dayで評価

(4) 通常の骨芽細胞分化では TET1 が DNMT と競合的に働き Nanog 遺伝子の転写制御を行うことで骨芽細胞分化に誘導する可能性が示唆された。一方で、骨芽細胞分化誘導系において IL-6/sIL-6R 刺激は、TET1 の発現抑制を誘導し Oct3/4 遺伝子の発現抑制を誘導することで、骨芽細胞分化促進作用を引き起こす可能性が示唆された。

(5) 異所性石灰化を合併する炎症性疾患の患者検体 (血清・皮下脂肪組織) を用いた解析では、IL-6/STAT3 シグナルによる TET1 発現への影響を確認するとともに、疾患特異的な脂肪分化破綻因子の特定を行う目的で、患者血清中の石灰化抑制因子である (futuin-A) の測定、皮下脂肪組織での IL-6 産生細胞、TET1 発現細胞の割合を確認している。症例の蓄積を行い、非炎症性疾患の患者検体と比較検討を行っていくことで病因解明と新たな治療戦略開発を期待したい。

参考文献

- Chander S, Gordon P. Soft tissue and subcutaneous calcification in connective tissue disease. *Gurr Opin Rheumatol.* 2012 Mar,24(2):158-64
- Oshita K, Yamaoka K, Udagawa N, Fukuyo S, Sonomoto K, Maeshima K, Kurihara R, Nakano K, Saito K, Okada Y, Chiba K, Tanaka Y. human mesenchymal stem cell inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production *Arthritis*

Rheum 63:1658-1667, 2010

(3) Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. Interleukin-1 induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblast via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway. Arthritis Rheum 64:3355-3363, 2012

(4) Maria Berdasco, Consolacion Melguizo, Jose Prados, et al. DNA Methylation Plasticity of Human Adipose-derived Stem Cells in Linage Commitment. The American Journal of Pathology. 181(6):2079-2093, 2012

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福與 俊介 (FUKUYO Shunsuke)

産業医科大学・医学部・非常勤助教

研究者番号 : 00449943