

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野インプラント再生補綴学	身分 大学院生	氏名 野村 優
論文題名		
<p>DNA Methylation-Based Regulation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Chondrogenic Differentiation</p> <p>(ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨細胞分化に与える DNA メチル化の影響)</p>		
論文内容の要旨 (2000字程度)		
<p>【目的】 幹細胞は、組織工学または再生医療に必要な不可欠な存在として広く研究され、組織発生や再生における役割が明らかにされてきた。中でも、間葉系幹細胞は、骨や軟骨、脂肪、筋、神経など様々な組織に分化することが可能なことから、多くの臓器再生に応用され、すでに整形外科領域において、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cells; BMSCs) を軟骨創傷部や欠損部位に移植する幹細胞治療が実施されている。しかし、BMSCs の未分化性維持機構や分化制御メカニズムに関して未だ不明な点が多い。</p> <p>また、幹細胞は、環境要因にさらされることでエピジェネティックなメカニズムを通してゲノムの状態が変化し、様々な細胞へと分化することが知られている。このエピジェネティックな変化には、DNA メチル化、ヒストン修飾、non-coding RNA などがある。特に、DNA メチル化は、DNA に長期間維持されるメモリであり、高等生物において正常な発生と細胞分化において極めて重要な役割を担っている。そしてこの DNA メチル化には、DNA 複製の間に娘鎖に DNA メチル化様式を複製するために必要な DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT)1 と発生初期に DNA メチル化様式を形成する DNMT3A, 3B などがある。そこで我々は、BMSCs が軟骨細胞へと分化する過程において、DNMT family により制御される DNA のメチル化が深く関与しているのではないかと考えた。そこで本研究では、hBMSCs の軟骨細胞分化過程における DNMT family の役割の一部を明らかにした。</p>		
【材料と方法】		
<p>1. hBMSCsの軟骨細胞分化培養法とDNMTの発現パターン解析</p> <p>ヒト BMSCs (hBMSCs)をマイクロマス培養法にて 21 日間培養し、軟骨細胞分化過程における DNMT family 遺伝子の発現パターンを定量性 RT-PCR 法にて評価した。</p>		
<p>2. DNMT の過剰発現および発現抑制が軟骨細胞分化に与える影響の検討</p> <p>DNMT3AおよびDNMT3B過剰発現ベクターまたは、DNMT3Aを標的とするsiRNAをhBMSCsに遺伝子導入した。遺伝子導入3時間後、幹細胞関連遺伝子の発現を定量性RT-PCR法にて、また、遺伝子導入したhBMSCsをマイクロマス培養法で培養し、軟骨細胞分化関連遺伝子の発現量を定量性RT-PCR法にて評価した。また、組織切片を作製し、トリイジンブルー染色、COLIIの免疫組織化学染色を行い、組織学的に評価した。</p>		

3. DNAメチル化阻害薬がhBMSCsの軟骨細胞分化に与える影響の検討

DNAメチル化阻害薬である5-*aza*-2-deoxycytidine (5-AZA)がhBMSCsの軟骨細胞分化に与える影響を、上記2と同様の方法で、5-AZAにて24時間処理したhBMSCsを軟骨細胞へと分化誘導することにより評価した。

4. 幹細胞マーカー遺伝子のプロモーター領域のメチル化の確認

DNMT3A, またはDNMT3Bを過剰発現させたhBMSCsからDNAを回収・精製し、バイサルファイト処理を行い、*NANOG*および*POU5F1*プロモーター領域におけるCpGアイランドのメチル化の状態を、それぞれの遺伝子のメチル化を特異的に検出可能なプライマーを用いて、PCR法にて評価した。

【結果】

1. 軟骨細胞分化過程におけるDNMT familyの遺伝子発現パターン解析

軟骨細胞分化誘導21日目において、培養開始時と比較し、*DNMT3A*の発現は3.77倍 (unpaired t-test, $p < 0.001$), *DNMT3B*の発現は16.0倍 ($p < 0.001$)に上昇した。しかし、*DNMT1*の発現に差は認めなかった。

2. DNMT過剰発現および発現抑制が軟骨細胞分化に与える影響

DNMT3A 強制発現群では対照群と比較し、Aggrecan 遺伝子 (*ACAN*; 5.90倍, $p < 0.001$), Type II collagen alpha 1 遺伝子 (*COL2A1*; 221倍, $p < 0.001$)の発現は有意に上昇した。また、*DNMT3B* 強制発現群では *ACAN* が2.77倍 ($p < 0.01$), *COL2A1* が7.57倍 ($p < 0.01$)に発現が上昇した。組織学的解析の結果、*DNMT3A*, *3B* 両強制発現群においてCOL II陽性の軟骨基質が増加した像が観察され、軟骨細胞への分化誘導能は*DNMT3B*と比較し、*DNMT3A*の方が高かった。

そこで、siRNAを用いて*DNMT3A*の発現を抑制した結果、発現抑制群では対照群と比較し、*ACAN* (0.812倍, 有意差なし), *COL2A1* (0.760倍, $p < 0.05$)の発現が抑制され、トリインブルー陽性の軟骨基質の形成も抑制された。

3. DNMT 過剰発現が幹細胞関連遺伝子の発現およびDNAプロモーター領域のメチル化に与える影響

DNMT3A 及び*DNMT3B*を強制発現させると幹細胞マーカーである*NANOG*及び*POU5F1*の発現は、有意に抑制された。また、*NANOG*及び*POU5F1*のプロモーター領域は*DNMT3A*及び*DNMT3B*を強制発現させることによりメチル化が亢進した。

4. DNAメチル化阻害薬5-AZAがhBMSCsの軟骨細胞分化に与える影響の検討

hBMSCを外因性脱メチル化剤である5-AZAで処理した結果、対照群と比較し、*DNMT3A*の発現量は有意に減少し、*ACAN* (0.436倍, $p < 0.01$), *COL2A1* (0.737倍, $p < 0.001$)の発現が抑制された。また、組織学的解析の結果、5-AZA処理により、トリインブルー陽性の軟骨基質形成が顕著に抑制された。

【結論と考察】

hBMSCsの軟骨細胞への分化過程において、遺伝子発現が増加する*DNMT3A*および*DNMT3B*は、hBMSCsの軟骨細胞分化を正に制御し、その効果は*DNMT3A*の方が顕著であることが明らかとなった。そのメカニズムの一つとして、*DNMT3A*や*DNMT3B*は、*NANOG*, *POU5F1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を促進し遺伝子発現を抑制することで、hBMSCsを未分化状態から解放している可能性が示唆された。今後は、hBMSCsが軟骨細胞へと分化する過程において、*DNMT3A*や*DNMT3B*によって発現制御を受けている遺伝子をメチル化アレイやRNA-Seq解析を通してより詳細に明らかにしていく予定である。