

博士論文

間葉系幹細胞の分化制御：

三次元細胞密度変化による遺伝子発現プロファイル変化と

CRISPR-Cas9システムを用いる遺伝子発現制御

氏 名 古旗 祐一

目次

第 1 章 諸言	3
第 2 章 三次元細胞密度変化による遺伝子発現プロファイル変化	
2-1 要旨	9
2-2 序文	10
2-3 実験方法	12
2-4 結果	19
2-5 考察	39
第 3 章 CRISPR-Cas9 システムを用いる遺伝子発現制御	
3-1 要旨	43
3-2 序文	44
3-3 実験方法	46
3-4 結果	65
3-5 考察	98
第 4 章 総括	103
謝辞	105
参考文献	106

第 1 章

緒言

間葉系幹細胞

今から四十年ほど前に Friedenstein らは、大部分が浮遊細胞で構成される骨髄中に接着性細胞が存在することを見出した¹。彼らは骨髄から抽出した細胞をプラスチック培養皿で培養し、浮遊細胞を除去することで、線維芽細胞様の接着性細胞を分離した。本細胞は初代培養細胞であるにも関わらず、効率的な増殖及び安定的な培養が可能であった。その後の研究において当該細胞分画が幹細胞であること、生体内及び生体外のどちらにおいても骨や脂肪、軟骨などの細胞に分化可能な多分化能を持つことなどが明らかとなった²⁻⁴。現在では骨髄だけでなく、脂肪や羊水、骨膜や臍帯など生体の様々な間葉系組織に類似の細胞が存在することが明らかとなっている⁵⁻⁸。このように間葉系組織から採取可能であることから、本細胞は間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSC) と呼ばれるようになった。

MSC 研究の変遷

発見以降 MSC は世界中の細胞研究者から注目され、その細胞機能が盛んに研究されてきた。もともと MSC は骨髄から発見されたため、骨髄由来の主要な幹細胞である造血幹細胞を取り巻く微小環境 (niche) として研究されていた。しかし前述のように様々な細胞に分化可能であることが明らかとなり、傷害を受けた組織に対して機能的細胞を補充する幹細胞としての研究が盛んになった。例えば胎児期において損傷した組織に MSC を投与すると、損傷部位に生着し、分化することが明らかとなっている。また膝関節に MSC を移植した際にも同様の組織修復が観察されている⁹。さらに近年では自身が分化して損傷組織を補完する機能に加え、組織損傷部位に自発的に遊走し、周囲の細胞の組織再生を促進する様子が観察されている。損傷部位に誘導された MSC は周囲の細胞と相互作用し、増殖因子や免疫調節因子の分泌を通して組織修復を促進すること

が明らかとなっている¹⁰⁻¹²。このように MSC は他の細胞には見られない特徴的な機能を多く有しており、発見されて数十年が経つ現在でも盛んに研究されている。

MSC が持つ多分化能

MSC から誘導される代表的な細胞として骨芽細胞、脂肪細胞及び軟骨細胞の三種類が挙げられる。またこれらの細胞に分化可能であることが MSC の定義にもなっており、それぞれの細胞への分化誘導方法が既に確立されている。例えば dexamethasone, L-ascorbic acid, β -glycerophosphate を含む培地で培養することでアルカリホスファターゼの発現が増加し、MSC の骨芽分化が誘導されることがわかっている。骨芽分化誘導には通常 2-3 週間を要し、分化すると骨芽細胞の特徴であるカルシウム沈着を呈する¹³。また脂肪分化誘導には dexamethasone, indomethacin, 3-isobutyl-1-methylxanthine, insulin を含む培地が用いられる。誘導された脂肪細胞は中性脂質から成る油滴を有し、*PPARG* や *LPL* といったマーカー遺伝子を発現する¹³。さらに MSC を遠心し、ペレット状にして TGF β 存在下で培養すると、軟骨細胞に分化することが報告されている。こうして誘導された軟骨細胞は II 型コラーゲンやグリコサミノグリカンなどを豊富に含む細胞外マトリックスを産生する¹³。近年ではこれら三種類の細胞に加えて骨格筋細胞や神経細胞、肝細胞への分化も報告されており、胚葉を超えた分化能、すなわち多能性を持つ可能性が示唆されている (図 1-1)¹⁴⁻¹⁶。

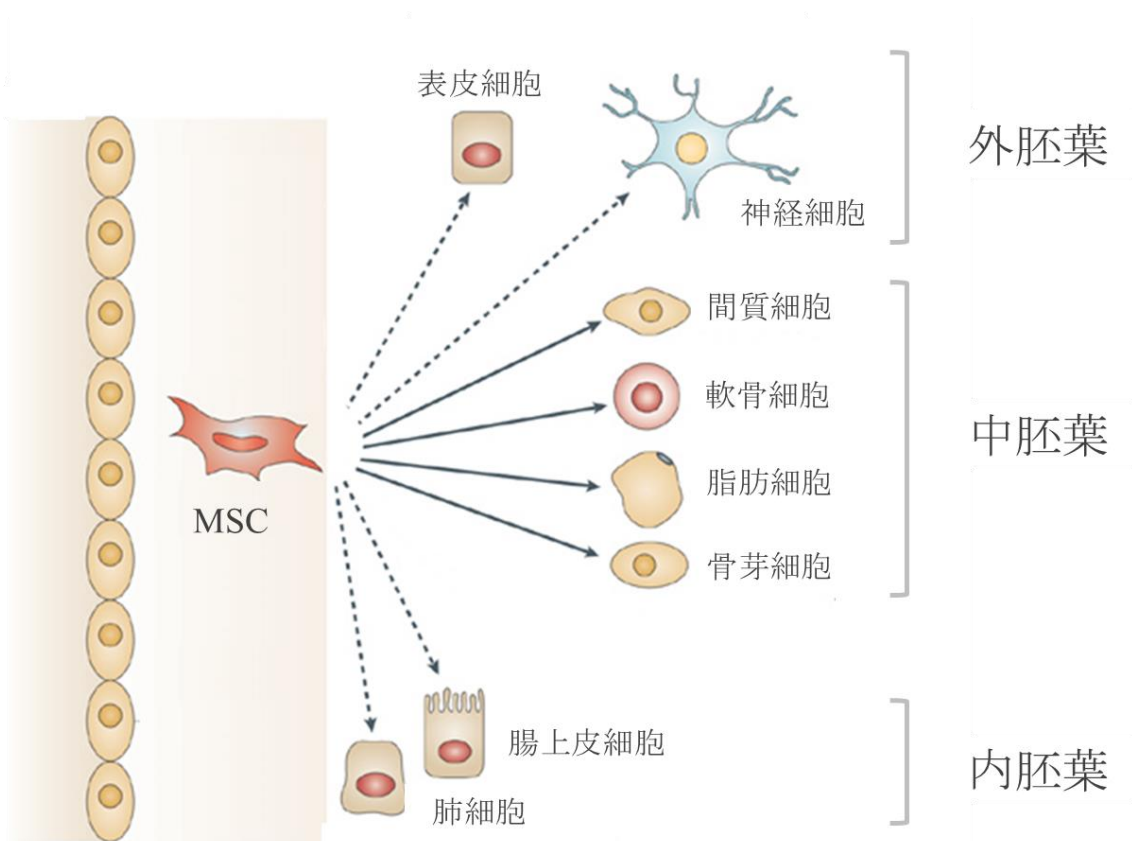


図 1-1 : MSC の多様な分化方向性

骨髄由来の MSC は実線の矢印で示す中胚葉性の細胞に非常に効率よく分化することが知られている。さらに近年では破線矢印で示す外胚葉や内胚葉性の細胞にも分化可能であることが報告されており、MSC が多分化能を持つことが明らかとなりつつある。本図は Uccelli らの論文より引用¹⁷⁾。

MSC の臨床応用

前述のように MSC は、i) 体細胞の niche を調節する、ii) 多様な体細胞に分化する、iii) 傷害を受けた組織に遊走し、免疫調節や組織再生を促進するなど、多種多様な側面から生体内における組織の恒常性維持に寄与していることが明らかとなっている。さらに MSC は生体由来の体性幹細胞であるため、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) や胚性幹細胞 (ES 細胞) と比較して腫瘍化の危険性が少ない、リプログラミングの必要がない、倫理的問題がないといった性質を有する。これらの MSC の特性は、安全性や倫理性を重視する臨床応用に非常に適しており、細胞治療や細胞移植への応用が進められている。一方で生体内における MSC の細胞応答には未解明な部分が多く残されており、幹細胞研究や再生医療の進展には更なる基礎研究が必要とされている。

本研究の目的

私は博士課程の研究において、数ある MSC の細胞機能の中でも、多様な細胞への分化能に着目した。前述のように MSC は骨芽細胞や脂肪細胞、軟骨細胞や筋細胞、神経細胞にまで分化可能であることが報告されているが、中でも骨芽分化及び脂肪分化は非常に効率的に誘導される。また興味深いことに MSC の骨芽及び脂肪細胞への分化は、一方が促進されるともう一方が抑制される競合的な関係にあることが明らかとなっており、骨芽-脂肪分化軸は MSC 分化のモデル系として非常によく研究されている。本研究では、MSC の骨芽-脂肪分化軸に焦点を当て、細胞外微小環境の構築に基づく分化制御と、細胞内遺伝子ネットワークの直接的な活性化に基づく分化制御を試みることにした。

第 2 章

三次元細胞密度変化による 遺伝子発現プロファイル変化

Y. Furuhata et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, 9, 9339-9347.¹⁸

Y. Furuhata et al., *Genes Cells*, 2016, 21, 1380-1386.¹⁹

2-1 要旨

二次元培養系における細胞密度は、MSC の骨芽-脂肪分化軸に大きな影響を及ぼす微小環境要因である。先行研究において MSC は、二次元培養系における低細胞密度においては骨芽細胞へ、高細胞密度においては脂肪細胞への分化指向性を示すことが明らかとなっている²⁰⁻²³。これまでに多くの研究グループが二次元培養系における MSC の分化応答を評価しているが、細胞本来の生育環境である三次元培養環境における評価は不十分であった。

本稿では三次元培養法の一つとして知られるマイクロパタン培養皿を応用した三次元細胞密度評価系の構築、及び三次元細胞密度依存的な MSC の分化指向性の変化を報告する。微小な細胞凝集体を作製可能なマイクロドメイン上の細胞数を調整することで、幅広い三次元細胞密度の MSC 凝集塊を作製した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて本凝集塊の構造解析を実施したところ、ドメイン当たりの細胞数が増加するにつれて細胞が三次元的に密に凝集し、三次元細胞密度が上昇している様子が観察された。さらに本細胞サンプルを利用して三次元細胞密度と MSC 分化指向性の関係を評価したところ、三次元高細胞密度が未分化状態の MSC の骨芽分化能を活性化し、脂肪分化能を抑制することを見出した。さらに本知見を応用して三次元細胞密度の高い条件で骨芽分化誘導を試みたところ、通常の二次元培養法と比較して、分化に要する時間が大幅に短縮化された。これらの実験結果は二次元培養系における、細胞密度の増加に伴って脂肪分化能が促進されるという分化挙動とは大きく異なるものであり、MSC の分化応答を評価する上で、三次元細胞密度の重要性を示すものである。

2-2 序文

MSC は体性幹細胞でありながら、脂肪細胞や骨芽細胞、軟骨細胞等の様々な細胞に分化できる¹⁷。こうした MSC の分化指向性は増殖因子や物理刺激、細胞外マトリックスなどの細胞を取り巻く生物学的微小環境によって制御されている²⁴。さらに近年、足場の性質や細胞の形状、細胞密度といった物理的な微小環境も MSC の分化指向性に大きな影響を及ぼすことが報告されている^{20-23,25,26}。例えば脳や筋肉、骨などの生体組織の弾性を模倣した培養基板は、MSC のそれぞれの組織細胞への分化を促進することが報告されている²⁷。またナノスケールでパターンニングされたストライプ状の溝構造を持つ足場で培養すると MSC は非常によく伸展し、成熟神経細胞様の遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなっている²⁸。

こうした物理的な微小環境要因の中でも二次元培養系における細胞密度は、MSC の分化指向性に多大な影響を及ぼすことが知られており、最も研究が進んでいる²⁰⁻²³。先行研究によると MSC は、二次元培養系における低細胞密度においては骨芽細胞へ、高細胞密度においては脂肪細胞への分化指向性を示す。このように二次元培養系における細胞密度応答は明らかとなっている一方で、細胞本来の生育環境である三次元培養環境における細胞密度効果は未解明であり、本効果を評価可能な実験系の構築及び MSC 分化応答の解明が望まれていた。

三次元細胞培養は、伝統的に利用されている二次元培養と比較して、多方向の細胞間接着や細胞と ECM との相互作用など、生体内の細胞外微小環境を模倣することが可能である。そのため二次元培養では再現できない、細胞本来の機能を引き出すことのできる培養方法として注目を集めており、MSC の臨床応用を目指した研究においても広く利用されている。これまでに、ハイドロジェルやバイオリクター、マイクロパタン培養皿など、多様な手法を利用した MSC の三次元培養例が報告されている²⁹⁻³¹。これら

の研究では三次元培養により MSC の治療能や幹細胞性が向上することが明らかとなっている。また Potapova らはハンギングドロップ法を用いた細胞凝集塊形成により，MSC の遺伝子発現プロファイルが変化し，血管新生や免疫調節，ストレス応答に関連する遺伝子の発現量が大きく上昇することを報告している³²。以上のことから，生体内における培養環境を再現可能な三次元細胞培養に供することで，MSC はその細胞機能や環境応答を大きく変動させることがわかる。

そこで本章における研究では，三次元培養法の一つであるマイクロパタン培養皿を応用した三次元細胞密度評価系の構築，及び三次元細胞密度依存的な MSC の分化指向性の変化を報告する。本章における解析によって，三次元高細胞密度が未分化状態の MSC の骨芽分化能を活性化し，脂肪分化能を抑制することを見出した。本知見は細胞密度の観点からすると，既報の二次元培養系における傾向からは予測できない興味深いものであった。

2-3 実験方法

マイクロパタン培養皿

マイクロパタン培養皿には Cell-able 96 well plate (カタログ番号 PP-96, 東洋合成工業株式会社, 日本) を使用した. 本マイクロパタン培養皿のウェル底面は, poly(ethylene glycol) (PEG) から成るハイドロジェルでコーティングされた細胞非接着性領域と, 100 μm 間隔でパターンニングされた直径 100 μm の円形細胞接着性領域から構成されている. 本マイクロパタン上に播種された細胞は, PEG ハイドロジェルの排除体積効果によって円形細胞接着性領域に集積し, 細胞凝集塊を形成する^{30,33-35}.

細胞培養

本章における実験では脂肪組織由来の MSC (カタログ番号 PT-5006, Lonza Group 株式会社, スイス) を使用した. MSC は Dulbecco's modified eagle's 培地 (DMEM) (カタログ番号 044-29765, 和光純薬工業株式会社, 日本) に 10 % (v/v) fetal bovine serum (カタログ番号 FB-1061/500, Biosera 株式会社, フランス), 1 % (v/v) penicillin-streptomycin-neomycin (PSN) antibiotic mixture (カタログ番号 15640055, Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を添加した培地を用いて 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で培養した. 本章ではこれを「通常培地」と表記する. 三次元細胞密度評価には, MSC を 0.16, 0.32, 0.64, 1.6, and 3.2×10^4 cells/well で Cell-able 96 well plate に播種したものをを用いた. 低酸素応答評価及び分化誘導実験における二次元培養サンプルには, MSC を 3.2×10^4 cells/well で 24-well culture plate (カタログ番号 3820-024, AGC テクノガラス株式会社, 日本) に播種したものをを用いた. 低酸素応答評価及び分化誘導実験における三次元培養サンプルには, MSC を 3.2×10^4 cells/well で Cell-able 96 well plate に播種したものをを用いた. 本章における実験では継代数が 3 から 5 の MSC を使用した.

リアルタイム PCR

RNeasy Micro Kit (カタログ番号 74004, Qiagen 株式会社, ドイツ) を用いて MSC から RNA を抽出した. 次に ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (カタログ番号 FSQ-301, 東洋紡株式会社, 日本) を用いて, 抽出した RNA を逆転写し, cDNA に変換した. それぞれの特異的なプライマーと THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (カタログ番号 QPS-201, 東洋紡株式会社, 日本) を製品説明書通りに混合し, StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を用いてリアルタイム PCR を行った. 95 °C で 60 秒処理した後, 95 °C で 15 秒, 60 °C で 60 秒の処理を 40 サイクルで行うことで cDNA を増幅した. runt related transcription factor 2 (*RUNX2*), alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (*ALPL*), peroxisome proliferator activated receptor gamma (*PPARG*), CCAAT/enhancer binding protein alpha (*CEBPA*), phosphoglycerate kinase 1 (*PGKI*), lactate dehydrogenase A (*LDHA*), adenylate kinase 3-like 1 (*AK3LI*), caveolae associated protein 2 (*CAVIN2*), and actin beta (*ACTB*) の各遺伝子に特異的なプライマーは Untergasser が作製した Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いて設計し, Ye らが作製した Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)³⁶ を用いて特異性の高いものを選択した. 本解析で用いたプライマー配列は表 2-1 に示す. 得られたデータは StepOne Software v2.2.2 (Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を用いて $\Delta\Delta C_t$ 法で解析した. 各遺伝子の発現量は *ACTB* の発現量で標準化した後に, 各図に示すサンプルの発現量で規格化した. 本解析は独立して三回以上実施した.

表 2-1 リアルタイム PCR で用いたプライマー配列

遺伝子名	プライマー配列	増幅産物の長さ (bp)
<i>RUNX2</i>	F 5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'	87
	R 5'-CATGACAGTAACCACAGTCCCATC-3'	
<i>ALPL</i>	F 5'-ACATGCAGTACGAGCTGAAC-3'	128
	R 5'-AATTCTGCCTCCTTCCACCAG-3'	
<i>PPARG</i>	F 5'-TGGTTGACACAGAGATGCCA-3'	136
	R 5'-GGAGTAGAAATGCTGGAGAAGTC-3'	
<i>CEBPA</i>	F 5'-AACACGAAGCACGATCAGTC-3'	143
	R 5'-AGACGCGCACATTCACATTG-3'	
<i>PGK1</i>	F 5'-TGCTGTGCCAAATGGAACAC-3'	83
	R 5'-TTACCTTCCAGGAGCTCCAAAC-3'	
<i>LDHA</i>	F 5'-TCCAACATGGCAGCCTTTTC-3'	85
	R 5'-ATGACCAGCTTGGAGTTTGC-3'	
<i>AK3L1</i>	F 5'-ACTTTGGTCTCCAGCATCTCTC-3'	85
	R 5'-TGCTTTGCCATCTCACCAAC-3'	
<i>CAVIN2</i>	F 5'-TGAGCAGATGCCAAATGACC-3'	96
	R 5'-TCTGCAATTTCCCCTTCCAC-3'	
<i>ACTB</i>	F 5'-AACTGGAACGGTGAAGGTGACAGC-3'	158
	R 5'-TGGCTTTTAGGATGGCAAGGGAC-3'	

RUNX2: Runt Related Transcription Factor 2, *ALPL*: Alkaline Phosphatase, Liver/Bone/Kidney, *PPARG*: Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma, *CEBPA*: CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha, *PGK1*: Phosphoglycerate Kinase

1, *LDHA*: Lactate Dehydrogenase A, *AK3L1*: Adenylate Kinase 3-Like 1, *CAVIN2*:
Caveolae Associated Protein 2, *ACTB*: Actin beta

本表は出版社より許可を得て引用^{18,19}

細胞の生存率評価

MSC を 3.2×10^4 cells/well で Cell-able 96 well plate に播種し、4 週間培養した。PBS で洗浄後、live-dead cell staining kit (カタログ番号 K501-100, BioVision 株式会社, アメリカ) を用いて製品説明書通りに染色を行った。PBS で二回洗浄後、蛍光顕微鏡 (IX51S8F-3, オリンパス株式会社, 日本) で蛍光染色画像を取得した。

マイクロパターン培養細胞の構造解析

二次元蛍光画像の取得は以下の手順で行った。MSC を 0.16, 0.32, 0.64, 1.6, and 3.2×10^4 cells/well で Cell-able 96 well plate に播種し、5 日間培養した。PBS で洗浄後、 $10 \mu\text{g/mL}$ の Hoechst 33258 (カタログ番号 PK-CA707-40044, PromoCell 有限会社, ドイツ) 及び $1 \mu\text{g/mL}$ の Calcein-AM 溶液 (カタログ番号 341-07901, 株式会社同人化学研究所, 日本) を含む PBS を加え、 37°C で 30 分間静置した。PBS で三回洗浄後、蛍光顕微鏡 (AxioObserver Z1, Carl Zeiss 株式会社, ドイツ) で蛍光染色画像を取得した。三次元蛍光画像の取得は以下の手順で行った。MSC を 0.16, 0.32, 0.64, 1.6, and 3.2×10^4 cells/well で Cell-able 96 well plate に播種し、5 日間培養した。PBS で洗浄後、 250 nM の MitoTracker Red CMXRos Mitochondrial Probe (カタログ番号 PA-3017, Lonza Group 株式会社, スイス) を含む PBS を加え、 37°C で 30 分間静置した。PBS で三回洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (C2+, 株式会社ニコン, 日本) を用いて焦点面を少しずつずらして蛍光画像を取得した。NIS Elements ソフトウェア (株式会社ニコン, 日本) を用いて得られたデータを三次元再構築し、Z 軸方向の厚みに応じて疑似カラー表示を行った。細胞凝集塊の最大厚さの評価には各細胞密度につき 20 ドメイン以上、体積の定量には各細胞密度につき 3 ドメイン以上のサンプルを使用した。

骨芽分化誘導

二次元培養及び三次元培養した MSC を通常培地に 10 nM の dexamethasone (カタログ番号 047-18863, 和光純薬工業株式会社, 日本), 50 μ M の L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate (カタログ番号 013-19641, 和光純薬工業株式会社, 日本) 及び 10 mM の disodium β -glycerophosphate pentahydrate (カタログ番号 046-31251, 和光純薬工業株式会社, 日本) を添加した骨芽分化誘導培地で最長で 2 週間培養した. 培地交換は 3 日おきに行った. 分化誘導の陰性対照サンプルには通常培地で最長で 2 週間培養した MSC を用いた. 誘導 4 日後, 7 日後, 14 日後において, 骨芽細胞特異的なカルシウム沈着を可視化するために, 以下の手順でアリザリンレッド S 染色を行った. 骨芽分化誘導をした MSC を PBS で洗浄後, 4% (w/v) paraformaldehyde を含む PBS を加え, 室温で 15 分間固定した. PBS で三回洗浄後, methanol を加え, -20 $^{\circ}$ C で 10 分間静置した. 超純水で洗浄後, アリザリンレッド S 染色液を用いて室温で 5 分間染色した. アリザリンレッド S 染色液には, 終濃度 10 μ g/mL になるように超純水で alizarin red S (カタログ番号 011-01192, 和光純薬工業株式会社, 日本) を溶かし, 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 4.2 に調整したものを用いた. 超純水で三回洗浄した後, 位相差顕微鏡 (IX51S8F-3, オリンパス株式会社, 日本) で染色画像を取得した. 観察後, 5% formic acid を含む超純水で alizarin red S を溶出させ, NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を用いて 414 nm における吸光度を定量した.

脂肪分化誘導

二次元培養及び三次元培養した MSC を Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium (カタログ番号 C-28011, PromoCell 有限会社, ドイツ) で 2 週間培養した. 培地交換は 2 日おきに行った. 誘導 4 日後, 7 日後, 14 日後において, 脂肪細胞特異的な油滴構造を可視化するために, 以下の手順でオイルレッド O 染色を行っ

た. 脂肪分化誘導をした MSC を PBS で洗浄後, 4 % (w/v) paraformaldehyde を含む PBS を加え, 室温で 15 分間固定した. PBS で二回洗浄後, 60 % (v/v) isopropyl alcohol を含む超純水を加え, 室温で 1 分間静置した. 0.9 mg/mL の oil red O (カタログ番号 154-02072, 和光純薬工業株式会社, 日本) 及び 60 % (v/v) isopropyl alcohol を含む超純水を用いて室温で 15 分間染色した. 超純水で二回洗浄した後, 位相差顕微鏡 (IX51S8F-3, オリンパス株式会社, 日本) で染色画像を取得した.

統計解析

遺伝子発現量, アリザリンレッド S 染色剤の吸光度, 細胞凝集塊の体積は平均値 \pm 標準誤差を示す. 二群間の統計的有意差検定にはスチューデントの t 検定を使用した.

2-4 結果

マイクロパタン培養皿を用いた MSC の三次元培養

序文で述べた通り本研究では MSC の三次元細胞培養法として、細胞接着を精密に制御可能なマイクロパタン培養皿を用いることとした。マイクロパタン培養皿は図 2-1A に示すように poly(ethylene glycol) (PEG) から成るハイドロジェルでコーティングされた細胞非接着性領域と、コーティングされていない円形細胞接着性領域（マイクロドメイン）から構成されている。細胞はマイクロドメイン（図中の白い円）に接着可能であり、通常の三次元培養では本マイクロドメイン上に多数の細胞が蓄積することで、スフェロイドと呼ばれる球状の細胞凝集塊が形成される^{30,33-35}。一般的に、大きな細胞凝集塊の内部は培地から離れているため、酸素濃度の低下や栄養分の枯渇、老廃物の蓄積によるネクロシスが起りやすいことが知られている³⁷。一方で、低酸素環境が MSC の骨芽分化に影響を及ぼすことが報告されている^{38,39}。つまり三次元培養環境が細胞機能（特に MSC の骨芽-脂肪分化軸）に与える影響を正確に評価するためには、三次元培養に付随する副産物的要因を排除することが重要である。一般的には細胞凝集塊の直径を 150 μm 以下に設定することで、上述の副産物的要因を無視できると考えられている。そこで本研究では、マイクロドメインの直径が 100 μm のマイクロパタン培養皿を用いることとした。

三次元培養条件最適化のため、本マイクロパタン培養皿にドメイン当たり 20 細胞、40 細胞、60 細胞の条件で MSC を播種し、位相差顕微鏡画像を取得した（図 2-1B）。その結果、ドメイン当たり 20 細胞を播種した場合、細胞があまり蓄積していないように観察された。一方でドメイン当たり 60 細胞を播種した場合には、隣接したマイクロドメイン間で細胞凝集塊同士が接着してしまう様子が観察された。そこで以降の実験ではドメイン当たり 40 細胞を播種することで、MSC の三次元培養を行うこととし

た。

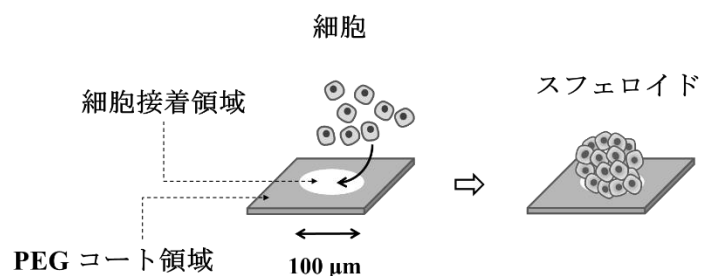
続いて作製した細胞凝集塊における MSC の酸素状態を評価するために、低酸素応答遺伝子の発現量を測定することとした。本研究では低酸素応答遺伝子として *PGK1*, *LDHA* 及び *AK3L1* を選択した^{40,41}。こうした遺伝子はプロモーター領域に低酸素応答性領域と呼ばれる DNA 配列を持つことが明らかとなっている。低酸素条件下において細胞内の HIF と呼ばれる低酸素環境応答性転写因子が活性化され、低酸素応答性領域に結合し、下流の遺伝子の転写活性化する。すなわち、これらの遺伝子発現を解析することで、細胞の低酸素応答の有無を知ることができる。二次元培養及び三次元培養された MSC においてこれら三遺伝子の発現量を定量したところ、図 2-2 に示すように有意な差は観察されなかった。このことから一ドメイン当たり 40 細胞を播種する三次元培養条件は MSC の低酸素環境応答を誘導しないことが明らかとなった。

同様に、作製した細胞凝集塊における MSC の栄養状態を評価するために、*CAVIN2* 遺伝子の発現量を測定することとした。先行研究において、貧栄養条件下の細胞では本遺伝子の発現量が大きく上昇することが報告されている⁴²。実際に、MSC を低血清培地で培養したところ、*CAVIN2* の発現量が 3 倍程度上昇することが明らかとなった（図 2-3）。一方で通常培地を用いて二次元培養及び三次元培養した MSC における *CAVIN2* 遺伝子の発現量を比較したところ、三次元培養は MSC における本遺伝子の発現を活性化しないことが明らかとなった。このことから、本研究における三次元培養条件は MSC の貧栄養応答も誘導していないことが明らかとなった。

最後に老廃物の蓄積によるネクロシスの影響を評価するために、三次元培養した MSC を 4 週間培養した後に細胞の生存率評価を行った。その結果、図 2-4 に示すように播種後 4 週間経過してもネクロシスした細胞は観察されなかった。これらの結果から、本研究で作製した細胞凝集塊は十分に小さく、酸素濃度の低下や栄養分の枯渇、老廃物の蓄積によるネクロシスといった三次元培養に付随する副産物的現象を誘導し

ないことが明らかとなった。したがって、本実験系を用いることで三次元培養環境が及ぼす影響のみを正確に評価可能であると考えられる。

A



B

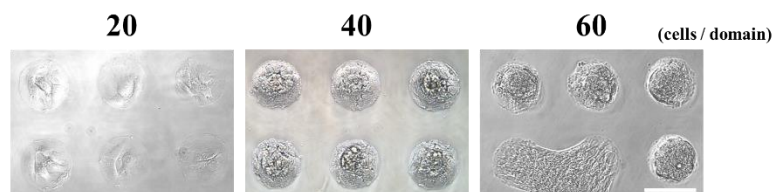


図 2-1 : マイクロパタン培養皿を用いた MSC の三次元細胞培養

(A) マイクロパタン培養皿を用いた通常の三次元細胞培養の概略図. マイクロパタン上の播種された細胞は PEG の排除体積効果によって円形の細胞接着領域に蓄積し, 多細胞から成る球状の細胞凝集塊 (スフェロイド) を形成する. (B) MSC を一ドメイン当たり 20, 40, 60 細胞になるようにマイクロパタン培養皿に播種し, 24 時間培養した後取得した位相差顕微鏡画像. 各サンプルの中で代表的な画像を示す. スケールバーは 100 μm を示す. (A) は出版社より許可を得て引用¹⁸. (B) は出版社及び共同研究者である菊池氏より許可を得て引用^{19,43}.

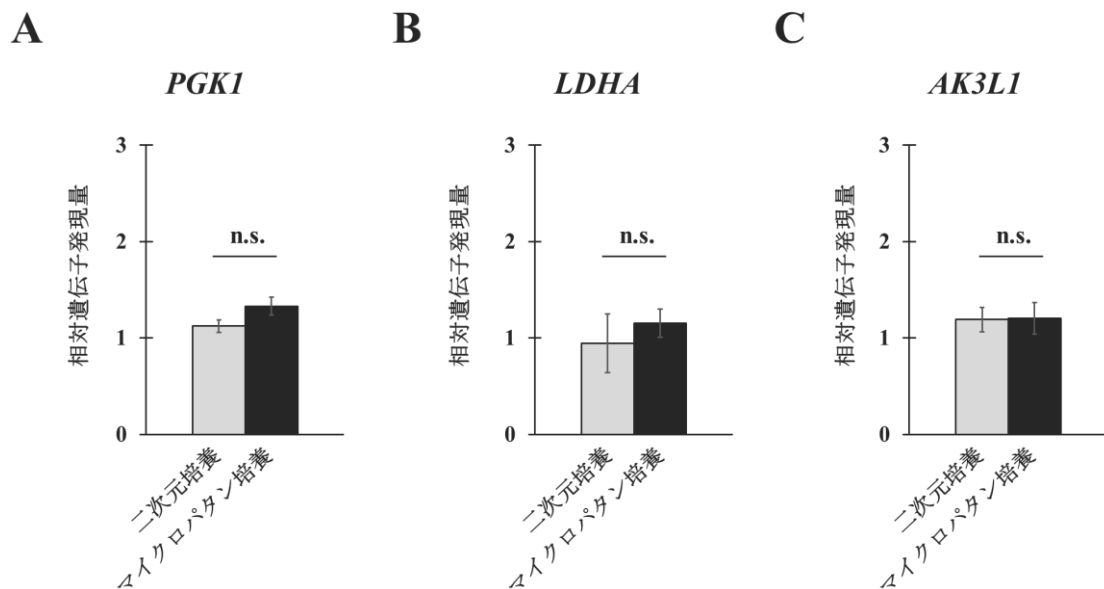


図 2-2 : MSC における低酸素応答遺伝子の発現量

MSC を二次元培養及びマイクロパターン培養に 5 日間供した後に、リアルタイム PCR を用いて低酸素応答遺伝子である (A) *PGK1*, (B) *LDHA* 及び (C) *AK3L1* の発現量を定量した。各遺伝子の発現量は *ACTB* の発現量で標準化した後、二次元培養したサンプルの発現量で規格化した。グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており、エラーバーは標準誤差を示している。グラフ中の n.s. は有意差がないことを示す。本図は出版社より許可を得て引用¹⁸。

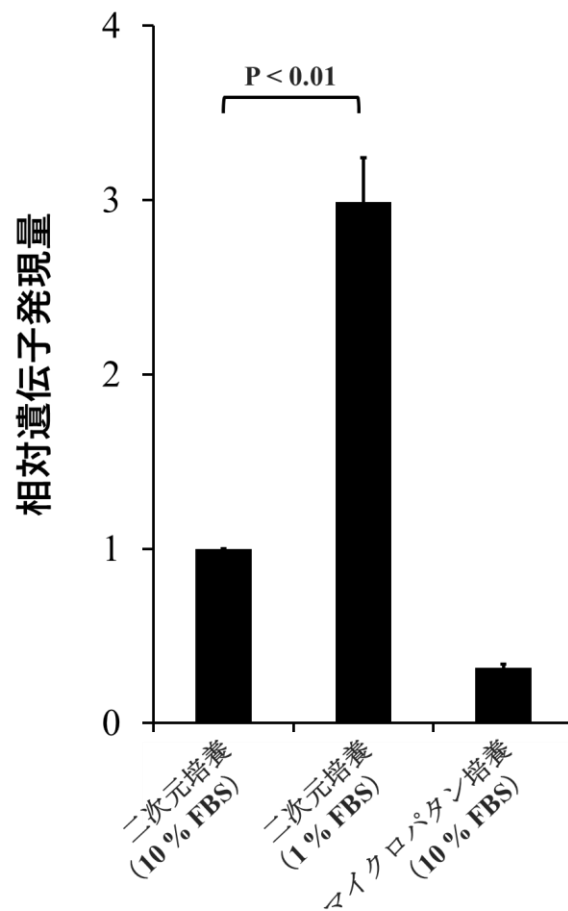


図 2-3 : MSC における貧栄養応答遺伝子の発現量

播種して 24 時間後の MSC を二次元培養 (10 % FBS), 二次元培養 (1 % FBS) 及びマイクロパターン培養 (10 % FBS) に 24 時間供した後に, リアルタイム PCR を用いて貧栄養応答遺伝子である *CAVIN2* の発現量を定量した. 各遺伝子の発現量は *ACTB* の発現量で標準化した後, 二次元培養 (10 % FBS) したサンプルの発現量で規格化した. グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており, エラーバーは標準誤差を示している. 本図は出版社より許可を得て引用¹⁹.

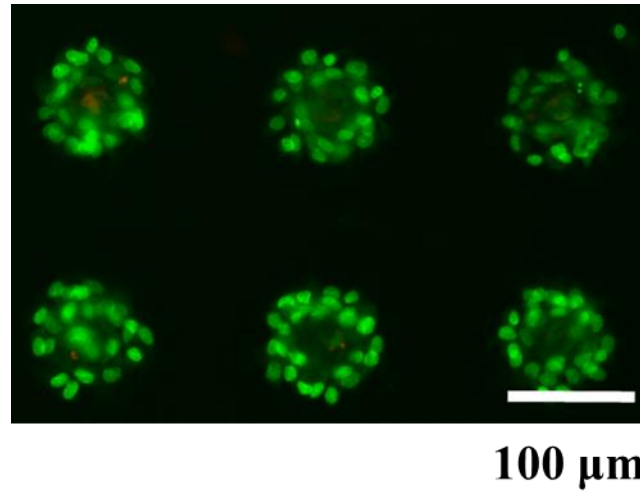


図 2-4 : マイクロパタン培養した MSC の生存率評価

MSC を一ドメイン当たり 40 細胞になるようにマイクロパタン培養皿に播種し、4 週間培養した後に Live/Dead 染色を行った。生細胞を緑、死細胞を赤で示す。スケールバーは 100 μm を示す。本図は出版社及び共同研究者である菊池氏より許可を得て引用^{19,43}。

三次元細胞密度評価系の構築

通常のマイクロパタン培養ではマイクロドメイン上に多数の細胞を蓄積させることで、細胞凝集塊が形成される^{30,33-35}。私は細胞を「蓄積」させることで三次元細胞凝集塊を作製するというマイクロパタン培養皿の特長に着目し、一ドメイン当たりの播種細胞数を変えることで細胞の蓄積レベルが変化し、三次元的な細胞蓄積量、つまり三次元細胞密度の評価系が構築できるのではないかと考えた。本仮説を検証するために、図 2-5 に示すように一ドメイン当たり 2 細胞（二次元培養におけるコンフルエントになる細胞密度）から 40 細胞まで細胞数を調整し、マイクロパタン培養皿に MSC を播種した。MSC の蓄積レベルを評価するために、Hoechst 33258 と Calcein AM を用いて MSC の核と細胞質の蛍光染色を行った。本サンプルを蛍光顕微鏡で観察したところ、図 2-6 に示すように一ドメイン当たり 2 細胞及び 4 細胞を播種した場合には単層上の構造を形成しているように観察された。一方で、一ドメイン当たり 8 細胞を播種した場合には細胞が部分的に折り重なっており、20 細胞、40 細胞のサンプルでは多層上の構造が形成されていることが示唆された。これらの実験結果から、マイクロパタン培養皿上に細胞数を変えて細胞を播種するだけで、MSC の蓄積レベルを制御可能であることが示唆された。

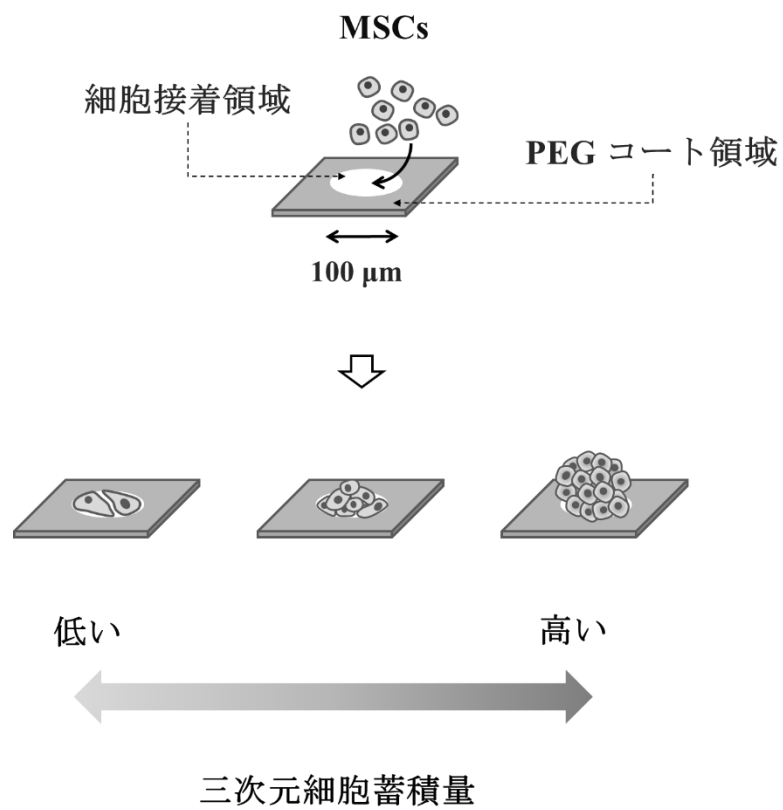


図 2-5 : マイクロパタン培養皿を用いた三次元細胞蓄積量制御の概略図

マイクロパタン上に細胞数を変えて MSC を播種することで，図のように蓄積レベルの異なる細胞サンプルを作製できると考えられる．本図は出版社より許可を得て引用¹⁸⁾．

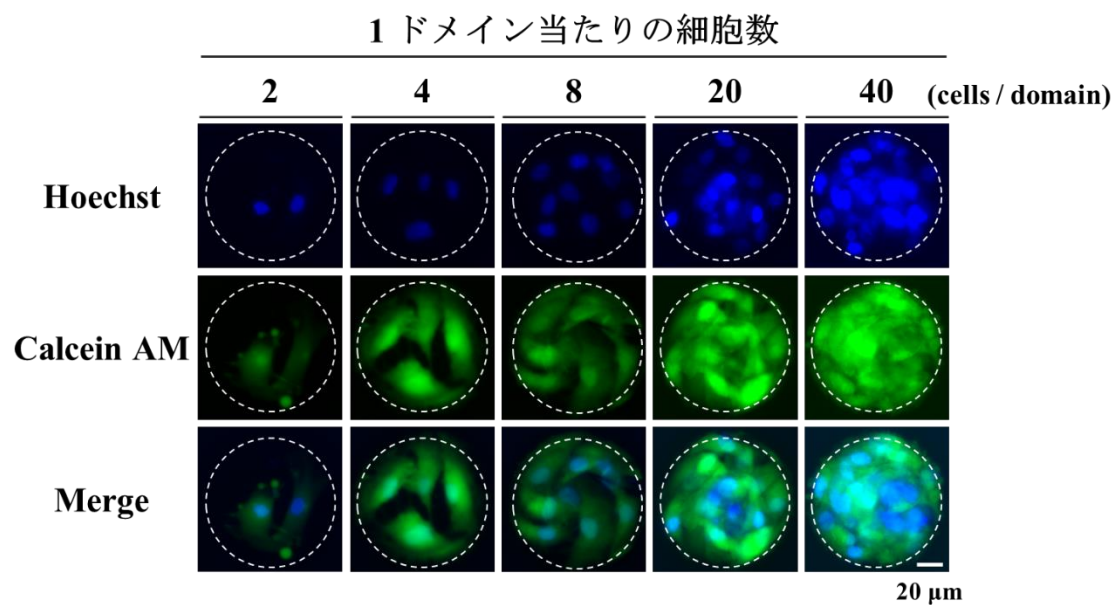


図 2-6 : マイクロパタン培養皿における MSC の二次元蛍光染色画像

MSC を一ドメイン当たり 2, 4, 8, 20, 40 細胞になるようにマイクロパタン培養皿に播種し, 5 日間培養した後に Hoechst 33258 (青) と Calcein AM (緑) で蛍光染色した. 各サンプルの中で代表的な画像を示す. スケールバーは 20 μm を, 円形の破線はマイクロドメインの輪郭を示す. 本図は出版社より許可を得て引用¹⁸.

共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元構造解析

次に共焦点レーザー顕微鏡を用いて蓄積した細胞の三次元的構造を解析することとした。本目的のために、マイクロパタン培養皿上で培養した MSC を MitoTracker Red CMXRos で染色し、接着状態のまま共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。共焦点レーザー顕微鏡で取得した二次元蛍光画像を NIS Element ソフトウェアを用いて三次元再構築し、細胞凝集塊の構造が分かりやすいように Z 軸方向の厚みに応じて白から濃い赤まで疑似カラーを用いて色分けをした。その結果図 2-7 に示すように、一ドメイン当たり 2, 4 細胞では MSC は単層状の構造を形成していた。一方で一ドメイン当たり 8 細胞以上の細胞を播種した場合には、細胞が蓄積し、多層上の構造を形成している様子が観察された。また、マイクロパタン培養皿を用いて肝芽腫細胞の細胞凝集塊を作製した場合、半球状の構造になることが報告されているが⁴⁴、本研究においても一ドメイン当たり 40 細胞を播種した場合、MSC が半球状の細胞凝集塊を形成する様子が観察された。これらの実験結果は図 2-6 で得られた結果と非常によく一致しており、MSC の蓄積レベルを制御可能であることを支持するものである。

続いて作製した蓄積細胞サンプルの蓄積レベル及び三次元細胞密度をより詳細に解析するために、得られた三次元像を用いて蓄積細胞サンプルの最大厚さ及び体積を評価することとした。その結果播種細胞数の増加に伴って、蓄積細胞サンプルの最大厚さも増加している様子が観察された(図 2-8A)。また一ドメイン当たり 2 細胞ないし 40 細胞播種した場合における最大厚さの平均値はそれぞれ 18 μm , 55 μm であることから、一ドメイン当たり 40 細胞を播種した場合、MSC は約三層からなる細胞凝集塊を形成すると考えられる。さらに体積についても同様に、播種細胞数の増加に伴って増加している様子が観察された(図 2-8B)。しかしながら興味深いことに、体積の増加率は播種細胞数の増加に伴って減少していた。このことは播種細胞数の増加に伴って、凝集塊内の一細胞当たりの体積が減少し、細胞が三次元的に密に凝集していることを示唆している。

これらの三次元構造解析結果から，本研究の第一の目的である，三次元細胞密度評価系の構築が達成されたと言える．

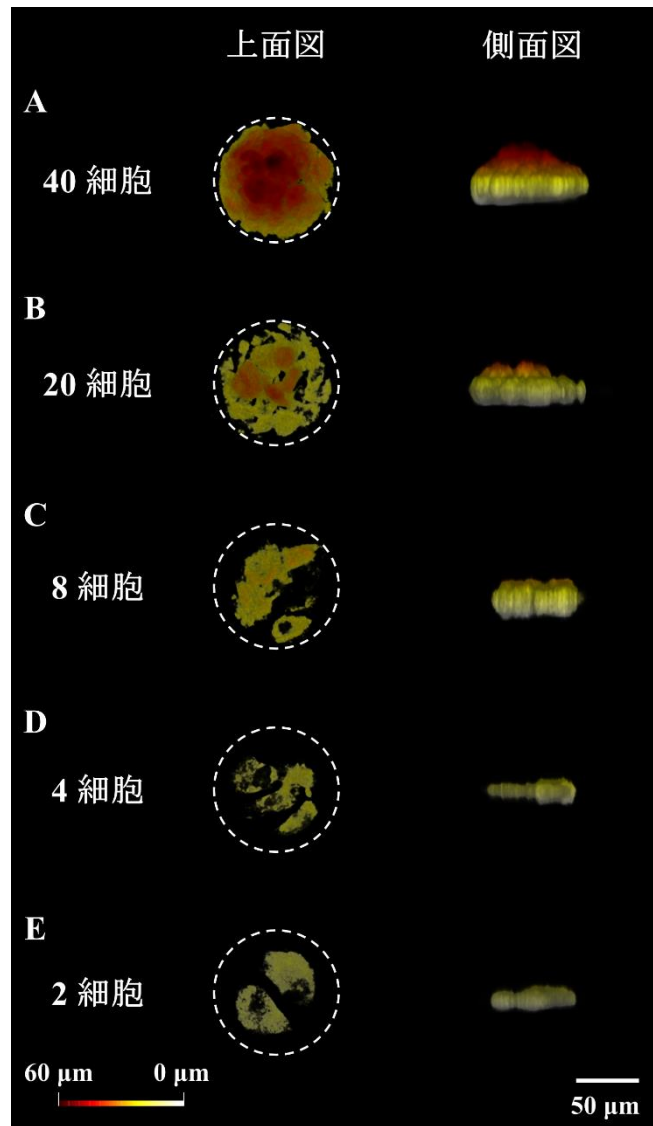


図 2-7 : マイクロパタン培養皿における MSC の三次元蛍光画像

MSC を一ドメイン当たり (A) 2, (B) 4, (C) 8, (D) 20, (E) 40 細胞になるようにマイクロパタン培養皿に播種し, 5 日間培養した後に MitoTracker Red CMXRos で蛍光染色し, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光画像を取得した. 得られた画像データを NIS Element ソフトウェアを用いて三次元再構築し, Z 軸方向の厚みに応じて白から濃い赤まで疑似カラーを用いて色分けをした. 各サンプルの中で代表的な画像を示す. スケールバーは 50 μm を, 円形の破線はマイクロドメインの輪郭を示す. 本図は出版社より許可を得て引用¹⁸.

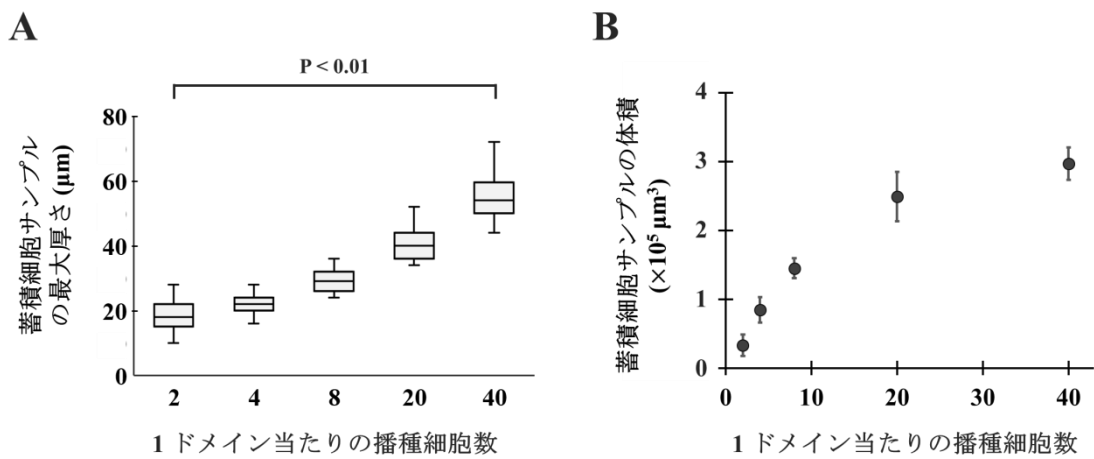


図 2-8 : 蓄積細胞サンプルの三次元構造情報

図 2-7 における解析で得られた三次元再構築画像から、蓄積細胞サンプルの (A) 最大厚さ及び (B) 体積を定量した. (A) は箱ひげ図を, (B) は平均値±標準誤差を示す. 本図は出版社より許可を得て引用¹⁸.

分化関連遺伝子発現量における三次元細胞密度の影響

三次元細胞密度が未分化状態の MSC の骨芽-脂肪分化軸に与える影響を評価するために、通常培地で培養した MSC における分化関連遺伝子の発現量を解析した。骨芽、脂肪それぞれの分化関連遺伝子として、先行研究において分化能の指標とされている *RUNX2*, *ALPL*, *PPARG*, *CEBPA* を用いることとした^{20,30,45-47}。MSC の骨芽分化過程において骨芽前駆細胞特異的な転写因子である *RUNX2* の発現量が上昇し、*ALPL* を含む成熟骨芽細胞マーカーの遺伝子発現を活性化することが知られている^{48,49}。一方で *PPARG* は脂肪分化の主要制御因子であることが知られており、同じく脂肪分化制御因子である *CEBPA* と強調して脂肪分化を促進することが報告されている^{48,50}。リアルタイム PCR を用いてこれら四遺伝子の発現量を定量したところ、興味深いことに、三次元細胞密度の増加に伴って、骨芽分化マーカーである *RUNX2* 及び *ALPL* の発現量が大きく上昇していた（図 2-9A, B）。一方で脂肪分化マーカーである *PPARG* の発現量においては三次元細胞密度依存的な変化は観察されず、同じく脂肪分化マーカーである *CEBPA* の発現量は三次元細胞密度の増加に伴って顕著に減少していた（図 2-9C, D）。これらの結果から、三次元細胞密度の増加は未分化状態の MSC の骨芽分化能を促進し、脂肪分化能を抑制しており、分化誘導前から MSC を骨芽分化方向に運命づけていることが示唆された。

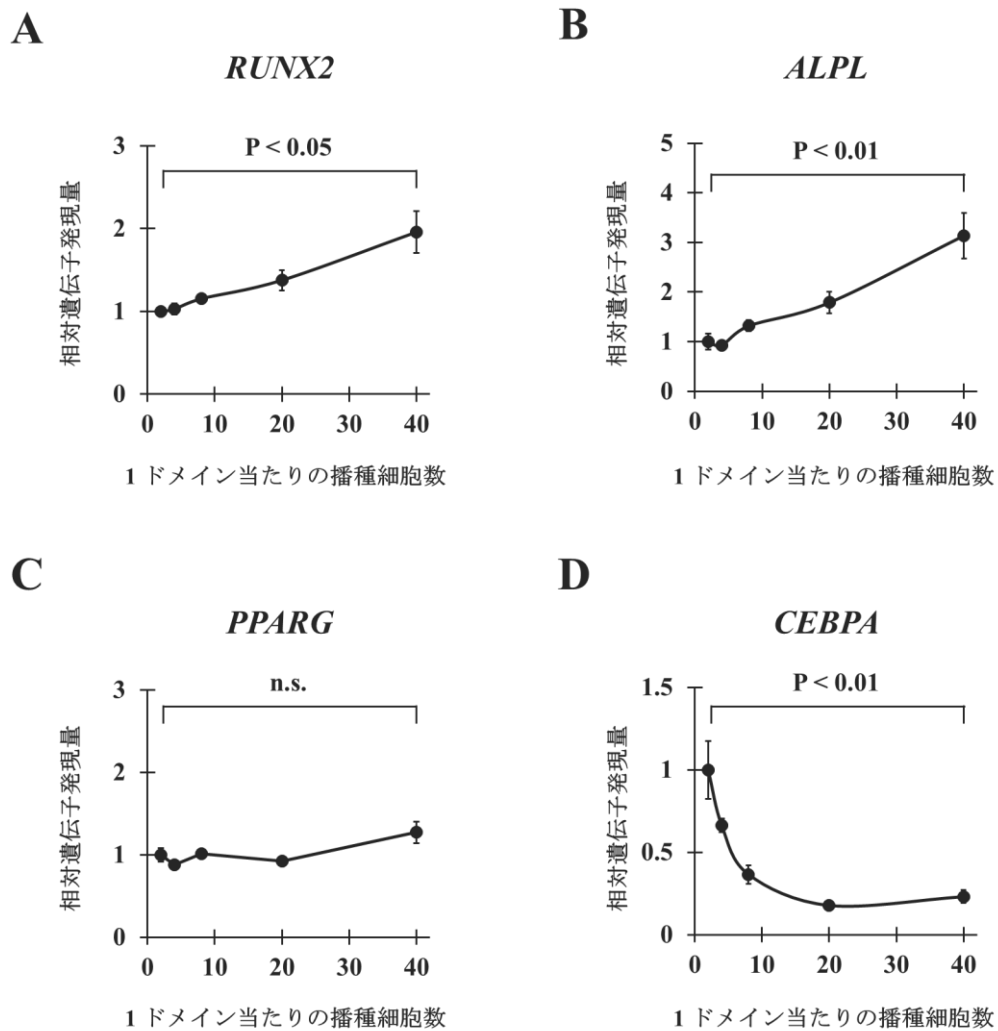


図 2-9 : 三次元細胞密度と分化関連遺伝子発現量の関係

MSC を一ドメイン当たり 2, 4, 8, 20, 40 細胞になるようにマイクロパタン培養皿に播種し, 5 日間培養した後にリアルタイム PCR を用いて分化関連遺伝子である (A) *RUNX2*, (B) *ALPL*, (C) *PPARG*, 及び (D) *CEBPA* の発現量を定量した. 各遺伝子の発現量は *ACTB* の発現量で標準化した後, 一ドメイン当たり 2 細胞播種したサンプルの発現量で規格化した. グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており, エラーバーは標準誤差を示している. グラフ中の n.s. は有意差がないことを示す. 本図は出版社より許可を得て引用¹⁸.

骨芽分化誘導における三次元細胞密度の影響評価

ここまでの実験結果から、三次元高細胞密度は未分化状態の MSC の骨芽分化能を促進し、脂肪分化能を抑制しており、分化誘導前から MSC を骨芽分化方向に運命づけていることが示唆された。そこで本項では実際に最大三次元細胞密度の条件下で MSC の骨芽分化を誘導し、骨芽細胞特異的なカルシウム沈着を染色するアリザリンレッド S 染色を用いて分化効率を評価することとした。図 2-10A に示すように、通常培地を用いた場合、二次元培養及びマイクロパタン培養のどちらにおいても骨芽分化は誘導されず、MSC はアリザリンレッド S で染色されなかった。骨芽分化誘導培地を用いた場合、二次元培養した MSC はアリザリンレッド S 染色されたものの、その染色度は誘導 14 日経過後においても非常に低いものであった。一方でマイクロパタン培養した MSC は、骨芽分化誘導僅か 4 日目でも非常に強くアリザリンレッド S で染色された。そこで誘導 7 日目のアリザリンレッド S 染色細胞において、アリザリンレッド S の抽出及び染色度の定量を行ったところ、二次元培養細胞と比較してマイクロパタン培養細胞はおよそ 6 倍の染色度を示した (図 2-10B)。さらに骨芽分化誘導 7 日目の細胞において、骨芽分化の主要制御遺伝子である *RUNX2* 発現量の定量を行った。その結果図 2-10C に示すように、二次元培養された MSC と比較してマイクロパタン培養された MSC は、およそ 2 倍多くの *RUNX2* を発現していた。以上の結果から、三次元高細胞密度の条件下で培養することにより MSC の骨芽分化能が促進され、分化に必要な時間が大幅な短縮化されるとともに分化効率が上昇することが明らかとなった。

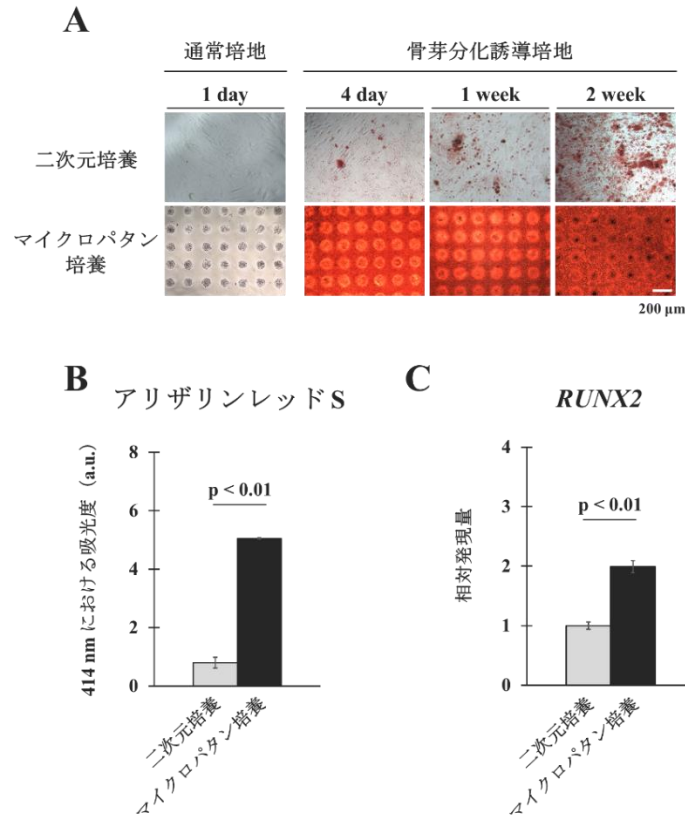


図 2-10 : 三次元培養環境における MSC の骨芽分化挙動

(A) MSC を二次元培養及びマイクロパタン培養に供し、図に記した期間骨芽分化を誘導した後、アリザリンレッド S 染色を行った。陰性対照サンプルには通常培地で培養した MSC を用いた。各サンプルの中で代表的な画像を示す。スケールバーは 200 μm を示す。(B) 7 日間骨芽分化を誘導し、アリザリンレッド S 染色を行った MSC の染色度を定量した。定量には 414 nm における吸光度を用いた。グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており、エラーバーは標準誤差を示す。(C) MSC を 7 日間骨芽分化誘導した後に、リアルタイム PCR を用いて *RUNX2* の発現量を定量した。発現量は *ACTB* の発現量で標準化した後、二次元培養サンプルの発現量で規格化した。グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており、エラーバーは標準誤差を示している。本図は出版社及び共同研究者である菊池氏の許可を得て引用^{18,43}。

脂肪分化誘導における三次元細胞密度の影響評価

続いてマイクロパタン培養皿における MSC の脂肪分化誘導を試みた。骨芽分化誘導同様、最大三次元細胞密度の条件下で脂肪分化を誘導し、脂肪細胞特異的なトリアシルグリセロールの蓄積を可視化可能なオイルレッド O 染色を用いて評価した。図 2-11A に示すように脂肪分化誘導培地を用いて 7 日間以上培養することにより、二次元培養及びマイクロパタン培養のどちらにおいても油滴産生が観察された。しかしながら二次元培養された MSC とマイクロパタン培養された MSC の間で、油滴産生量に大きな差は観察されなかった。次に脂肪分化誘導 7 日目の細胞において、脂肪分化主要制御遺伝子である *PPARG* の発現量を定量した。その結果図 2-11B に示すように、マイクロパタン培養による遺伝子発現量変化は観察されなかった。以上の結果から三次元高細胞密度の条件下で培養しても、MSC の脂肪分化効率は変動しないことが示唆された。

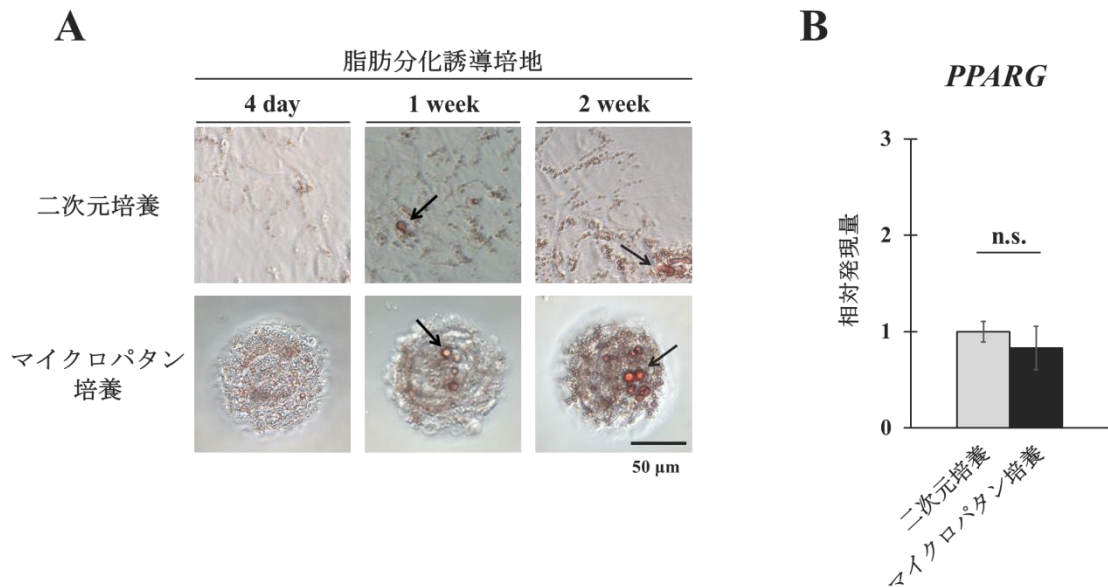


図 2-11：三次元培養環境における MSC の脂肪分化挙動

(A) MSC を二次元培養及びマイクロパタン培養に供し，図に記した日数脂肪分化誘導を行い，オイルレッド O で染色した．各サンプルの中で代表的な画像を示す．黒矢印は油滴を，スケールバーは 50 μ m を示す．(B) MSC を 7 日間脂肪分化誘導した後に，リアルタイム PCR を用いて *PPARG* の発現量を定量した．発現量は *ACTB* の発現量で標準化した後，二次元培養サンプルの発現量で規格化した．グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており，エラーバーは標準誤差を示している．本図は出版社及び共同研究者である坂尾氏より許可を得て引用^{18,51}．

2-5 考察

本研究では細胞接着を精密に制御可能なマイクロパタン培養皿を応用することで、細胞機能における三次元細胞密度の影響を評価する実験系を構築した。一般的な非接着性の三次元培養法と比較し、接着性三次元培養であるマイクロパタン培養皿は細胞蓄積量を制御することが可能である。加えてマイクロドメインの直径を制御することで、通常の三次元培養に付随する低酸素環境等の副産物的現象を伴わない小さな細胞凝集塊を作製可能である。本研究では播種細胞数を変えることで、三次元蓄積量の異なる MSC サンプルをマイクロパタン培養皿上に作製した。本細胞構造体の三次元構造を解析したところ、図 2-5-8 に示すように、播種細胞数の増加に伴って三次元細胞密度が増加している様子が観察された。本章における研究では MSC の骨芽-脂肪分化軸と三次元細胞密度の関係性を評価したが、MSC は分化能だけでなく、創傷治療能や免疫調整能など多様な細胞機能を持つことが報告されている^{10-12,17,52}。本研究で開発した実験系は、これらの細胞機能と三次元細胞密度の関係性を評価する上でも有用であると考えられる。

本研究では三次元細胞密度と MSC の骨芽-脂肪分化軸の関係性を評価したが、三次元培養した MSC の分化誘導例はこれまでもいくつかの報告されている。例えば Cheng らの研究グループは、キトサンフィルムを用いた三次元培養により MSC の骨芽分化誘導が促進されることを報告している⁴⁵。しかしながらキトサンフィルムを用いて作製した場合、MSC 凝集塊の大きさを制御することができず、内部低酸素環境を伴うような大きな細胞凝集塊が形成されてしまうことが明らかとなっており、三次元培養環境の影響を正確に評価することができなかった^{37,45}。一方で私は、均一で小さな三次元凝集塊を作製可能なマイクロパタン培養皿を用いることで三次元培養環境の影響を正確に評価し、三次元培養環境が MSC の骨芽分化を大幅に促進させることを明らかとした。さらに細胞接着性の三次元培養法であるマイクロパタン培養皿の特長を巧みに利用する

ことで、こうした骨芽分化誘導促進現象は三次元細胞密度の増加によるものであること、また三次元高細胞密度で培養された MSC は分化誘導前から骨芽分化方向に運命付けられていることを明らかとした。

二次元培養において、細胞密度は MSC の骨芽-脂肪分化軸に非常に大きな影響を与えることが知られている^{20,21}。先行研究によれば二次元培養における MSC は、細胞密度が高く、細胞が小さくなると脂肪細胞に、細胞密度が低く、細胞が大きく伸展すると骨芽細胞になりやすい。一方で三次元培養では細胞が密に凝集する為、一細胞は丸く、小さくなる⁵³。こうした実験事実から考えると、三次元培養環境において MSC は脂肪細胞になりやすいのではないかと考えられる。しかしながら本章における研究により、大変興味深いことに、三次元細胞密度の増加に伴って骨芽分化能が促進され、脂肪分化能が抑制されるという予想外の傾向が明らかとなった。さらに三次元高細胞密度の条件下で骨芽分化誘導を試みたところ、二次元培養細胞と比較して大幅な骨芽分化効率化が観察された。本研究で得られた知見は二次元培養系における分化傾向と矛盾するが、こうした違いはそれぞれの培養環境における細胞間接着様式とそれに伴う細胞骨格張力変化に起因すると考えている。Peng らは二次元培養系において細胞間接着が豊富なほど、MSC の骨芽分化が促進されることを報告している²¹。二次元培養環境と比較して、三次元培養環境における MSC は多面的な細胞接着が可能のため、骨芽分化が促進されるのだと考えられる。また McBeath らは、二次元細胞密度は細胞骨格張力の変化を介して、MSC の骨芽-脂肪分化軸に影響を及ぼすことを報告しており、細胞骨格張力が高いほど MSC 骨芽分化が促進されることを明らかとしている²⁰。前述のように三次元培養環境では多方向性の細胞間接着が可能のため、二次元培養環境よりも多くの細胞骨格張力が生まれると予想される。さらに 2017 年 Bao らは、一細胞の MSC を体積の異なる三次元空間に密閉することで、三次元培養環境における体積と MSC 機能の関係性を詳細に評価している⁵⁴。当該研究では三次元培養環境における体積が小さいほど、MSC に

において i) 細胞骨格張力を生み出すアクチンストレスファイバーの形成が促進されること, ii) 張力に応答して核移行する転写因子である YAP/TAZ 複合体が核に移行すること, iii) 骨芽分化が促進されること, などが明らかとなっている。これらの知見は本博士論文で得られた三次元細胞密度依存的な分化挙動と一致しており, 三次元細胞密度が増加して一細胞当たりの体積が小さくなるほど細胞骨格張力が高まるという仮説を支持するものである。これらの仮説を検証するために, 今後三次元凝集体内の細胞におけるストレスファイバーの染色や細胞骨格張力の測定などを行う必要があると考えている。

本章における研究では, マイクロパタン培養皿を用いることで, 分化誘導因子非添加時における MSC の骨芽-脂肪分化軸と三次元細胞密度の関係を評価した。興味深いことに, 分化誘導因子を添加していないにも関わらず, 三次元細胞密度を増加させることで MSC の骨芽分化マーカーの発現が促進され, 脂肪分化マーカーの発現は抑制されることが明らかとなった。さらに実際に三次元高細胞密度の条件下で骨芽分化誘導を行うことで, 大幅な分化効率化が観察された。これらの結果は三次元高細胞密度が未分化状態の MSC を骨芽分化方向に運命付けることを示している。本研究成果は世界で初めて MSC の三次元細胞密度評価系を構築し, MSC 分化能における三次元細胞密度の影響を評価したものであり, 非常に価値のあるものである。

第 3 章

CRISPR-Cas9 システムを用いる遺伝子発現制御

Y. Furuhata *et al.*, *ACS Synth. Biol.*, 2017, 6, 2191-2197.⁵⁵

3-1 要旨

MSC は倫理的問題や腫瘍化の危険性が少ない体性幹細胞でありながら、多分化能と自己複製能を併せもつため、再生医療の分野で大きな注目を集めている。再生医療に適した性質を持つ MSC を細胞治療や細胞移植に応用するためには、生体内における分化過程を理解し、再現することが重要である。しかしながら生体内における発生過程を模倣可能な分化誘導方法は少なく、新たな手法の開発が望まれている。このような背景のもと、私は内在遺伝子の転写制御法に着目した。

本章における研究では、近年開発された Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9 (CRISPR-associated protein 9) システム由来の内在遺伝子転写制御システムを MSC に適用することで、異なる脂肪細胞への効率的な分化制御が達成されたことを報告する。本研究では MSC に適した内在遺伝子転写制御システムを検討し、SAM システムを導入することで、MSC における高効率な遺伝子発現制御が可能であることを明らかとした。さらに本システムを用いて脂肪細胞特異的な転写因子の発現を活性化したところ、興味深いことに、単独の遺伝子発現を活性化した場合において MSC は白色脂肪様の細胞に分化した。一方で、三つの遺伝子発現を同時に活性化した場合に は遺伝子発現プロファイルが変わり、MSC はベージュ脂肪様細胞に分化誘導された。これらの結果は内在遺伝子転写制御を用いることで、MSC の細胞運命を制御可能であることを示すものである。

3-2 序文

MSC は倫理的問題や腫瘍化の危険性が少ない体性幹細胞でありながら、多分化能と自己複製能を併せもつため、再生医療の分野で大きな注目を集めている。前述のように MSC は脂肪細胞や骨芽細胞、軟骨細胞や神経細胞といった様々な細胞に分化することが可能である。MSC の分化方向性を生体外で制御する手法としては、低分子化合物を添加した分化誘導培地や組織特異的な転写因子の外来遺伝子導入などが一般的である。これらの分化誘導方法は効率的な MSC の分化誘導を可能とするが、細胞治療への応用を念頭に置いた場合、安全面に課題が残されている。さらに細胞分化の過程は複雑な内在遺伝子ネットワークによって精密に制御されているため、人工的な低分子や外来遺伝子で分化誘導する手法は MSC の生体内における分化過程を模倣するのに適していない。こうした課題を解決して MSC の臨床応用を発展させるために、新たな分化誘導手法の確立が望まれているのが現状である。

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9 (CRISPR-associated protein 9) システムは、生物工学及び医療の分野における応用可能性の高さから、現在最も注目を集める技術である。本来は配列特異的に DNA を切断し、ゲノム配列を編集するシステムとして用いられるが、ヌクレアーゼ活性を不活化した *Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 タンパク質 (dCas9 タンパク質) は DNA 切断が起こらないため、DNA の修飾や遺伝子発現制御に利用することができる。dCas9 タンパク質は single chimeric guide RNA (sgRNA) と呼ばれる一本鎖 RNA と複合体を形成し、sgRNA の 5' 末端の 20 塩基に相補的な DNA 配列に結合する。すなわち dCas9 タンパク質に転写活性化ドメインを融合し、遺伝子のプロモーター領域を sgRNA の標的とすることで、任意の遺伝子の転写活性化が可能となる。このような転写活性化システムが現在盛んに開

発されており、遺伝子の機能解析やゲノムワイドな遺伝子スクリーニングに応用されている。

さらに最近では、内在遺伝子転写活性化システムを利用し、生体内における発生過程を模倣した細胞運命制御が報告され始めている。これまでに、初代繊維芽細胞から筋細胞や神経細胞への分化転換、iPS 細胞や ES 細胞の分化制御などが報告されている。外来遺伝子導入を用いる手法と比較して、これらの内在遺伝子転写制御法は多数の遺伝子の同時発現制御に長けており、さらに内在遺伝子座位のエピジェネティックな制御も誘導可能であることがわかっている。つまり、内在遺伝子転写制御を用いた細胞分化制御は生体内における発生過程を模倣することが可能であり、MSC の臨床応用に非常に有用であると考えられる。

そこで本章における研究では、dCas9 タンパク質を用いる内在遺伝子転写制御システムを MSC に導入し、内在遺伝子の発現制御を試みた。その結果、適切な転写制御システムを導入することで、脂肪細胞特異的な転写因子の内在遺伝子発現を高効率に誘導することに成功した。さらに私は、内在遺伝子の転写活性化による MSC の脂肪分化誘導を試み、生体に存在しない分化誘導因子を排除した脂肪分化を達成した。本分化誘導系を用いることで、肥満や糖尿病といった疾患研究において重要な研究対象である、白色脂肪様細胞とベージュ脂肪様細胞の分化制御が達成された。

3-3 実験方法

プラスミド作製

EGFP, CMV プロモーター, ハイグロマイシン B 耐性遺伝子をコードする cDNA はそれぞれ, Addgene 19319, pcDNA3.1 V5/His-A (カタログ番号 V81020, Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ), pGL4.31 (カタログ番号 C9351, Promega 株式会社, アメリカ) から増幅した. dCas9 と dCas9-VP64 をコードする cDNA は Addgene 61422 から増幅した. p65 と MS2-p65-HSF1 をコードする cDNA は Addgene 61423 から増幅した. EGFP 発現プラスミドである pcDNA3.1-EGFP は, EGFP の cDNA を PCR で増幅し, pcDNA3.1 V5/His-A の Kpn1 サイトと Xba1 サイトの間にクローニングした. EGFP レポーターカセットをコードするレンチウイルスベクターである pCW-EGFP は, EGFP の cDNA を PCR で増幅し, Addgene 50661 の Nhe1 サイトと BamHI サイトの間にクローニングした. レンチウイルスベクターのバックボーンである lemti-cmv-BlastR は, CMV プロモーターの cDNA を PCR で増幅し, Addgene 52962 の NheI サイトと BamHI サイトの間にクローニングした. dCas9-p65 をコードするレンチウイルスベクターである lemti-cmv-dCas9-p65-BlastR は, dCas9 と p65 の cDNA を PCR で増幅し, lemti-cmv-BlastR の XbaI サイトと BamHI サイトの間にクローニングした. dCas9-VP64-P2A-BlastR をコードするレンチウイルスベクターである lemti-cmv-dCas9-VP64-BlastR は, dCas9-VP64 の cDNA を PCR で増幅し, lemti-cmv-BlastR の BsrGI サイトと XbaI サイトの間にクローニングした. MS2-p65-HSF1-P2A-HygroR をコードするレンチウイルスベクターである lemti-cmv-MS2-p65-HSF1-HygroR は, MS2-p65-HSF1 とハイグロマイシン B の cDNA を PCR で増幅し, lemti-cmv-BlastR の BsrGI サイトと EcoRI サイトの間にクローニングした.

sgRNA 作製

Control sgRNA 1.0 及び EGFP レポーター, *PPARG*, *CABPA*, *KLF5* のプロモーターを標的とする sgRNA 1.0 をコードするレンチウイルスベクターは, アニーリングしたオリゴ DNA を Addgene 52963 の BsmB1 サイトにクローニングした. Control sgRNA 2.0 及び EGFP レポーター, *PPARG*, *CABPA*, *KLF5*, *CEBPB*, *PRDM16* のプロモーターを標的とする sgRNA 2.0 をコードするレンチウイルスベクターは, アニーリングしたオリゴ DNA を Addgene 61427 の BsmB1 サイトにクローニングした. 各 sgRNA の標的配列は表 3-1 に示す.

表 3-1 sgRNA の標的配列

遺伝子	sgRNA ID	標的配列
Control	sgControl	5'- GTCTTCGGAGGACAGTACTC -3'
EGFP	sgEGFP-1	5'- ATACGTTCTCTATCACTGAT -3'
<i>PPARG</i>	sgPPARG-1	5'- GCGCACCTGCCAACCCTT -3'
	sgPPARG-2	5'- GTCACGATGGACAGCGTGGC -3'
	sgPPARG-3	5'- GAAACAGTTTCTCATGTGTT -3'
	sgPPARG-4	5'- CCCATGTTGTCTGAGTCCCT -3'
<i>CEBPA</i>	sgCEBPA-1	5'- GGCTCTGCTGGGCGCGCTGG -3'
	sgCEBPA-2	5'- AGCGCGGCGCTGTGCCGCGC -3'
	sgCEBPA-3	5'- GCCGCGCGCTAGGACCCAGC -3'
	sgCEBPA-4	5'- CAGAGGCCGCTCGGACTCT -3'
<i>KLF5</i>	sgKLF5-1	5'- CACGTCTTAGGTGTTGTGCA -3'
	sgKLF5-2	5'- TCTTCGCACTGTTCTCTGCC -3'
	sgKLF5-3	5'- GCGGAGGGAAGTAGCGGAGC -3'
	sgKLF5-4	5'- CACAACCTCTCTGACAGATT -3'
<i>CEBPB</i>	sgCEBPB-1	5'- CAGGACAGCCTCCAGCCCAG -3'
	sgCEBPB -2	5'- CCCTCTCGCTCCCAATCCCG -3'
	sgCEBPB -3	5'- GAAAACGCGCTCCGGGTGCC -3'
	sgCEBPB -4	5'- GCGCCCTGCCGCCGTCCTCC -3'
<i>PRDM16</i>	sgPRDM16-1	5'- GACGAAGACCGAGAAGGCCG -3'
	sgPRDM16-2	5'- CGCCGCCTCGGCGCGGGATT -3'
	sgPRDM16-3	5'- CTCAATCTGACACCCCTCGC -3'
	sgPRDM16-4	5'- GGTGTCCAAACTGACAATGC -3'

EGFP; enhanced green fluorescent protein, *PPARG*; peroxisome proliferator activated receptor gamma, *CEBPA*; CCAAT/enhancer binding protein alpha, *KLF5*; kruppel like factor 5, *CEBPB*; CCAAT/enhancer binding protein beta, *PRDM16*; PR/SET domain 16

本表は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

細胞培養

本章における実験では骨髄由来の MSC (カタログ番号 JCRB1154, 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク, 日本) を使用した。MSC は Dulbecco's modified eagle's 培地 (DMEM) (カタログ番号 044-29765, 和光純薬工業株式会社, 日本) に 10 % (v/v) fetal bovine serum (カタログ番号 FB-1061/500, Biosera 株式会社, フランス), 1 % (v/v) penicillin-streptomycin-neomycin (PSN) antibiotic mixture (カタログ番号 15640055, Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を添加した培地を用いて 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で培養した。本章ではこれを「通常培地」と表記する。HEK293T/17 細胞 (カタログ番号 CRL-11268, American Type Culture Collection, アメリカ) と Lenti-X 293T 細胞 (カタログ番号 632180, タカラバイオ株式会社, 日本) は Dulbecco's modified eagle's 培地 (DMEM) (カタログ番号 D5796-500ML, Merck 株式合資会社, ドイツ) に 10 % (v/v) fetal bovine serum (カタログ番号 10099-141, Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ), 1 % (v/v) penicillin streptomycin (カタログ番号 15140-122, Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を添加した培地を用いて 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で培養した。

レンチウイルス作製

5.0×10^6 cells の Lenti-X 293T 細胞を 100 mm ディッシュに播種し, 24 時間培養後に Polyethylenimine "Max" (カタログ番号 24765-1, Polysciences 株式会社, イギリス) を用いて製品説明書通りに 10 µg のトランスファーベクター, 2 µg の pMD2.G (Addgene 12259), 2.5 µg の pRSV-Rev (Addgene 12253), 2.5 µg の pMDLg/pRRE (Addgene 12251) をトランスフェクションした。内在遺伝子プロモーターを標的とする sgRNA を発現させるためのレンチウイルス作製においては, 4 つの sgRNA トランスファーベクターを 1:1:1:1 の比率で混合したものをを用いた。トランスフェクション 24 時間後及び 48 時間

後の培養上清を回収し、混ぜ合わせたのちに 0.45 μm PVDF filter (カタログ番号 SLHV033RS, Merck 株式合資会社, ドイツ) を用いてフィルトレーションした. さらに Lenti-X Concentrator (カタログ番号 631231, タカラバイオ株式会社, 日本) を用いて濃縮後, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した.

遺伝子導入方法の検討

遺伝子導入方法として本論文で最終的に使用したレンチウイルスに加え, リポフェクション, エレクトロポレーションを検討した. リポフェクションには Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (カタログ番号 L3000-075, Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を, エレクトロポレーションには P1 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S (カタログ番号 V4XP-1032, Lonza Group 株式会社, スイス) 及び 4D-Nucleofector X ユニット (カタログ番号 AAF-1002X, Lonza Group 株式会社, スイス) を使用し, それぞれのプロトコルに従って pcDNA3.1-EGFP を導入し, 2 日後に蛍光観察を行った.

レンチウイルス力価測定

2.0×10^4 cells/well の HEK293T/17 細胞を 12-well culture plate (カタログ番号 3815-012, AGC テクノガラス株式会社, 日本) に播種し, 24 時間 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 存在下で培養した. レンチウイルスストック溶液の 10 倍希釈系列を, $0.8\text{ }\mu\text{g/mL}$ の hexadimethrine bromide (カタログ番号 H9268-5G, Merck 株式合資会社, ドイツ) を含む通常培地を用いて 10^3 から 10^6 まで作製し, それぞれ 1 mL をウェルに添加することでウイルス感染とした. 感染 24 時間後に培地を通常培地に交換し, 終濃度 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ の puromycin dihydrochloride (カタログ番号 160-23151, 和光純薬工業株式会社, 日本) ないし終濃度 $600\text{ }\mu\text{g/mL}$ の zeocin selection antibiotic (カタログ番号 R25001, Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメ

リカ) を添加した。6 日間抗生物質で処理した後、コロニーの数を数え、レンチウイルスストック溶液中のウイルス感染力価を逆算した。

オフターゲット結合サイト予測

sgPPARG_1-4, sgCEBPA_1-4, sgKLF5_1-4, sgCEBPB_1-4 及び sgPRDM16_1-4 のオフターゲット結合サイトは CCTop ソフトウェア⁵⁶ を用いて予想した。オフターゲット結合サイト候補の中から、タンパク質をコードする遺伝子の転写開始点近傍に結合すると考えられるサイトを選択し、本研究における sgRNA のオフターゲット結合サイトとした。オフターゲット結合サイトは表 3-2 に示す。

表 3-2 sgRNA のオフターゲット結合サイト

sgRNA ID	標的配列	オフターゲット結合サイト	変異 塩基数	アラインメント結果	転写開始点から の距離 (bp)	遺伝子名前
sgPPARG-1	GCGCACCTGCCAACCCACTT	GTGCGCCAGCCCACCCACAT	5	- - - [- -] PAM	252	COMMD9
sgPPARG-2	GTCACGATGGACAGCGTGGC	GTAAGGCTGGACAGGTTGGC	5	- - - [- -] PAM	284	FHL1
sgPPARG-3	GAAACAGTTTCTCATGTGTT	GTGACATTTTCTCACGTGTT	4	- - - [-] PAM	793	HABP2
sgPPARG-4	CCGAGGGACTCAGACAACAT	CTTTGGGAGTCAGACAGCAT	5	- - - [- -] PAM	336	CDKAL1
sgCEBPA-1	GGCTCTGCTGGGCGCGCTGG	GGTTGTGGTCGGAGCGCTGG	5	- - - [- -] PAM	41	NUP133
sgCEBPA-2	AGCGCGGCGCTGTGCCGCGC	GACGCGCTGCTGTGGC GCGC	5	- - - - [-] PAM	14	PIGG
sgCEBPA-3	GCCGCGCGCTAGGACCCAGC	GGGCGGCGCTAGGACCCCGC	5	- - - - [-] PAM	14	PXK
sgCEBPA-4	CAGAGGCCGCCTCGGACTCT	CAGCGGCGGCCGCGGACTCT	3	- - [-] PAM	156	BRD1
sgKLF5-1	CACGTCTTAGGTGTTGTGCA	GAGATCTCAGGTCTTGTGCA	5	- - - - [-] PAM	342	ARL13B
sgKLF5-2	TCTTCGCACTGTTCTCTGCC	TCCTCCCGCTGAGCTCTGCC	5	- - - [- -] PAM	571	SOHLH1
sgKLF5-3	GCGGAGGGAAGTAGCGGAGC	GCGCGGAGAAGTGGCGGAGG	5	- - - [- -] PAM	32	TPMT
sgKLF5-4	CACAACTTCTCTGACAGATT	CACAAAGCCCTTGACAGATT	5	- - - [- -] PAM	1171	CBL
sgCEBPB-1	CAGGACAGCCTCCAGCCCAG	TGGGAGAGCCGCCAGCCCGG	5	- - - [- -] PAM	16	PLSCR4
sgCEBPB-2	CCCTCTCGCTCCCAATCCCG	CCCGCGCCCTCCCGTCCCG	5	- - - [- -] PAM	69	GNAO1

sgRNA ID	標的配列	オフターゲット結合サイト	変異 塩基数	アラインメント結果	転写開始点から の距離 (bp)	遺伝子名前
sgCEBPB-3	GAAAACGCGCTCCGGGTGCC	GAATGGGGGCTCCGGGTGCC	4	--- -[]PAM	194	SYDE1
sgCEBPB-4	GCGCCCTGCCGCCGTCCTCC	CCCGCCCGCCGCCCTCCTCC	5	- -- -[-]PAM	6	TWSG1
sgPRDM16-1	GACGAAGACCGAGAAGGCCG	GGCGTTGACCGCGAAGGACG	5	--- -[-]PAM	32	CHCHD2
sgPRDM16-2	CGCCGCCTCGGCGCGGGATT	CGCAGCCGCGGCGCGGGCGT	4	- -[]PAM	15	MTUS2
sgPRDM16-3	CTCAATCTGACACCCCTCGC	GTCACTATGACACCCCCAGC	5	- - -[]PAM	62	MBD2
sgPRDM16-4	GGTGTCCAAACTGACAATGC	GGTGGCCAACAGACAAAGC	5	--- -[-]PAM	76	ZNF672

本表は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

恒常発現細胞の樹立

1.0×10^5 cells の MSC を 100 mm ディッシュに播種し, 24 時間 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で培養した後に, 培地を 0.8 µg/mL の hexadimethrine bromide (カタログ番号 H9268-5G, Merck 株式合資会社, ドイツ) を含む通常培地に交換し, 目的のレンチウイルスを感染させた. 感染 48 時間後に培地を交換し, 適切な抗生物質を添加した. 抗生物質による薬剤セレクションは 2 週間以上行った. MSC の薬剤セレクションには, 以下の抗生物質を使用した. blasticidin S (カタログ番号 029-18701, 和光純薬工業株式会社, 日本), 終濃度 10 µg/mL, hygromycin B (カタログ番号 084-07681, 和光純薬工業株式会社, 日本), 終濃度 1000 µg/mL の puromycin dihydrochloride (カタログ番号 160-23151, 和光純薬工業株式会社, 日本).

リアルタイム PCR

RNeasy Micro Kit (カタログ番号 74004, Qiagen 株式会社, ドイツ) を用いて MSC から RNA を抽出した. 次に ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (カタログ番号 FSQ-301, 東洋紡株式会社, 日本) を用いて, 抽出した RNA を逆転写し, cDNA に変換した. peroxisome proliferator activated receptor gamma (*PPARG*), CCAAT/enhancer binding protein alpha (*CEBPA*), kruppel like factor 5 (*KLF5*), adiponectin (*ADIPOQ*), fatty acid binding protein 4 (*FABP4*), fatty acid synthase (*FASN*), lipase E, hormone sensitive type (*LIPE*), CCAAT/enhancer binding protein beta (*CEBPB*), PR/SET domain 16 (*PRDM16*), COMM domain containing 9 (*COMMD9*), four and a half LIM domains 1 (*FHL1*), hyaluronan binding protein 2 (*HABP2*), CDK5 regulatory subunit associated protein 1 like 1 (*CDKALI*), nucleoporin 133 (*NUP133*), phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class G (*PIGG*), PX domain containing serine/threonine kinase like (*PXK*), bromodomain containing 1 (*BRDI*), ADP ribosylation factor like GTPase 13B (*ARL13B*), spermatogenesis and oogenesis specific basic

helix-loop-helix 1 (*SOHLHI*), thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*), cbl proto-oncogene (*CBL*), phospholipid scramblase 4 (*PLSCR4*), G protein subunit alpha O1 (*GNAO1*), synapse defective Rho GTPase homolog 1 (*SYDE1*), twisted gastrulation BMP signaling modulator 1 (*TWSG1*), coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 (*CHCHD2*), microtubule associated scaffold protein 2 (*MTUS2*), methyl-CpG binding domain protein 2 (*MBD2*), zinc finger protein 672 (*ZNF672*), transmembrane protein 26 (*TMEM26*), short stature homeobox 2 (*SHOX2*), 5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing) (*OPLAH*), solute carrier family 29 member 1 (augustine blood group) (*SLC29A1*), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) の cDNA はそれぞれの特異的なプライマーと THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (カタログ番号 QPS-201, 東洋紡株式会社, 日本) を製品説明書通りに混合後, StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を用いてリアルタイム PCR を行った. 95 °C で 60 秒処理した後, 95 °C で 15 秒, 60 °C で 60 秒の処理を 40 サイクルで行うことで cDNA を増幅した. 遺伝子特異的なプライマーは Untergasser が作製した Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いて設計し, Ye らが作製した Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)³⁶ を用いて特異性の高いものを選択した. 本解析で用いたプライマー配列は表 3-3 に示す. 得られたデータは StepOne Software v2.2.2 (Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を用いて $\Delta\Delta C_t$ 法で解析した. 各遺伝子の発現量は *GAPDH* の発現量で標準化した後に, 各図に示すサンプルの発現量で規格化した. 本解析は独立して三回以上実施した.

表 3-3 リアルタイム PCR で用いたプライマー配列

遺伝子名	プライマー配列	増幅産物の長さ (bp)
<i>PPARG</i>	F 5'- CAAGAAGACGGAGACAGACATGAG -3'	109
	R 5'- ACTGGAAGAAGGGAAATGTTGG -3'	
<i>CEBPA</i>	F 5'- AACACGAAGCACGATCAGTC -3'	143
	R 5'- AGACGCGCACATTCACATTG -3'	
<i>KLF5</i>	F 5'- ACCACCCTGCCAGTAACTC -3'	82
	R 5'- TGCCTCGTTTCTCCAAATCG -3'	
<i>ADIPOQ</i>	F 5'- ACATGCCCATTCGCTTTACC -3'	97
	R 5'- TAGTACAGCCCAGGAATGTTGC -3'	
<i>FABP4</i>	F 5'- CTGGTACATGTGCAGAAATGGG -3'	95
	R 5'- ACGCCTTTCATGACGCATTC -3'	
<i>FASN</i>	F 5'- TGCCTACTACATCGACTGCATC -3'	102
	R 5'- TGGGAGCACATTTCAAAGGC -3'	
<i>LIPE</i>	F 5'- AGCACTACAAACGCAACGAG -3'	145
	R 5'- AAGGCTTTCAGAAAGTGCAC -3'	
<i>CEBPB</i>	F 5'- AAGATGCGCAACCTGGAGAC -3'	125
	R 5'- AGCTGCTTGAACAAGTTCCG -3'	
<i>PRDM16</i>	F 5'- TACAAATGCGACCAGTGTCC -3'	95
	R 5'- TCACATTCGAAGCGTTTGCC -3'	
<i>COMMD9</i>	F 5'- AAACCTCCTCAGACAGCATCAG -3'	138
	R 5'- CCAGTGTTTCTTTGCTCAGCTC -3'	
<i>FHL1</i>	F 5'- AACTGCAAGCAAGTCATCGG -3'	106
	R 5'- TGCACTTCACGCAATGCTTG -3'	
<i>HABP2</i>	F 5'- TGA CTGCTATGTTGGCGATG -3'	81
	R 5'- TTCCAGTAAAGGCACGCATG -3'	
<i>CDKALI</i>	F 5'- AGGCTTGGCATGACAAATCC -3'	133
	R 5'- TTTCCATGAGTACGCTGTCG -3'	

遺伝子名	プライマー配列	増幅産物の長さ (bp)
<i>NHP133</i>	F 5'- TGGTGTGCAAAGAGAAGCTC -3' R 5'- TGGCAGCTGAAGTTCTTTGC -3'	86
<i>PIGG</i>	F 5'- ACATCCAAAGCACGTCCAAC -3' R 5'- AGGCTCCCTACACTGTCTTTTG -3'	90
<i>PXK</i>	F 5'- TTGCCTTGCAACAGGTTTCC -3' R 5'- AACACTAGCCGTTCCCTTTGG -3'	142
<i>BRD1</i>	F 5'- TTGCCAACACGGTGTTTCATC -3' R 5'- AGTTTGCTTTGTGGCACTGG -3'	129
<i>ARL13B</i>	F 5'- AGAAAGAGCTGAACGAGTGC -3' R 5'- TGGCTGGAAAGGATTCGTTG -3'	127
<i>SOHLH1</i>	F 5'- AGCACGCTATTCTTGCTTCC -3' R 5'- TGACTIONGACAACGTCAACTG -3'	79
<i>TPMT</i>	F 5'- TTCCTCTTTGCGGAAAAGCG -3' R 5'- TCCACACCAACTACACTGTGTC -3'	70
<i>CBL</i>	F 5'- ATTAACCAACCGGCACTCAC -3' R 5'- TATCCAGACTGAACGTGCTTCC -3'	95
<i>PLSCR4</i>	F 5'- TGTTGCGGAACATTGGAACC -3' R 5'- ACAGCCATAGGTTGAGCATGG -3'	103
<i>GNAO1</i>	F 5'- ACGTCACGGCCATCATTTTC -3' R 5'- TTCGTGGTTTCGTCTTCGTG -3'	73
<i>SYDE1</i>	F 5'- TCAACCCGCACCTGAATCTC -3' R 5'- AGAGGCACACGTTGATTGTC -3'	87
<i>TWSG1</i>	F 5'- ATGTTACGCGCCTTATTCC -3' R 5'- CGCAGCAGGCATTATGAAAC -3'	144
<i>CHCHD2</i>	F 5'- AGTGGAGGAAGTAATGCTGAGC -3' R 5'- GGCACACTCCAGAACTGTTTG -3'	123
<i>MTUS2</i>	F 5'- TGCAATTCGAGGCGGAAATG -3' R 5'- TGTTGACACCGGATGCTCAG -3'	73

遺伝子名	プライマー配列	増幅産物の長さ (bp)
<i>MBD2</i>	F 5'- AAAGAACCCTGCTGTTTGGC -3'	108
	R 5'- TTGCGTACTTGCTGTACTCG -3'	
<i>ZNF672</i>	F 5'- GCTTCCGTTGCCTAGAATGC -3'	116
	R 5'- GAAGCTTTGTCCGCACTCAC -3'	
<i>TMEM26</i>	F 5'- TGTGGAACATCGGAATCAGC -3'	118
	R 5'- TTCTTCGCGGCAAAGAACAC -3'	
<i>SHOX2</i>	F 5'- ATGCGCTAAGAAGGCAAAGC -3'	128
	R 5'- CGTGTTAACGTGAACTTCGC -3'	
<i>OPLAH</i>	F 5'- TGTCATCGGCTTTGACATGG -3'	75
	R 5'- TCGAAGACGTGCTCGAATTC -3'	
<i>SLC29A1</i>	F 5'- TCAACTCCTTCCTGCATCAGAG -3'	130
	R 5'- ACAAAGAAGGGCAGAGCATC -3'	
<i>GAPDH</i>	F 5'- AGCAAGAGCACAAAGAGGAAGAGA -3'	86
	R 5'- GAGGGGAGATTCAGTGTGGTG -3'	

PPARG; peroxisome proliferator activated receptor gamma, *CEBPA*; CCAAT/enhancer binding protein alpha, *KLF5*; kruppel like factor 5, *ADIPOQ*; adiponectin, *FABP4*; fatty acid binding protein 4, *FASN*; fatty acid synthase, *LIPE*; lipase E, hormone sensitive type, *CEBPB*; CCAAT/enhancer binding protein beta, *PRDM16*; PR/SET domain 16, *COMMD9*; COMM domain containing 9, *FHL1*; four and a half LIM domains 1, *HABP2*; hyaluronan binding protein 2, *CDKALI*; CDK5 regulatory subunit associated protein 1 like 1, *NUP133*; nucleoporin 133, *PIGG*; phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class G, *PXK*; PX domain containing serine/threonine kinase like, *BRD1*; bromodomain containing 1, *ARL13B*; ADP ribosylation factor like GTPase 13B, *SOHLH1*; spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1, *TPMT*; thiopurine S-methyltransferase, *CBL*; cbl proto-oncogene, *PLSCR4*; phospholipid scramblase 4, *GNAO1*; G protein subunit alpha O1, *SYDE1*; synapse defective Rho GTPase homolog 1, *TWSG1*; twisted gastrulation BMP signaling modulator 1, *CHCHD2*; coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2, *MTUS2*; microtubule associated scaffold protein 2, *MBD2*; methyl-CpG binding domain protein 2, *ZNF672*; zinc finger protein 672, *TMEM26*; transmembrane protein 26, *SHOX2*; short stature homeobox 2, *OPLAH*; 5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing), *SLC29A1*; solute carrier family 29 member 1 (augustine blood group), *GAPDH*; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

本表は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

dCas9-p65 システムによるレポーター遺伝子の転写活性化

2.0×10^3 cells の EGFP レポーター-dCas9-p65 MSC を 96-well culture plate (カタログ番号 3860-096, AGC テクノガラス株式会社, 日本) に播種し, 24 時間 37°C , 5 % CO_2 存在下で培養した. 培地を $0.8 \mu\text{g/mL}$ の hexadimethrine bromide (カタログ番号 H9268-5G, Merck 株式合資会社, ドイツ) を含む通常培地に交換し, 各図に示す sgRNA をコードするレンチウイルスを, 高い多重感染度 (MOI) で感染させた. 感染 48 時間後に培地を交換した. さらに 48 時間培養した後に, 細胞を PBS で二回洗浄し, $10 \mu\text{g/mL}$ の Hoechst 33258 (カタログ番号 PK-CA707-40044, PromoCell 有限会社, ドイツ) を含む PBS を加え, 37°C で 30 分間静置した. 蛍光染色画像は蛍光顕微鏡 (IX51S8F-3, オリンパス株式会社, 日本) を用いて取得した.

SAM システムによるレポーター遺伝子の転写活性化

2.0×10^3 cells の EGFP レポーター-SAM MSC を 96-well culture plate (カタログ番号 3860-096, AGC テクノガラス株式会社, 日本) に播種し, 24 時間 37°C , 5 % CO_2 存在下で培養した. 培地を $0.8 \mu\text{g/mL}$ の hexadimethrine bromide (カタログ番号 H9268-5G, Merck 株式合資会社, ドイツ) を含む通常培地に交換し, 各図に示す sgRNA をコードするレンチウイルスを, 各図の説明文に示す多重感染度 (MOI) で感染させた. 感染 48 時間後に培地を交換した. さらに 48 時間培養した後に, 細胞を PBS で二回洗浄し, $10 \mu\text{g/mL}$ の Hoechst 33258 (カタログ番号 PK-CA707-40044, PromoCell 有限会社, ドイツ) を含む PBS を加え, 37°C で 30 分間静置した. 蛍光染色画像は蛍光顕微鏡 (IX51S8F-3, オリンパス株式会社, 日本) を用いて取得した. ImageJ ソフトウェアを用いて各サンプルにおける EGFP 蛍光強度を測定し, Hoechst 33258 の蛍光強度で標準化した後に mock 感染サンプルで規格化することで, EGFP 発現量の定量とした.

dCas9-p65 システムによる内在遺伝子の転写活性化

2.0×10^3 cells の dCas9-MSC を 96-well culture plate (カタログ番号 3860-096, AGC テクノガラス株式会社, 日本) に播種し, 24 時間 37°C , 5% CO_2 存在下で培養した. 培地を $0.8 \mu\text{g/mL}$ の hexadimethrine bromide (カタログ番号 H9268-5G, Merck 株式会社, ドイツ) を含む通常培地に交換し, 各図に示す sgRNA をコードするレンチウイルスを高い MOI で感染させた. 感染 48 時間後に培地を交換した. さらに 48 時間培養した後に, RNeasy Micro Kit (カタログ番号 74004, Qiagen 株式会社, ドイツ) による RNA 抽出に供した.

SAM システムによる内在遺伝子の転写活性化

2.0×10^3 cells の SAM MSC を 96-well culture plate (カタログ番号 3860-096, AGC テクノガラス株式会社, 日本) に播種し, 24 時間 37°C , 5% CO_2 存在下で培養した. 培地を $0.8 \mu\text{g/mL}$ の hexadimethrine bromide (カタログ番号 H9268-5G, Merck 株式会社, ドイツ) を含む通常培地に交換し, 各図に示す sgRNA をコードするレンチウイルスを MOI 20 で感染させた. 三遺伝子同時転写活性化実験では, 各遺伝子のレンチウイルスを 1:1:1 の比率で混合したものをを用いた. 感染 48 時間後に培地を交換した. さらに 48 時間培養した後に, RNeasy Micro Kit (カタログ番号 74004, Qiagen 株式会社, ドイツ) による RNA 抽出に供した.

内在遺伝子転写活性化による脂肪分化

2.0×10^3 cells の SAM MSC を 96-well culture plate (カタログ番号 3860-096, AGC テクノガラス株式会社, 日本) に播種し, 24 時間 37°C , 5% CO_2 存在下で培養した.

「SAM システムによる内在遺伝子の転写活性化」と同様に sgRNA を導入した, 感染 48 時間後に培地を通常培地に $1 \mu\text{M}$ の dexamethasone (カタログ番号 047-18863, 和光

純薬工業株式会社, 日本) と 10 µg/mL の Insulin, Human, recombinant, Animal-derived-free (カタログ番号 090-06481, 和光純薬工業株式会社, 日本) を添加した脂肪細胞維持培地に交換した。培地交換後, 白色脂肪分化には 4 日毎に培地交換をして 2 週間, ベージュ脂肪分化には 7 日毎に培地交換をして 3 週間培養した。表 3-4 に培地組成表を示す。

分化誘導培地を用いた骨芽分化誘導

適切な細胞数で播種した MSC を通常培地に 100 nM の dexamethasone (カタログ番号 047-18863, 和光純薬工業株式会社, 日本), 200 µM の L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate (カタログ番号 013-19641, 和光純薬工業株式会社, 日本) 及び 10 mM の disodium β-glycerophosphate pentahydrate (カタログ番号 046-31251, 和光純薬工業株式会社, 日本) を添加した骨芽分化誘導培地で 2 週間培養した。培地交換は 3 日おきに行った。分化誘導の陰性対照サンプルには通常培地で 2 週間培養した MSC を用いた。表 3-4 に培地組成表を示す。

分化誘導培地を用いた脂肪分化誘導

適切な細胞数で播種した MSC を通常培地に 1 µM の dexamethasone (カタログ番号 047-18863, 和光純薬工業株式会社, 日本), 100 µM の Indomethacin (カタログ番号 097-02471, 和光純薬工業株式会社, 日本), 1 µM の 3-Isobutyl-1-methylxanthine (カタログ番号 095-03413, 和光純薬工業株式会社, 日本), 10 µg/mL の Insulin, Human, recombinant, Animal-derived-free (カタログ番号 090-06481, 和光純薬工業株式会社, 日本) を添加した脂肪分化誘導培地で 2 週間培養した。培地交換は 3 日おきに行った。分化誘導の陰性対照サンプルには通常培地で 2 週間培養した MSC を用いた。表 3-4 に培地組成表を示す。

表 3-4 本章における研究で使用した培地の組成表

培地名	通常培地に対する添加因子
骨芽分化誘導培地	100 nM dexamethasone, 200 μ M L-ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate
脂肪細胞維持培地	1 μ M dexamethasone, 10 μ g/mL insulin
脂肪分化誘導培地	1 μ M dexamethasone, 100 μ M indomethacin, 500 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine, 10 μ g/mL insulin

本表は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

アリザリンレッド S 染色

骨芽分化誘導をした MSC を PBS で二回洗浄後，4 % (w/v) paraformaldehyde を含む PBS を加え，室温で 10 分間固定した．超純水で二回洗浄後，アリザリンレッド S 染色液を用いて室温で 20 分間染色した．アリザリンレッド S 染色液には，終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように超純水で alizarin red S (カタログ番号 011-01192, 和光純薬工業株式会社, 日本) を溶かし，水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 4.2 に調整したものをを用いた．PBS で二回洗浄した後，位相差顕微鏡 (IX51S8F-3, オリンパス株式会社, 日本) で染色画像を取得した．

オイルレッド O 染色

脂肪分化誘導をした MSC を PBS で二回洗浄後，4 % (w/v) paraformaldehyde を含む PBS を加え，室温で 10 分間固定した．PBS で二回洗浄後，60 % (v/v) isopropyl alcohol を含む超純水を加え，室温で 1 分間静置した．続いて 3 mg/mL の oil red O (カタログ番号 154-02072, 和光純薬工業株式会社, 日本) 及び 60 % (v/v) isopropyl alcohol を含む超純水を用いて室温で 10 分間染色した．60 % (v/v) isopropyl alcohol を含む超純水で二回洗浄した後，PBS で二回洗浄した．染色画像は位相差顕微鏡 (IX51S8F-3, オリンパス株式会社, 日本) を用いて取得した．観察後，100 % isopropyl alcohol で oil red O を溶出させ，NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を用いて 520 nm における吸光度を定量した．

ナイルレッド染色

脂肪分化誘導をした MSC を PBS で二回洗浄後，4 % (w/v) paraformaldehyde を含む PBS を加え，室温で 10 分間固定した．PBS で二回洗浄後，1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Nile red (カタログ番号 144-08811, 和光純薬工業株式会社, 日本) を含む PBS を用いて室温で 15 分間

染色した。PBS で 4 回洗浄した後, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Hoechst 33258 (カタログ番号 PK-CA707-40044, PromoCell 有限会社, ドイツ) を含む PBS を加え, 室温で 10 分間静置した。蛍光染色画像は蛍光顕微鏡 (AxioObserver Z1, Carl Zeiss 株式会社, ドイツ) を用いて取得した。

統計解析

全ての実験地は平均値 \pm 標準誤差を示す。二群間の統計的有意差検定にはスチューデントの t 検定を用い, * $p < 0.05$ ないし ** $p < 0.01$ の場合に統計的に有意な差があるとした。試行回数は各図の説明文に記載する。

3-4 結果

遺伝子導入方法の検討

転写活性化システムを MSC に導入するために、EGFP 発現プラスミドを用いて MSC に対する効率的な遺伝子導入方法を検討することとした。DNA を細胞に導入する手法として一般的に使用されているリポフェクション、エレクトロポレーション、レンチウイルスの 3 つを i) 遺伝子導入効率、ii) 再現性、iii) 細胞毒性の観点から評価した。論文中にデータは示さないが、リポフェクションは最大で半分程度の細胞に遺伝子導入できたものの、導入効率が安定せず、ウェル間及び試行間での誤差が大きかった。さらに細胞毒性が高く、導入された細胞ほど異常な形態を示し、培養基板から剥離してしまう様子が観察された。エレクトロポレーションは最大で 8 割程度の細胞に導入することができ、導入効率も安定していた。さらにリポフェクションの時のように細胞の形態異常や剥離は観察されなかったが、遺伝子導入後長期間培養しても全く細胞増殖が観察されず、細胞に何らかの悪影響を与えている可能性が考えられた。レンチウイルスはほぼ全ての細胞に効率よく遺伝子導入することができ、再現性も高かった。さらに若干の細胞毒性があるものの、導入後長期間培養することで通常の形態及び増殖能を示す細胞株を容易に樹立することができた。以上の結果より、本論文ではレンチウイルスを用いて MSC に遺伝子導入することとした。

dCas9-p65 によるレポーター遺伝子の転写活性化

本章における研究では、第一の転写活性化システムとして dCas9 タンパク質に NF- κ B ファミリーの転写活性化タンパク質である p65 を融合させた dCas9-p65 タンパク質を用いることとした。まず MSC における dCas9-p65 タンパク質の有効性を評価するために、EGFP レポーターアッセイを試みることにした。本目的のためにテトラサイクリン誘導

性プロモーターの下流に EGFP 遺伝子を挿入したカセットを作製し、レンチウイルスを用いて MSC に形質導入した。図 3-1A に示すようにテトラサイクリン誘導性プロモーターは 6 回の繰り返し配列及び最小プロモーターを持ち、繰り返し配列を標的とする sgRNA (sgEGFP) を導入することで、一つの遺伝子座位に複数の dCas9-p65 タンパク質誘導され、EGFP の発現が活性化されると予想される。形質導入した細胞を 7 日間培養した後、さらに dCas9-p65 発現カセットをレンチウイルスで形質導入し、blastcidin S 及び puromycin を添加した培地で長期間培養することで、両カセットが導入された細胞をセレクションし、EGFP レポーター-dCas9-p65 細胞を樹立した (図 3-1B)。

作製した EGFP レポーター-dCas9-p65 細胞に sgEGFP 及びゲノム内に標的配列を持たない sgRNA (sgControl) をそれぞれ導入した。その結果図 3-1C に示すように、導入 4 日後において sgEGFP 導入細胞は予想通り緑色蛍光を示した。一方で陰性対照サンプルである sgControl 導入細胞において EGFP 蛍光は観察されなかった。本実験結果から dCas9-p65 タンパク質を用いることで MSC における遺伝子の転写活性化が可能であることが示唆された。

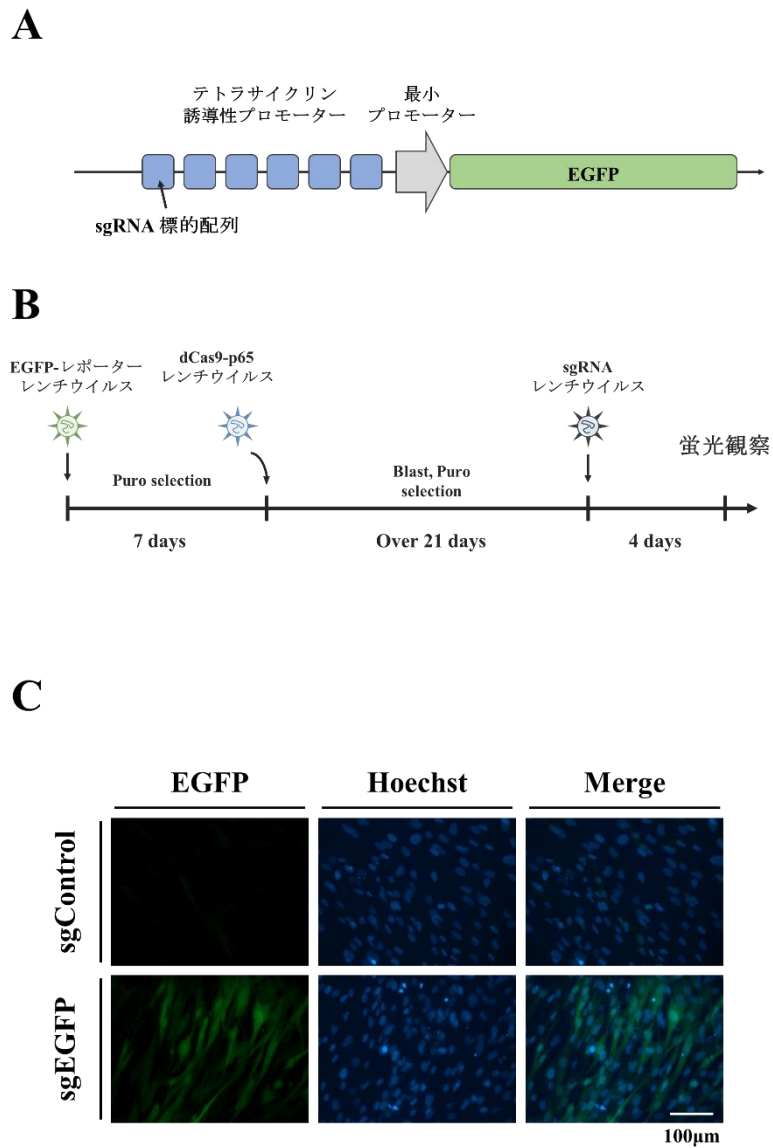


図 3-1 : dCas9-p65 によるレポーター遺伝子の転写活性化

(A) EGFP レポーターカセットの概略図を示す. (B) EGFP レポーターアッセイの概略図. (C) dCas9-p65 による EGFP レポーターの転写活性化現象. EGFP レポーター-dCas9-p65 細胞に高 MOI で sgRNA をコードするレンチウイルスを感染させ、4 日間培養した後、Hoechst 33258 で染色し、蛍光画像を取得した. 各サンプルの中で代表的な画像を示す. スケールバーは 100 μ m を示す. 本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

dCas9-p65 による内在遺伝子の転写活性化

続いて内在遺伝子の転写活性化を試みた。本目的のためにレンチウイルスを用いて MSC に dCas9-p65 発現カセットを形質導入し、dCas9-p65 恒常発現 MSC (dCas9-p65 MSC) を樹立した。dCas9-p65 MSC が多分化能を保持していることを確認するために、それぞれの分化誘導培地を用いて骨芽分化誘導と脂肪分化誘導を試みた。骨芽分化誘導した細胞をアリザリンレッド S 染色，脂肪分化誘導した細胞をオイルレッド O 染色したところ，どちらの場合においても効率的に分化が誘導されていることが明らかとなった (図 3-2A, B)。さらにその分化効率は野生型の MSC と同程度であった。これらの結果から dCas9-p65 MSC が多分化能を保持していることが明らかとなった。

これまでにいくつかの研究グループが，脂肪細胞特異的な転写因子を過剰発現させることで MSC や線維芽細胞の脂肪分化が促進されることを報告している⁵⁷⁻⁵⁹。本研究では，脂肪細胞特異的な転写因子をコードする内在遺伝子の発現を活性化することにより，より生体における分化過程に近い MSC の脂肪分化が可能なのではないかと考えた。MSC の脂肪分化を制御する主要な転写因子として *PPARG*，*CEBPA*，*KLF5* の三つが知られている⁶⁰。そこでこれら三つの遺伝子を内在遺伝子の転写活性化による MSC 脂肪分化の候補遺伝子として選択した。先行研究において一遺伝子に対して複数の sgRNA を設計することで，dCas9 タンパク質による転写活性化効率が相乗的に向上することが報告されている^{61,62}。そこで本研究ではこれら三遺伝子それぞれについて，転写開始点近傍の異なる配列を標的とする sgRNA を四つずつ設計した (以降“sgGENE_1-4”と記載する) (図 3-3)。レンチウイルスを用いてこれら四つの sgRNA を同時に dCas9-p65 MSC に導入することで，各遺伝子の転写活性化を試みた。その結果，sgPPARG_1-4，sgCEBPA_1-4，sgKLF5_1-4 を導入した dCas9-p65 MSC では sgControl を導入した dCas9-p65 MSC と比較して，それぞれおよそ 2 倍，8 倍，3 倍遺伝子発現量増加が観察された

(図 3-4). 本実験結果から, dCas9-p65 タンパク質を用いることで, MSC における内在遺伝子の転写活性化が可能であることが明らかとなった.

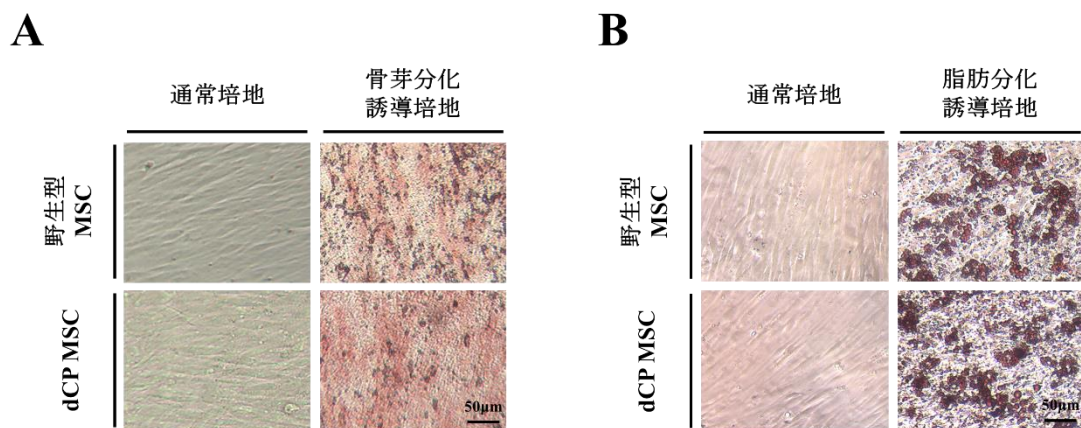
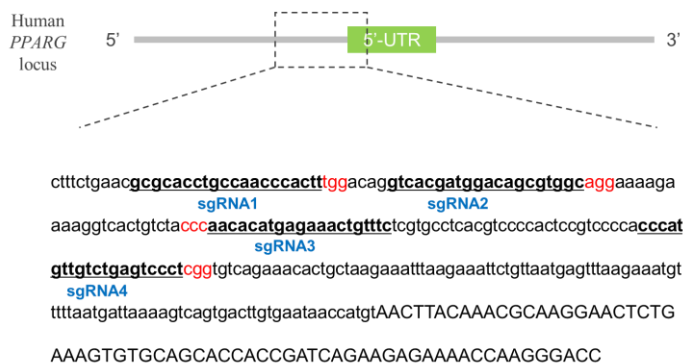


図 3-2 : dCas9-p65 MSC の分化能

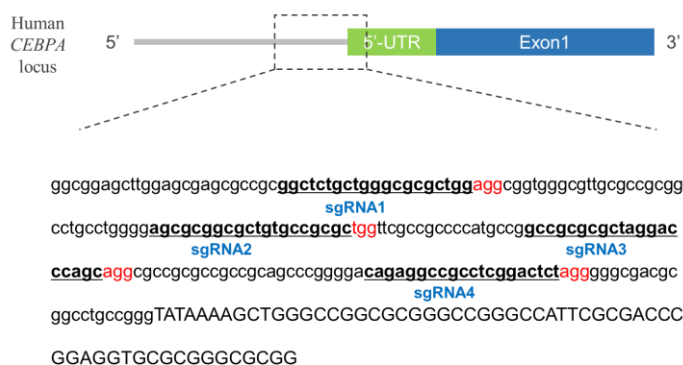
(A) 野生型 MSC 及び dCas9-p65 MSC を 2 週間骨芽分化誘導し，アリザリンレッド S で染色した．各サンプルの中で代表的な画像を示す．スケールバーは 50 μm を示す．

(B) 野生型 MSC 及び dCas9-p65 MSC を 2 週間脂肪分化誘導し，オイルレッド O で染色した．各サンプルの中で代表的な画像を示す．スケールバーは 50 μm を示す．

PPARG



CEBPA



KLF5

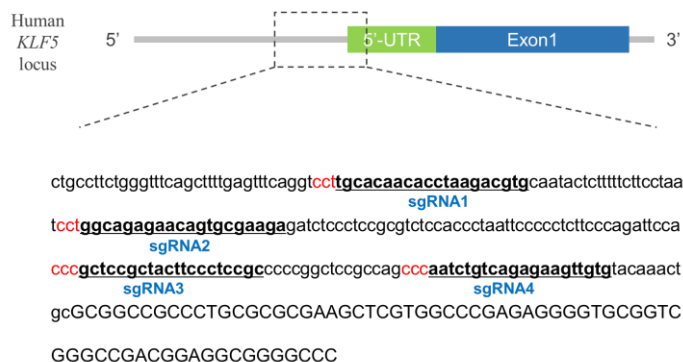


図 3-3 : *PPARG*, *CEBPA*, *KLF5* 遺伝子座位における sgRNA 標的配列

内在性の *PPARG*, *CEBPA*, *KLF5* 遺伝子座位における sgRNA 標的配列を下線かつ太字で示す。プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) は赤字で示す。またプロモーター領域は小文字で、mRNA 領域は大文字で示す。本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵。

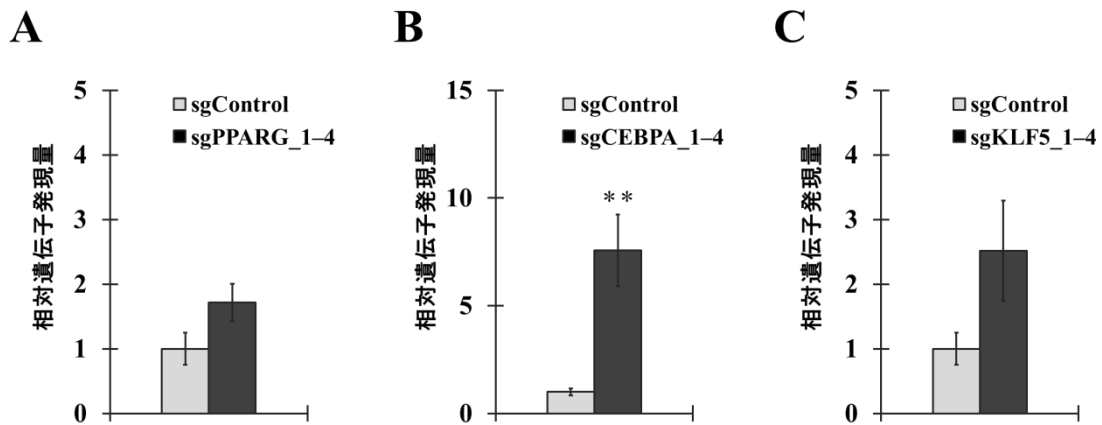


図 3-4 : dCas9-p65 MSC における内在遺伝子転写活性化

(A-C) dCas9-p65 MSC における内在 (A) *PPARG*, (B) *CEBPA*, (C) *KLF5* の転写活性化現象. dCas9-p65 MSC に高 MOI で sgRNA をコードするレンチウイルスを感染させ、感染後 4 日後に各遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で定量した. 発現量は *GAPDH* の発現量で標準化した後, sgControl 導入細胞における発現量で規格化した. グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており, エラーバーは標準誤差を示している. sgControl サンプルに対する p 値を * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で示す.

dCas9-p65による内在遺伝子転写活性化を用いたMSCの脂肪分化制御

次に dCas9-p65 による内在遺伝子転写活性化を用いた MSC の脂肪分化誘導を試みた。本目的のために sgControl, sgPPARG_1-4, sgCEBPA_1-4, sgKLF5_1-4 を導入した dCas9-p65 MSC をそれぞれ脂肪細胞維持培地で 2 週間培養した (図 3-5A)。さらに脂肪細胞の特長であるトリアシルグリセロールからなる油滴を可視化するために、オイルレッド O 染色を行った。その結果 sgControl, sgCEBPA_1-4, sgKLF5_1-4 導入細胞において油滴産生は見られなかったものの、興味深いことに、sgPPARG_1-4 導入細胞においてオイルレッド O で染色される油滴が観察された (図 3-5B)。本実験結果から dCas9-p65 タンパク質に基づく内在遺伝子転写活性化により、MSC の脂肪分化誘導が可能であることが示唆された。しかしながら図 3-5C に示すように、その分化誘導効率は既存の脂肪分化誘導培地を用いた場合と比較して非常に低く、基礎研究用の細胞サンプルあるいは臨床応用のための移植細胞サンプルとして不十分であると考えられた。

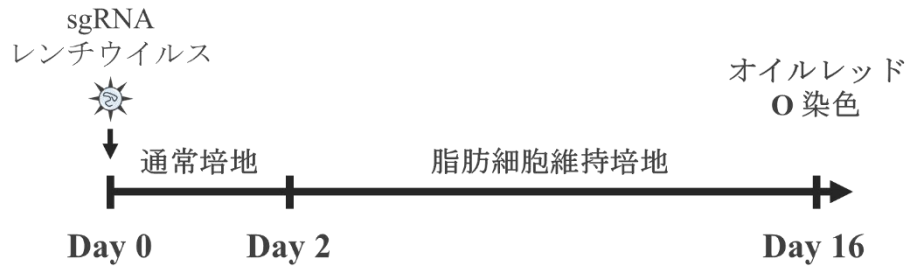
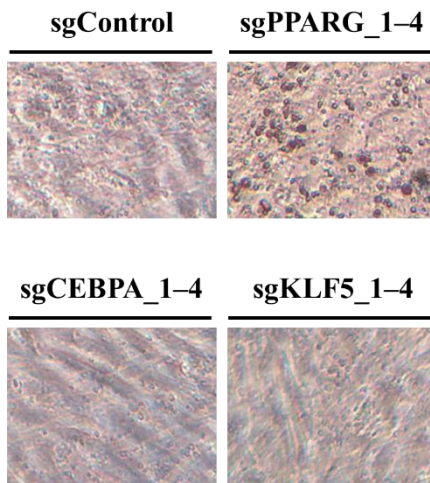
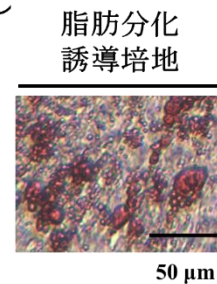
A**B****C**

図 3-5 : 内在遺伝子の転写活性化による dCas9-p65 MSC の脂肪分化誘導

(A) 内在遺伝子の転写活性化による MSC 脂肪分化誘導の概略図. (B, C) 脂肪分化誘導した dCas9-p65 MSC のオイルレッド O 染色画像. (B) dCas9-p65 MSC に高 MOI で sgRNA をコードするレンチウイルスを感染させ, 14 日間脂肪細胞維持培地で培養し, オイルレッド O 染色に供した. (C) dCas9-p65 MSC に sgRNA を感染させずに, 脂肪分化誘導培地で 14 日間培養し, オイルレッド O 染色に供した. 各サンプルの中で代表的な画像を示す. スケールバーは 50 μm を示す.

SAM システムによるレポーター遺伝子の転写活性化

ここまでの実験から dCas9-p65 システムを用いることで、MSC における内在遺伝子の転写活性化及びそれに伴う脂肪分化誘導が達成された。しかしながらその転写活性化能及び脂肪分化誘導能は非常に低く、基礎研究用の細胞サンプルあるいは臨床応用のための移植細胞サンプルとして不十分であると考えられた。そこで本研究ではより転写活性化能の高いシステムを MSC に導入することで、脂肪分化関連遺伝子の更なる転写活性化及びそれに伴う脂肪分化誘導の効率化を試みることにした。これまでにいくつかの研究グループが強力な内在遺伝子転写活性化システムを報告している⁶³⁻⁶⁵。中でも synergistic activation mediator (SAM) と呼ばれるシステムでは、単純ヘルペスウイルス由来の転写活性化因子由来の VP64 タンパク質を融合した dCas9 タンパク質 (dCas9-VP64) と、MS2 コートタンパク質結合 RNA アプタマーを組み込んだ sgRNA (sgRNA 2.0) の複合体を用いる。図 3-6 に示すように、sgRNA 2.0 は p65 とヒートショックタンパク質の転写活性化ドメイン (HSF1) を融合した MS2 コートタンパク質 (MS2-p65-HSF1) を四分子誘導することが可能である。つまり SAM システムでは一つの dCas9 タンパク質に対して三種類の転写活性化因子を合計で九分子誘導可能であり、多様な遺伝子、細胞種において高効率な転写活性化を誘導可能であることが報告されている^{63,66}。そこで本研究では SAM システムを用いて MSC における転写活性化及び脂肪分化誘導の効率化を試みることにした。

まず MSC における SAM システムの有効性を評価するために、EGFP レポーターアッセイを試みた。本目的のために先程同様 MSC に EGFP レポーターカセットを導入した後、レンチウイルスを用いて dCas9-VP64 及び MS2-p65-HSF1 発現カセットを形質導入し、blastocidin S, hygromycin B, puromycin を添加した培地で 21 日間培養することで、形質導入された細胞をセレクションし、EGFP レポーター-SAM MSC とした (図 3-7A)。

作製した EGFP レポーター-SAM MSC に sgEGFP 2.0 及びゲノム内に標的配列を持たない sgRNA 2.0 (sgControl 2.0) を導入した。その結果図 3-7B に示すように、導入 4 日後において陰性対照サンプルである sgControl 2.0 を導入した細胞では、MOI に関係なく EGFP 蛍光は観察されなかった。一方で sgEGFP 2.0 導入細胞は非常に強い緑色蛍光を示した (図 3-7B, C)。また興味深いことに、高 MOI で sgEGFP 2.0 を導入しているにも関わらず、MOI 依存的に EGFP 蛍光量が増大する様子が観察された (図 3-7B)。本結果は dCas9 タンパク質による内在遺伝子転写活性化において、細胞内 sgRNA の量が重要であることを示唆するものであり、非常に興味深い知見である。以上の結果から、SAM システムは MSC においても有効であることが示された。また EGFP 蛍光量と細胞生存率の観点から、以降の実験では MOI 20 で sgRNA 2.0 を導入することとした。

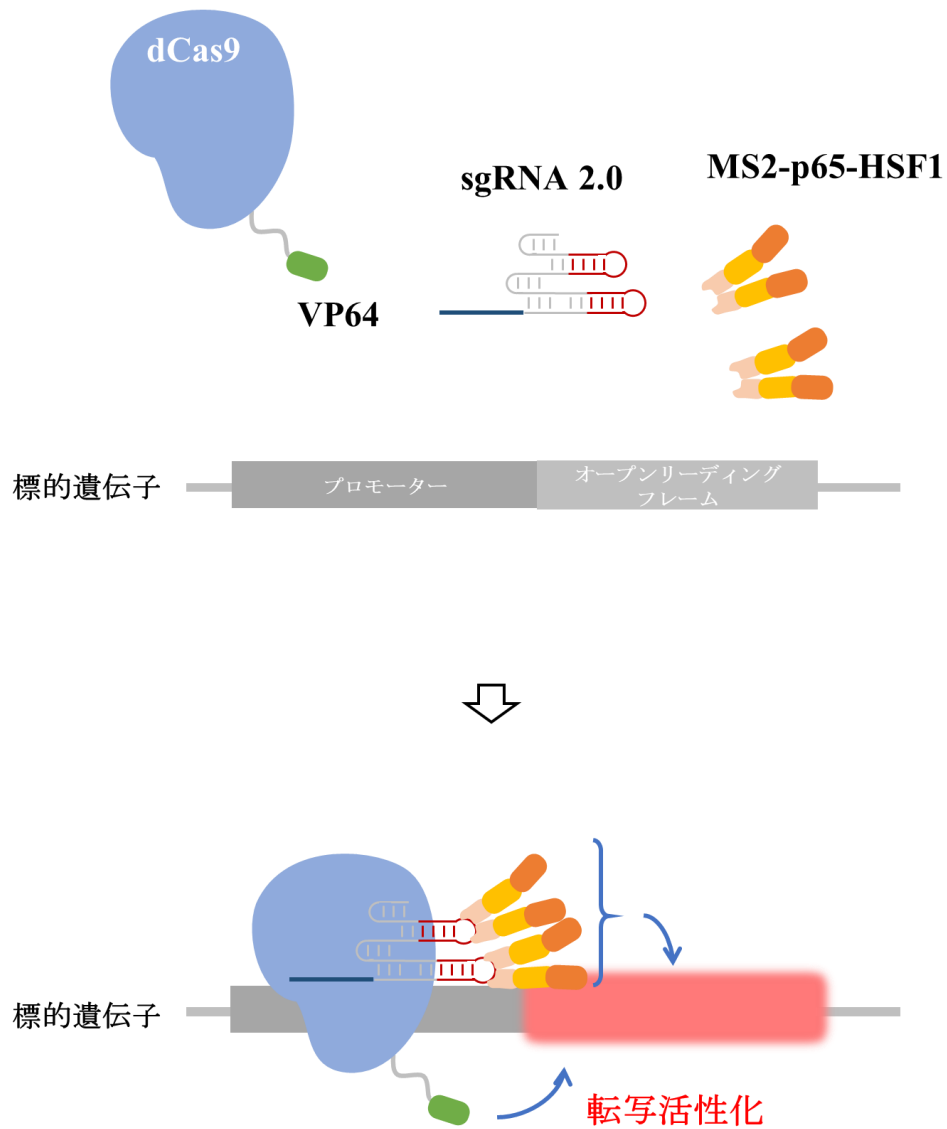


図 3-6 : SAM システムによる遺伝子転写活性化機構

単純ヘルペスウイルス由来の転写活性化因子由来の VP64 タンパク質を融合した dCas9 タンパク質 (dCas9-VP64), MS2 コートタンパク質結合性の RNA アプタマーを組み込んだ sgRNA (sgRNA 2.0), そして p65 とヒートショックタンパク質の転写活性化ドメイン (HSF1) を融合した MS2 コートタンパク質 (MS2-p65-HSF1) が複合体を形成することで, 標的遺伝子プロモーター領域に多数の転写活性化因子が誘導され, 転写が活性化される.

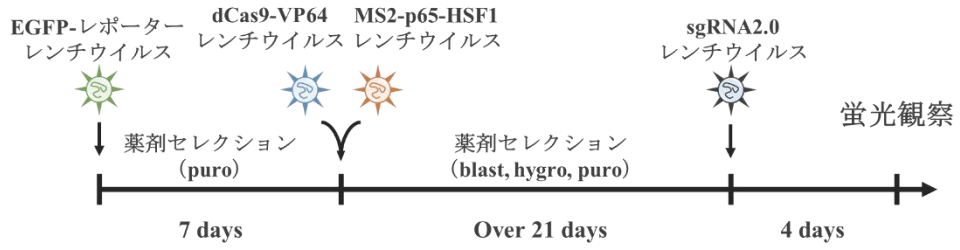
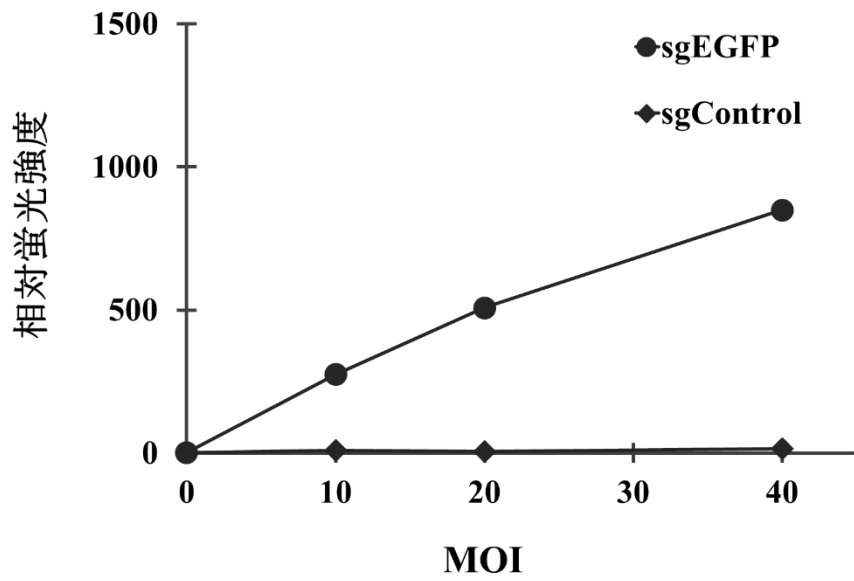
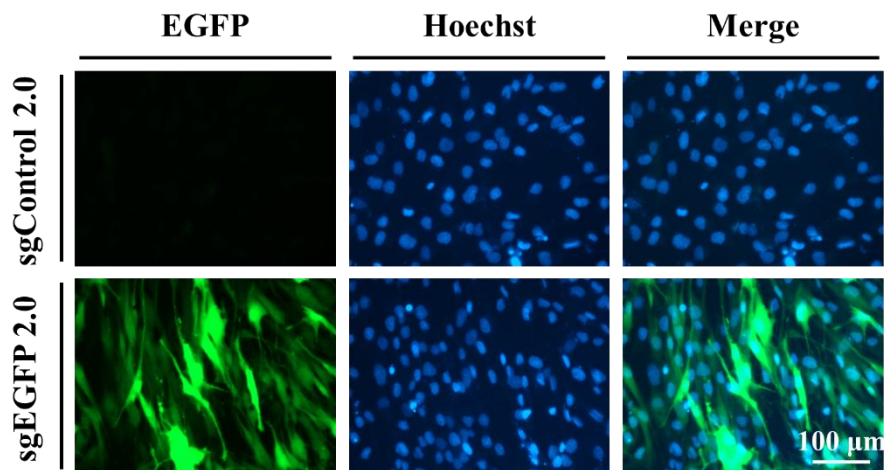
A**B****C**

図 3-7 : SAM システムによるレポーター遺伝子の転写活性化

(A) EGFP レポーターアッセイの概略図. (B) SAM システムによる EGFP レポーターの sgRNA 2.0 レンチウイルスの MOI 依存的な転写活性化現象. EGFP レポーターSAM に MOI 0, 10, 20, 40 で sgRNA 2.0 をコードするレンチウイルスを感染させ, 4 日間培養した後に Hoechst 33258 で染色し, 蛍光画像を取得した. 各サンプルにおける EGFP 蛍光強度は Hoechst 33258 の蛍光強度で標準化した後に, MOI 0 の sgControl 2.0 サンプルで規格化した. (C) MOI 20 における蛍光画像を示す. 各サンプルの中で代表的な画像を示す. スケールバーは 100 μm を示す. 本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

SAM システムによる内在遺伝子の転写活性化

続いて SAM システムによる内在遺伝子の転写活性化を試みた。レンチウイルスを用いて SAM システム恒常発現 MSC (SAM MSC) を樹立し、分化誘導培地を用いて骨芽分化能及び脂肪分化能を検証した。骨芽分化誘導した細胞をアリザリンレッド S 染色、脂肪分化誘導した細胞をオイルレッド O 染色したところ、どちらの場合においても効率的に分化が誘導されていることが明らかとなった (図 3-8A, B)。さらにその分化効率は野生型の MSC と同程度であった。これらの実験結果から、SAM MSC が多分化能を保持していることが示された。

次に SAM MSC を用いて、内在遺伝子の転写活性化を試みた。脂肪分化制御因子である *PPARG*, *CEBPA*, *KLF5* のそれぞれについて、先程と同じ配列を標的とする sgRNA 2.0 を四つずつ作製した (以降 “sgGENE 2.0_1-4” と記載する)。レンチウイルスを用いてこれら四つの sgRNA を同時に SAM MSC に導入し、各遺伝子の転写活性化を試みた。その結果、sgPPARG 2.0_1-4, sgCEBPA 2.0_1-4, sgKLF5 2.0_1-4 を導入した SAM MSC では sgControl 2.0 を導入した SAM MSC と比較して、それぞれおよそ 15 倍, 11,110 倍, 85 倍遺伝子発現量が増加しており、dCas9-p65 システムを用いた場合と比べても、転写活性化効率が顕著に向上していることが明らかとなった (図 3-8C-E)。ここまでの実験結果により、SAM システムを用いることで MSC における内在遺伝子の強力な転写活性化が達成された。

Cas9 タンパク質を利用する全ての技術において、オフターゲット効果は無視できない⁶⁷。そこで私は MSC における SAM システムのオフターゲット効果を検証するために、CCTop ソフトウェアを用いてそれぞれの sgRNA 2.0 のオフターゲット結合サイトを予測した⁵⁶。CCTop が予測したオフターゲット結合サイト候補の中から、タンパク質をコードする遺伝子の転写開始点上流に位置するものを選択し、各 sgRNA のオフターゲット結合サイトとした (表 3-2)。これらの遺伝子について、sgPPARG 2.0_1-4, sgCEBPA

2.0_1-4, sgKLF5 2.0_1-4 それぞれの sgRNA 2.0 混合物を形質導入した時の発現量変化をリアルタイム PCR で定量した. その結果図 3-9 に示すように, どの遺伝子においても発現量の増加は観察されなかった. このことから, sgPPARG 2.0_1-4, sgCEBPA 2.0_1-4, sgKLF5 2.0_1-4 のオフターゲット効果は無視できると考えられる.

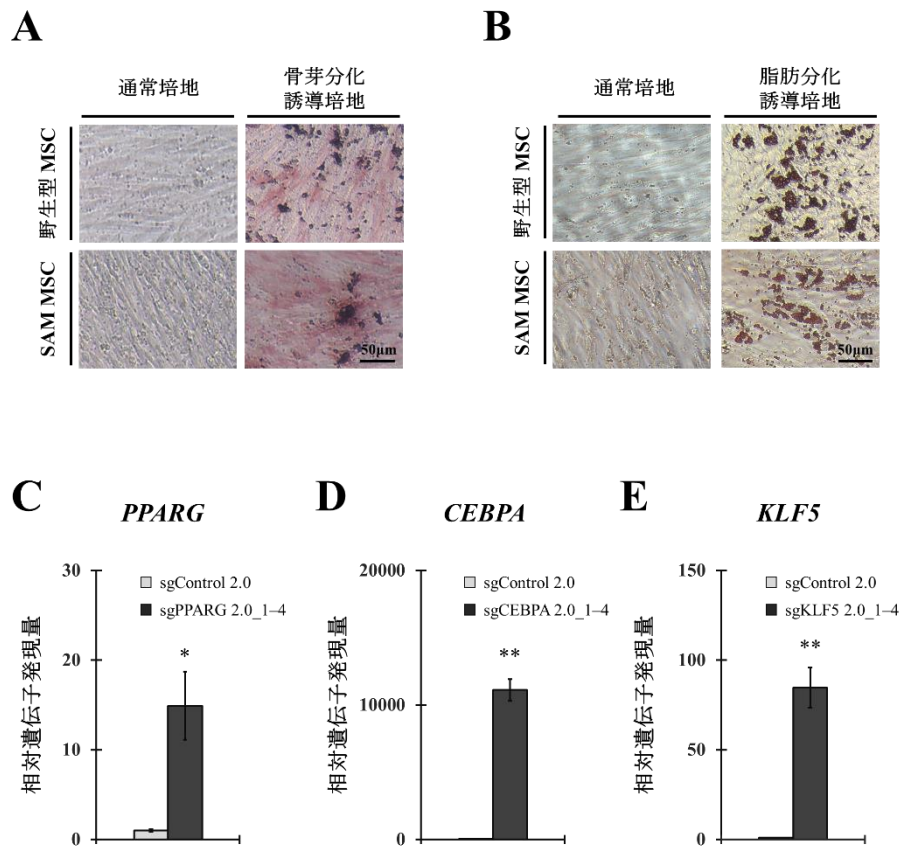


図 3-8 : SAM MSC の分化能及び内在遺伝子転写活性化

(A) 野生型 MSC 及び SAM MSC を 2 週間骨芽分化誘導し、アリザリンレッド S で染色した。各サンプルの中で代表的な画像を示す。スケールバーは 50 μm を示す。(B) 野生型 MSC 及び SAM MSC を 2 週間脂肪分化誘導し、オイルレッド O で染色した。各サンプルの中で代表的な画像を示す。スケールバーは 50 μm を示す。(C-E) SAM MSC における内在 (C) *PPARG*, (D) *CEBPA*, (E) *KLF5* の転写活性化現象。SAM MSC に MOI 20 で sgRNA 2.0 をコードするレンチウイルスを感染させ、感染後 4 日後に各遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で定量した。発現量は *GAPDH* の発現量で標準化した後、sgControl 2.0 導入細胞における発現量で規格化した。グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており、エラーバーは標準誤差を示している。sgControl 2.0 サンプルに対する p 値を * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で示す。本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵。

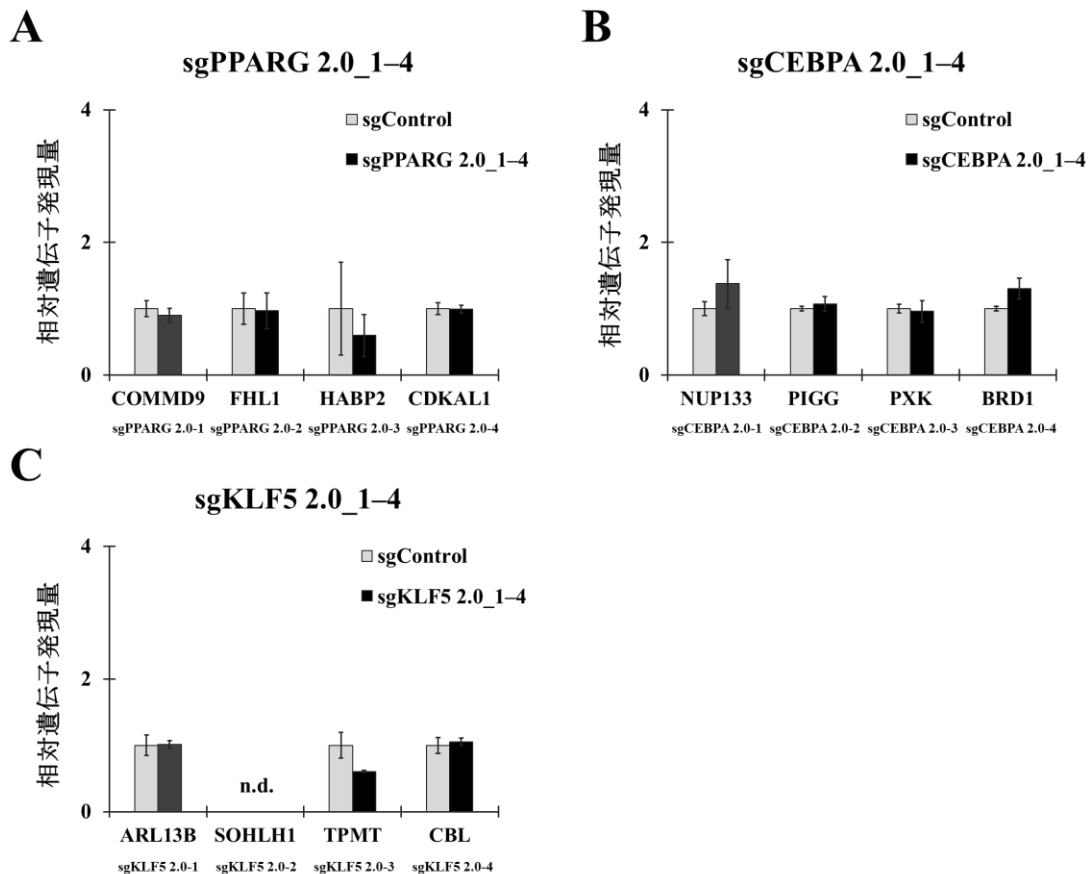


図 3-9 : SAM MSC における内在遺伝子転写活性化のオフターゲット効果

(A-C) (A) sgPPARG 2.0_1-4, (B) sgCEBPA 2.0_1-4, (C) sgKLF5 2.0_1-4 を形質導入した SAM MSC におけるオフターゲット遺伝子の発現量. SAM MSC に MOI 20 で sgRNA 2.0 をコードするレンチウイルスを感染させ、感染後 4 日後にオフターゲット遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で定量した. 発現量は *GAPDH* の発現量で標準化した後, sgControl 2.0 導入細胞における発現量で規格化した. グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており, エラーバーは標準誤差を示している. n.d. は遺伝子発現が検出されなかったことを示す. 本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

SAM システムによる内在遺伝子転写活性化を用いた MSC の脂肪分化制御

次に SAM システムによる強力な内在遺伝子転写活性化を用いた MSC の脂肪分化誘導を試みた。sgControl 2.0, sgPPARG 2.0_1-4, sgCEBPA 2.0_1-4, sgKLF5 2.0_1-4 を SAM MSC に導入した後、これらの細胞を脂肪細胞維持培地で 2 週間培養した (図 3-10A)。通常脂肪分化誘導に用いられる脂肪分化誘導培地には、PPARG のアゴニストである indomethacin 及び脂肪分化に寄与する転写因子である CEBPB 及び CEBPD の発現を促進する 3-isobutyl-1-methylxanthine が含まれている。しかしながらこれらの化合物は生体に存在しないことが明らかとなっており、こうした外来性の低分子化合物を削減した脂肪細胞維持培地で分化を誘導できれば、より生体内に近い分化が実現できると言える。図 3-10B に示すように、2 週間培養した後の細胞をオイルレッド O 染色したところ、sgControl 2.0, sgKLF5 2.0_1-4 導入細胞においては、dCas9-p65 システムと同様、油滴は見られなかった。一方で sgPPARG 2.0_1-4 導入細胞においては dCas9-p65 システムを用いた場合と比較して、非常に大きい油滴が多数観察された (図 3-10C)。さらに興味深いことに、dCas9-p65 システムで CEBPA の遺伝子発現を活性化した場合には油滴産生細胞は全く観察されなかったのに対し、SAM システムで CEBPA の遺伝子発現を活性化した場合には非常に多くの油滴産生細胞が観察された (図 3-10C)。これらの実験結果は、dCas9-p65 システムから SAM システムに変えたことにより、転写活性化効率が上昇したことに起因すると考えられる。また内在遺伝子転写活性化により分化誘導された脂肪細胞は、脂肪分化誘導培地を用いて脂肪分化誘導を行った細胞と比較しても、効率的に脂肪分化しているように観察された (図 3-10B, C)。一方で KLF5 の発現を活性化した細胞では全く脂肪分化誘導が観察されなかった。その原因としては、KLF5 の発現量が十分でなかったことやヒト MSC の脂肪分化誘導において KLF5 が必要十分な働きを持たないことなどが考えられる。転写活性化効率を向上させることで脂肪分化が観察されるようになった CEBPA の実験結果に着目すると、KLF5 活性化細胞においても、さらに

発現量を高めることで脂肪分化が誘導される可能性がある。また先行研究における *KLF5* の脂肪分化促進能は 3T3-L1 (マウス胎児皮膚由来の細胞) を用いて検証されているため、ヒト MSC の脂肪分化では機能が異なる可能性も十分に考えられる⁶⁸。

続いて分化効率を詳細に解析するために、オイルレッド O 染色度を定量することとした。100% イソプロパノールを用いて染色サンプルから oil red O を抽出し、oil red O 特異的な吸収波長である 520 nm における吸光度を測定した。その結果図 3-10D に示すように、sgPPARG 2.0_1-4 導入細胞と sgCEBPA 2.0_1-4 導入細胞のどちらの細胞も、脂肪分化誘導培地を用いて分化誘導した細胞と同程度の染色度を示した。さらにオイルレッド O 染色画像から単位面積当たりの油滴数を定量したところ、油滴産生数についても sgPPARG 2.0_1-4 導入細胞及び sgCEBPA 2.0_1-4 導入細胞は、脂肪分化誘導培地を用いて分化誘導した細胞と同程度であった。これらの実験結果から、SAM システムを用いて脂肪分化関連遺伝子である *PPARG* ないし *CEBPA* の発現を活性化することにより、高効率な脂肪分化誘導が可能であることが明らかとなった。

PPARG 及び *CEBPA* の転写活性化により誘導された脂肪細胞は、単胞性で大きな油滴を産生しており、白色脂肪細胞であると考えられた (図 3-10B, C)。そこで誘導された脂肪細胞を詳細に解析するために、リアルタイム PCR を用いてマーカー遺伝子の発現量を評価することとした。本研究では成熟白色脂肪細胞のマーカー遺伝子として *PPARG*, *CEBPA*, *ADIPOQ*, *FABP4*, *FASN*, *LIPE* の六つを選択した⁵⁸。図 3-11 に示すように、これらのマーカー遺伝子は sgRNA 2.0 非導入細胞や sgControl 2.0 導入細胞など、分化していない細胞では発現していなかった。一方で sgPPARG 2.0_1-4 導入細胞及び sgCEBPA 2.0_1-4 導入細胞ではこれら六つの遺伝子が非常によく発現しており、その発現量は脂肪分化誘導培地を用いて分化誘導した細胞と同程度であった。これらの結果から、MSC の脂肪分化誘導において SAM システムによる内在遺伝子転写制御は非常に有効であり、内在性の *PPARG* ないし *CEBPA* の発現を活性化することによって得られた脂

肪細胞は白色脂肪細胞であることが示唆された. さらに外来性の添加物を削減した脂肪細胞維持培地による MSC の脂肪分化誘導が達成された.

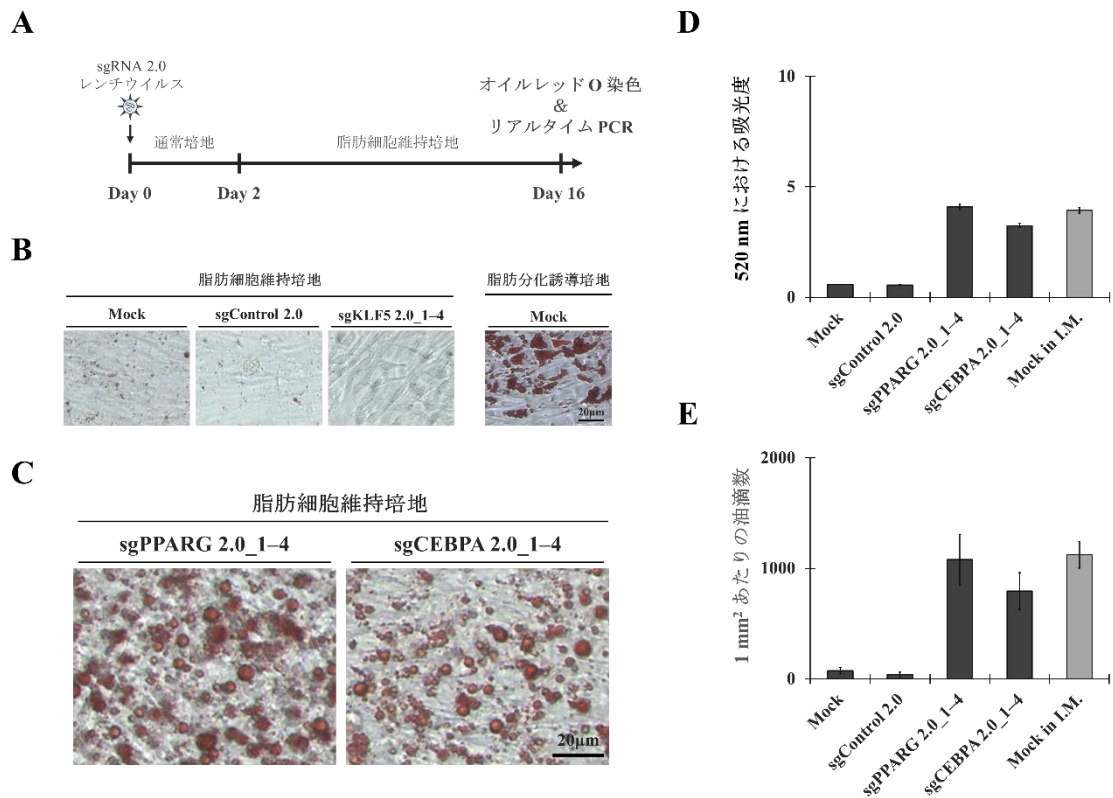


図 3-10 : 内在遺伝子の転写活性化による SAM MSC の脂肪分化誘導

(A) 内在遺伝子の転写活性化による MSC 脂肪分化誘導の概略図. (B, C) 脂肪分化誘導した SAM MSC のオイルレッド O 染色画像. SAM MSC に MOI 20 で sgRNA をコードするレンチウイルスを感染させ, 14 日間脂肪細胞維持培地で培養し, オイルレッド O 染色に供した. 陽性対照サンプルとして, SAM MSC に sgRNA を感染させずに脂肪分化誘導培地で 14 日間培養し, オイルレッド O 染色に供したものを作製した. 各サンプルの中で代表的な画像を示す. スケールバーは 20 µm を示す. (D) 各オイルレッド O 染色サンプルからイソプロパノールを用いて oil red O を抽出し, 520 nm における吸光度を定量した. (E) オイルレッド O 染色画像から 1 mm² あたりの油滴数を定量した. グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており, エラーバーは標準誤差を示している. Mock は sgRNA 2.0 非導入細胞を, I. M. は脂肪分化誘導培地を示す. 黒いバーは脂肪細胞維持培地で培養した細胞を, 灰色のバーは脂肪分化誘導培地で培養した細胞を示す. 本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

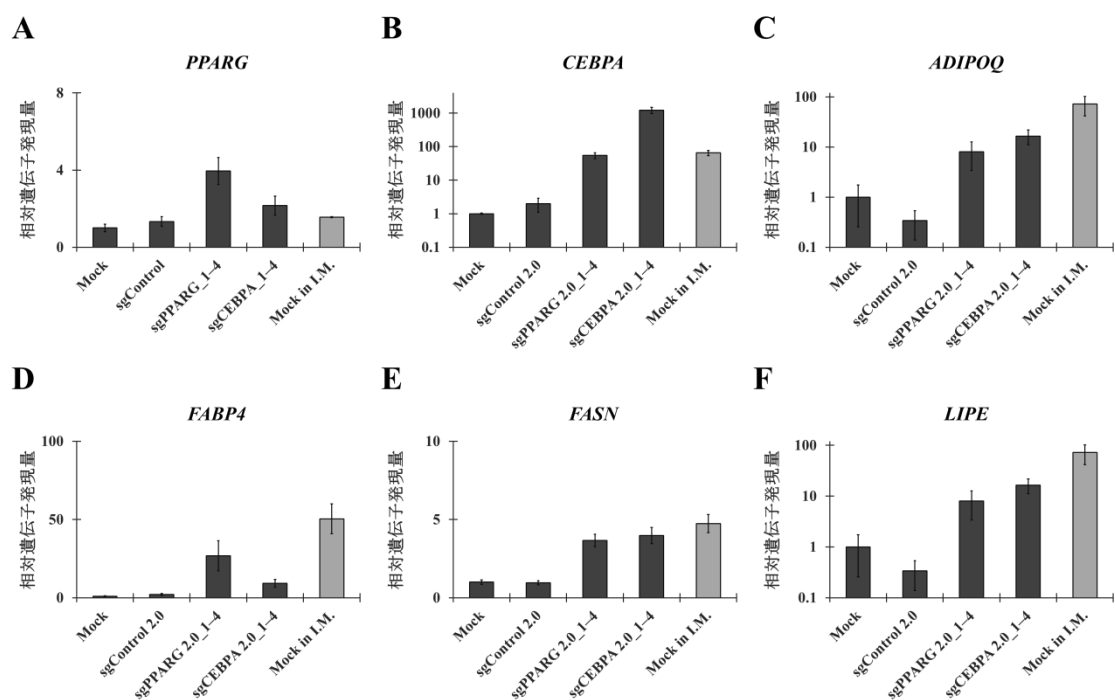


図 3-11：内在遺伝子転写活性化により誘導された脂肪細胞の遺伝子発現プロファイル

(A-F) SAM MSC に MOI 20 で sgRNA をコードするレンチウイルスを感染させ、14 日間脂肪細胞維持培地で培養した。細胞から RNA を抽出し、白色脂肪マーカー遺伝子である (A) *PPARG*, (B) *CEBPA*, (C) *ADIPOQ*, (D) *FABP4*, (E) *FASN*, (F) *LIPE* の発現量をリアルタイム PCR で定量した。発現量は *GAPDH* の発現量で標準化した後、sgRNA 2.0 非導入細胞 (Mock 細胞) における発現量で規格化した。グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており、エラーバーは標準誤差を示している。I.M. は脂肪分化誘導培地を示す。黒いバーは脂肪細胞維持培地で培養した細胞を、灰色のバーは脂肪分化誘導培地で培養した細胞を示す。本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵。

MSCにおける複数遺伝子の同時転写活性化

哺乳類の脂肪細胞は、エネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞と、エネルギーを消費するベージュないし褐色脂肪細胞の二種類に大別される。白色脂肪細胞は細胞内に単胞性の大きな油滴を有しており、生体における余分なエネルギーを中性脂肪として蓄積する。この中性脂肪の蓄積量が多くなると、肥満や糖尿病といった生活習慣病の原因となることが知られている。一方でベージュないし褐色脂肪細胞は一細胞内に小さな油滴を多数有しており、熱産生を担っている⁶⁹。これらの細胞は熱産生を通して余分なエネルギーを消費することができるため、上述の生活習慣病を防ぐ効果がある。このように生体における代謝バランスは、白色脂肪細胞とベージュないし褐色脂肪細胞の双方の働きによって制御されている。肥満や糖尿病といった疾患のメカニズム解明や治療薬スクリーニングを行うためには、これら脂肪細胞の生体における発生過程を理解することが重要である。そこで本研究では、SAM システムを用いて複数種類の脂肪分化関連遺伝子を転写活性化することにより、これらの脂肪細胞の分化制御を行うことを着想した。標的遺伝子として、白色脂肪分化にはこれまで通り *PPARG* を、褐色脂肪分化ないしベージュ脂肪分化には *PPARG*, *CEBPB*, *PRDM16* を選択した^{58,69,70}。*PRDM16* はベージュ及び褐色脂肪分化において主要な働きを担うことが知られており、熱産生に関与する遺伝子群を活性化する転写因子である。脂肪分化の主要制御因子である。*PRDM16* タンパク質は *PPARG* タンパク質と複合体を形成し、*PPARG* タンパク質の転写活性を制御することで褐色脂肪分化を誘導する⁶⁹⁻⁷¹。また筋芽細胞のように *PPARG* タンパク質の発現が低い環境下では *CEBPB* タンパク質と複合体を形成し、筋芽細胞の褐色脂肪分化を誘導することも報告されている⁷²。ベージュ脂肪細胞における知見は未だ少ないが、同様の働きを有することが予想される。

続いて SAM システムが MSC において複数の内在遺伝子を同時転写活性化できるかどうかを検証するために、*CEBPB* 及び *PRDM16* のプロモーター領域に対して四つずつ

sgRNA 2.0 を設計した (図 3-12)。先程と同様にしてこれらの sgRNA 2.0 のオフターゲット効果を検証したところ、どのオフターゲット遺伝子においても有意な発現上昇は観察されなかった (図 3-13)。続いて各遺伝子の独立転写制御を試みたところ、sgCEBPB 2.0_1-4, sgPRDM16 2.0_1-4 を導入した SAM MSC では sgControl 2.0 を導入した SAM MSC と比較して、それぞれおよそ 9 倍, 95 倍遺伝子発現量が増加しており, PPARG 同様強力な転写活性化が可能であることが明らかとなった (図 3-14A)。さらに sgPPARG 2.0_1-4, sgCEBPB 2.0_1-4, sgPRDM16 2.0_1-4 を同時に導入することで, PPARG, CEBPB, PRDM16 の同時転写活性化を試みた。その結果, 全 sgRNA 2.0 (sgMixture 2.0) を導入した細胞では sgControl 2.0 を導入した SAM MSC と比較して, PPARG, CEBPB, PRDM16 の発現量がおおよそ 6 倍, 6 倍, 52 倍増大していた (図 3-14B)。本実験結果から, sgRNA 2.0 を共導入することで, MSC における複数内在遺伝子の同時転写活性化可能であることが明らかとなった。

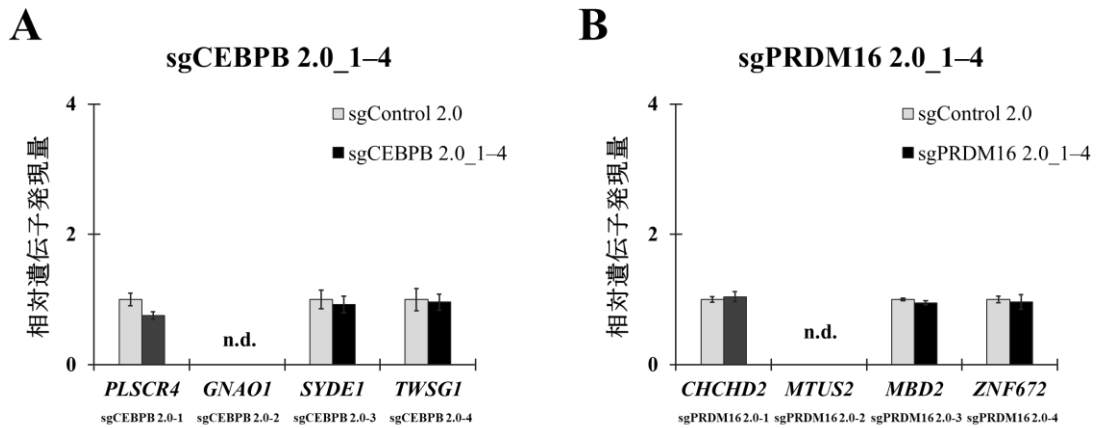
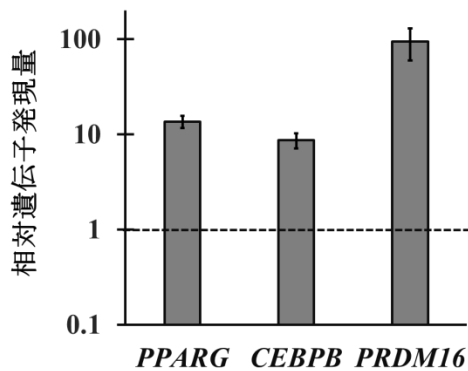


図 3-13 : SAM MSC における内在遺伝子転写活性化のオフターゲット効果

(A, B) (A) sgCEBPB 2.0_1-4, (B) sgPRDM16 2.0_1-4 を形質導入した SAM MSC におけるオフターゲット遺伝子の発現量. SAM MSC に MOI 20 で sgRNA 2.0 をコードするレンチウイルスを感染させ, 感染後 4 日後にオフターゲット遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で定量した. 発現量は *GAPDH* の発現量で標準化した後, sgControl 2.0 導入細胞における発現量で規格化した. グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており, エラーバーは標準誤差を示している. sgControl 2.0 サンプルに対する p 値を * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で示す. n.d. は遺伝子発現が検出されなかったことを示す. 本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

A

独立転写活性化

**B**

同時転写活性化

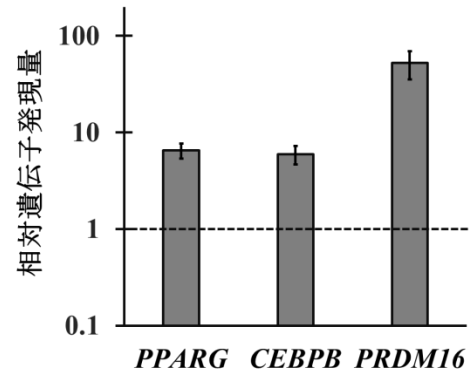


図 3-14 : SAM MSC における複数遺伝子同時転写活性化

(A, B) SAM MSC における内在 *PPARG*, *CEBPB*, *PRDM16* の (A) 独立転写活性化現象及び (B) 同時転写活性化現象. SAM MSC に MOI20 で sgRNA2.0 をコードするレンチウイルスを感染させ、感染後 4 日後に各遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で定量した. 発現量は *GAPDH* の発現量で標準化した後、sgControl 2.0 導入細胞における発現量で規格化した. グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており、エラーバーは標準誤差を示している. 本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

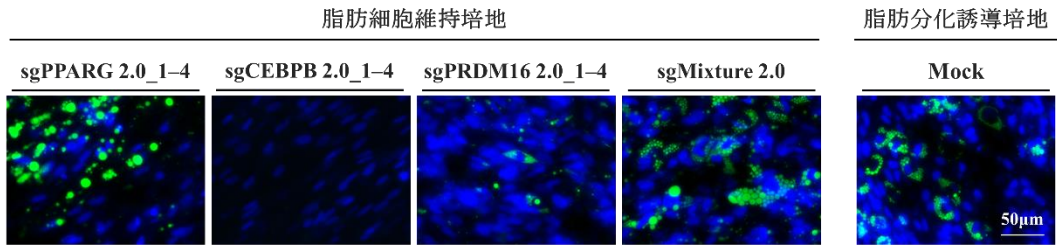
選択的な内在遺伝子発現誘導による MSC の脂肪分化制御

最後に SAM システムを用いて *PPARG*, *CEBPB*, *PRDM16* の各遺伝子を独立して、あるいは同時に転写活性化することにより、異なる脂肪細胞への分化誘導を試みた。SAM MSC に sgRNA 2.0 を導入した後、脂肪細胞維持培地で 3 週間培養し、蛍光性の油滴染色剤である Nile red と核染色剤である Hoechst 33258 を用いて染色した。その結果、先程の結果と同様、*PPARG* の発現を単独で活性化した場合、単胞性の大きな油滴を産生する白色脂肪様の細胞が多く観察された (図 3-15A, B)。一方で三遺伝子の発現を同時に活性化した場合では、小さな油滴を多数産生するベージュないし褐色脂肪様の細胞が多く観察された (図 3-15A, B)。さらに興味深いことに *CEBPB* の発現活性化では脂肪分化は観察されなかったものの、*PRDM16* の発現を単独で活性化した場合において、ごく少数ではあるがベージュないし褐色脂肪様の細胞が観察された (図 3-15A)。このような現象が観察された要因として、SAM システムによる活性化がない MSC において *CEBPB* はある程度発現しているが、*PRDM16* はほとんど発現していない可能性が考えられる。この場合、*PRDM16* の発現を単独で活性化した場合においては誘導された *PRDM16* タンパク質と元々発現していた *CEBPB* タンパク質が分化を誘導するものの、*CEBPB* の発現活性化細胞では *PRDM16* の発現レベルが十分でないため分化誘導が起らないと予想される。

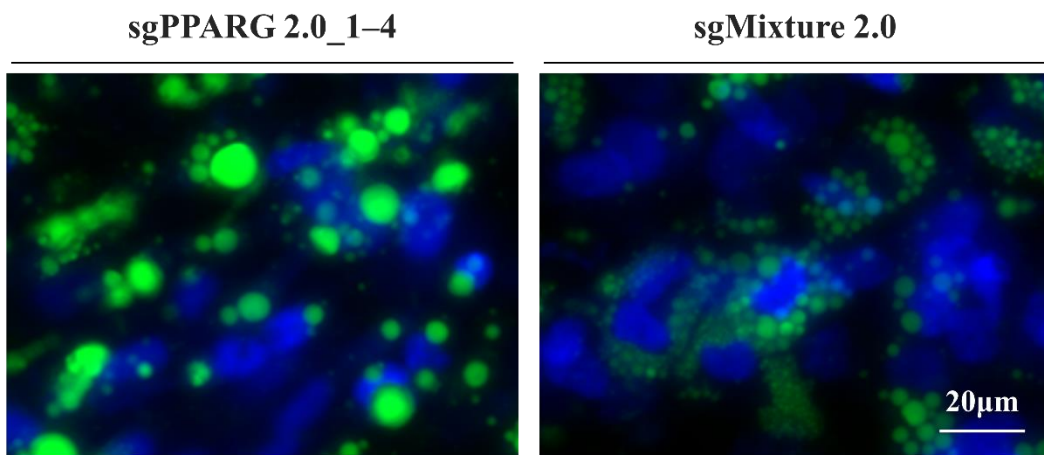
これまでも Ahfeldt らが、iPS 細胞由来の MSC において外来性の *PPARG* を単独発現させることで白色脂肪様細胞を、*PPARG* に加えて同じく外来性の *CEBPB* 及び *PRDM16* を共発現させることで、褐色脂肪様細胞を誘導可能であることを報告している⁵⁸。一方で褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞は機能も形態も非常によく似ているが、褐色脂肪細胞は骨格筋前駆細胞由来であり、Myf-5 陰性の MSC から分化する白色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞とは由来が大きく異なることも報告されている^{70,71}。そこで本研究では、*PPARG*, *CEBPB*, *PRDM16* の同時転写活性化により誘導された多胞性の脂肪細胞

胞が褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞のどちらなのかを解析するために、リアルタイム PCR を用いてマーカー遺伝子の発現量を評価した。本研究ではベージュ脂肪細胞のマーカー遺伝子として *TMEM26* と *SHOX2* を、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子として *OPLAH* と *SLC29A1* を選択した^{69,73}。図 3-15 に示すように、sgPPARG 2.0_1-4 導入細胞と比較して sgMixture 2.0 導入細胞では、ベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子である *TMEM26* と *SHOX2* が高く発現していた。一方で褐色脂肪細胞マーカー遺伝子である *OPLAH* と *SLC29A1* の発現量は変わらなかった。これらの結果から、本研究において内在性 *PPARG*, *CEBPB*, *PRDM16* の同時発現誘導によって得られた多胞性の油滴産生細胞は褐色脂肪細胞ではなく、ベージュ脂肪細胞であると考えられる。本実験により、MSC における複数遺伝子の同時転写活性化を達成し、選択的な遺伝子発現誘導により、白色脂肪様細胞とベージュ脂肪様細胞を効率的に分化し分けることに成功した。

A



B



C

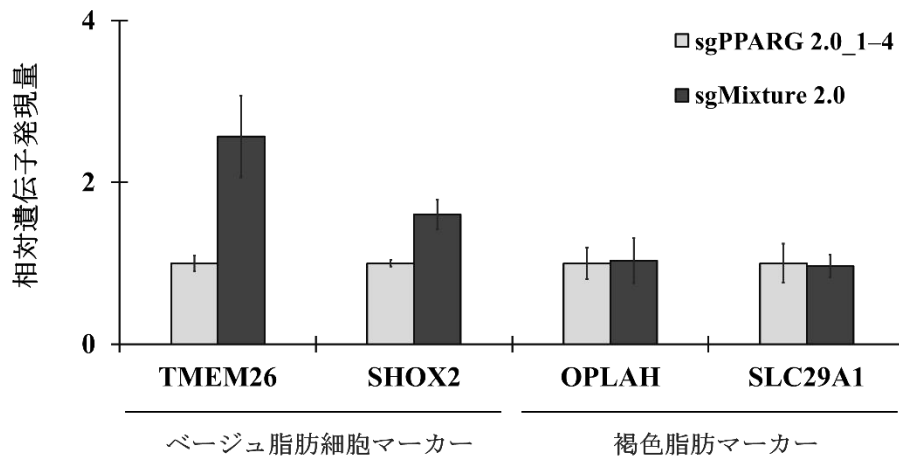


図 3-15 : 選択的な遺伝子発現制御による SAM MSC の白色及びベージュ脂肪分化制御

(A, B) 脂肪分化誘導した SAM MSC のナイルレッド染色画像. SAM MSC に MOI 20 で sgRNA をコードするレンチウイルスを感染させ, 14 日間脂肪細胞維持培地で培養し, ナイルレッド O 染色に供した. 陽性対照サンプルとして, SAM MSC に sgRNA を感染させずに, 脂肪分化誘導培地で 14 日間培養し, ナイルレッド染色に供したものを作製した. 各サンプルの中で代表的な画像を示す. スケールバーは (A) 50 μm (B) 20 μm を示す. (C) 細胞から RNA を抽出し, *TMEM26*, *SHOX2*, *OPLAH*, *SLC29A1* の発現量をリアルタイム PCR で定量した. 発現量は *GAPDH* の発現量で標準化した後, sgPPARG 2.0_1-4 導入細胞における発現量で規格化した. グラフ中の値は独立した三回の試行の平均値を示しており, エラーバーは標準誤差を示している. 本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵.

3-5 考察

本章における研究では、内在遺伝子の転写活性化による MSC 脂肪分化制御系の構築を試みた。第一の内在遺伝子転写活性化システムとして、CRISPR-Cas9 システム由来の dCas9 タンパク質に転写活性化ドメインである p65 タンパク質を融合した dCas9-p65 タンパク質を用いた。本タンパク質を MSC に導入し、内在遺伝子の転写活性化及びそれに伴う脂肪分化誘導を試みた。その結果、脂肪分化制御遺伝子である PPARG, CEBPA, KLF5 の発現を誘導することに成功した。さらに PPARG の発現を誘導した場合において MSC の脂肪分化が観察された。しかしながらその脂肪分化誘導能は非常に低く、基礎研究用の細胞サンプルあるいは臨床応用のための移植細胞サンプルとして不十分であると考えられた。本研究では転写活性化効率を改善することで、より効率的な脂肪分化誘導が可能であると考え、多様な遺伝子、細胞種において強力な転写活性化が可能な SAM システムの使用を着想した。その結果、dCas9-p65 システムを比較して非常に強力な転写活性化が達成された。このことから MSC においても、一つの dCas9 タンパク質に対して三種類の転写活性化因子を合計九分子誘導可能な SAM システムが有効であることが示唆された。

続いて SAM システムを用いて脂肪分化制御因子の発現を誘導することで、MSC の効率的かつ生体内における分化過程に近い脂肪分化制御を目指した。本研究では PPARG ないし CEBPA の単独遺伝子転写活性化により白色脂肪様細胞の分化誘導を、PPARG, CEBPB, PRDM16 の同時転写活性化によりベージュ脂肪様細胞の分化誘導を達成した。生体における代謝機構は、白色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞のバランスによって制御されており、肥満や糖尿病といった疾患のメカニズム解明や治療薬スクリーニングを行うためには、これら脂肪細胞の効率的な分化誘導方法が必要であった。しかしながら既存の脂肪分化誘導培地を用いる手法の場合、白色脂肪細胞及びベージュ脂肪細胞を分化し

分けるのは困難であった。一方で本研究において確立した内在遺伝子転写活性化による分化誘導の場合，図 3-16 に示すように，sgRNA の標的遺伝子を変更するだけで簡便に分化し分けることが可能であり，上述の代謝性疾患の治療戦略への応用が期待される。

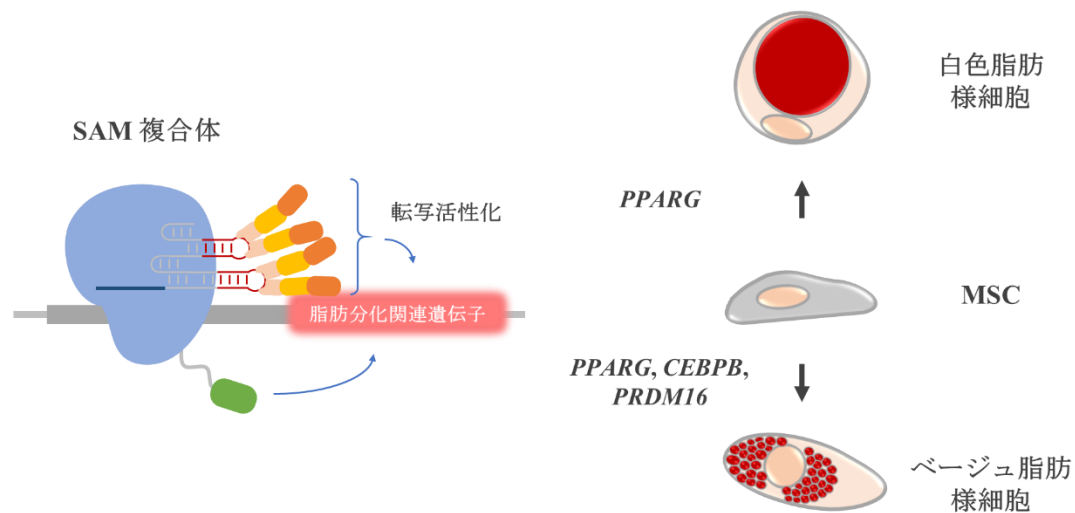


図 3-16：選択的な遺伝子発現制御による MSC の脂肪分化制御

本章における研究では、SAM システムを用いることで MSC における内在遺伝子の強力な転写活性化が可能であることを明らかとした。さらに SAM システムを用いて脂肪分化制御因子の発現を選択的に誘導することで、MSC の脂肪分化制御を目指した。PPARG の単独遺伝子転写活性化により白色脂肪様細胞の分化誘導が、PPARG, CEBPB, PRDM16 の同時転写活性化によりベージュ脂肪様細胞の分化誘導が達成された。本図は出版社より許可を得て引用⁵⁵。

本研究で標的遺伝子とした **PPARG** タンパク質は脂肪分化主要制御因子として広く知られる核内受容体の一種である。脂肪細胞及び脂肪組織の形成において、**PPARG** タンパク質は必要十分な働きを担うことが明らかとなっている^{48,57}。一般的には **thiazolidinedione** などのリガンドが **PPARG** タンパク質に結合することで、**PPARG** タンパク質が核内に移行し、**DNA** に直接結合して脂肪関連遺伝子の発現を誘導すると考えられている⁴⁸。基礎研究でよく使用される脂肪分化誘導培地においては、**indomethacin** がこのリガンドとしての役割を担っている⁷⁴。こうしたリガンド依存的な **PPARG** タンパク質の活性化機構は脂肪分化に必要であると長年考えられているものの、生体内において **PPARG** タンパク質のリガンドとなる分子は未だに同定されていない⁷⁵。また **Walkey** らは、リガンド結合能を欠損させた **PPARG** 変異体が、**PPARG** 野生体と同程度の効率で線維芽細胞から白色脂肪細胞を誘導できることを報告している⁷⁵。これらの知見は、リガンド結合及びそれに伴う **PPARG** タンパク質の活性化は必ずしも脂肪分化に必要なことを示唆している。本章における研究では内在性の **PPARG** ないし **CEBPA** の発現を誘導することで、**indomethacin** を含む外来性の添加因子を削減した脂肪細胞維持培地中で **MSC** から白色脂肪様細胞を誘導することに成功している。本実験結果からも、**MSC** の脂肪分化過程において、リガンドによる **PPARG** タンパク質の活性化は必要ないことが示唆された。

通常細胞分化制御研究において広く利用されている、組織特異的な転写因子の外来遺伝子導入を利用する手法には、**cDNA** クローニングや遺伝子導入の観点から、サイズの大きい遺伝子の検討が不十分であるという課題が残されていた。一方で **sgRNA** 発現カセットは非常に小さく、細胞に容易に導入することが可能なため、**dCas9** タンパク質に基づく転写活性化システムでは遺伝子サイズに関係なく、理論上全ての遺伝子の発現を誘導可能である。また **sgRNA** を導入するタイミングを変えることで、標的遺伝子発現を高い時間分解能で調節することが可能である。さらにヒトゲノムにコードされてい

る遺伝子の大部分は複数のスプライシングバリエントを有しており、これらバリエントの協調的な発現は分化を含む多様な細胞現象を調節するために重要である。しかしながら従来外来遺伝子導入法には、一種類のバリエントの発現しか誘導できないという問題点があった。一方で dCas9 タンパク質に基づく内在遺伝子転写活性化システムでは、天然の転写プロセスと同様に、同一プロモーターから転写される全てのスプライシングバリエントを誘導可能である。こうした利点を有することから、dCas9 タンパク質に基づく内在遺伝子転写活性化システムを利用することで、分化を含む多様な細胞現象を制御する複雑な遺伝子発現ネットワークを再現できると考えられる。

これまでに多くの研究グループが MSC に多様な外来性転写因子を発現させ、様々な細胞系列への分化を検討している。しかしながら既存の手法では複数遺伝子発現の同時制御が難しく、分化に必要な転写因子の適切な組み合わせを同定するのが困難であった。その点、dCas9 タンパク質に基づく内在遺伝子転写活性化システムは複数遺伝子の同時転写制御に適しているため、本研究で構築した SAM MSC プラットフォームを応用することで、脂肪分化だけではなく、MSC の骨芽、軟骨、筋肉、神経といった多様な細胞への分化誘導に最適な転写因子の組み合わせの同定が期待される。

第 4 章

総括

MSC は iPS 細胞や ES 細胞と並んで、再生医療の分野において大きな注目を集める幹細胞源である。MSC は骨髄、脂肪、胎盤など体内の様々な組織から採取可能な体性幹細胞でありながら、多分化能と自己複製能を併せ持つことが知られている。さらに iPS 細胞や ES 細胞と比較して腫瘍化の危険性が少ない、リプログラミングの必要がない、倫理的問題がないといった多くの利点を有しており、細胞治療や細胞移植への応用が期待されている。生体内における MSC の分化指向性は、増殖因子や ECM、物理刺激などの多様な細胞外微小環境の変化が細胞内遺伝子ネットワークと連動して制御されている。このような細胞内外の多様な要因と分化方向性の関係性を理解し、生体内と同様の分化応答を生体外で再現することができれば、幹細胞を扱う基礎研究、さらに再生医療分野における応用研究の進展に大きく寄与できると考えられる。

多様な MSC 分化機構の中でも、骨芽及び脂肪細胞への分化は一方が促進されるともう一方が抑制される競合的な関係にあることが明らかとなっており、MSC 分化のモデル系として非常によく研究されている。私は博士課程の研究において MSC の骨芽-脂肪分化軸に焦点を当て、細胞外微小環境の構築に基づく分化制御と、細胞内遺伝子ネットワークの直接的な活性化に基づく分化制御に関する研究を行った。その結果第 2 章では、三次元細胞密度の増加に伴って MSC の細胞内遺伝子ネットワークが骨芽分化に傾くという興味深い現象を明らかとした。また第 3 章では、CRISPR-Cas9 システムを利用することで細胞内遺伝子ネットワークを直接的に制御することに成功し、同システムが MSC の脂肪分化を選択的に誘導できることを示した。これらの知見を組み合わせることで、既存の分化手法の効率化や新規分化誘導遺伝子の探索、そして新たな細胞への分化誘導系の確立が期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、日々適切なお助言、ご指導を賜り、私がやりたいといった実験を全てやらせて下さった、東京大学大学院 総合文化研究科 吉本敬太郎 准教授に感謝致します。

東京大学大学院 総合文化研究科の佐藤守俊 教授、二本垣裕太 博士、吉富徹 助教には、日頃の実験から学会発表、論文執筆に至るまで多くの場面で有益なお指導とお助言を頂きましたことを感謝致します。

東京大学医科学研究所 ゲノムシステム医科学分野 菅野純夫 教授、横田真澄 氏、横山裕子 氏には研究生を送る上で多岐にわたって細やかな配慮、ご協力を頂きましたことに感謝いたします。

吉本研究室の同期・後輩の皆様には研究のことから私生活のことまで終始有意義な議論ができ、多くの知識や示唆を与えて頂きましたことに感謝いたします。

博士論文執筆にあたり、図表の使用を許可して下さった John Wiley & Sons 株式会社及び American Chemical Society にも感謝申し上げます。

最後に、三年間という長い間、精神的にも経済的にも私を支えて下さった。私の両親、古旗憲一 氏と古旗裕子 氏に感謝致します。

参考文献

- (1) Friedenstein, A. J.; Gorskaja, J. F.; Kulagina, N. N. Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs. *Exp. Hematol.* **1976**, *4* (5), 267–274.
- (2) Ashton, B. A.; Allen, T. D.; Howlett, C. R.; Eaglesom, C. C.; Hattori, A.; Owen, M. Formation of Bone and Cartilage by Marrow Stromal Cells in Diffusion Chambers in Vivo. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1980**, *151* (151), 294–307.
- (3) Bab, I.; Ashton, B. A.; Gazit, D.; Marx, G.; Williamson, M. C.; Owen, M. E. Kinetics and Differentiation of Marrow Stromal Cells in Diffusion Chambers in Vivo. *J. Cell Sci.* **1986**, *84*, 139–151.
- (4) Castro-Malaspina, H.; Gay, R. E.; Resnick, G.; Kapoor, N.; Meyers, P.; Chiarieri, D.; McKenzie, S.; Broxmeyer, H. E.; Moore, M. A. Characterization of Human Bone Marrow Fibroblast Colony-Forming Cells (CFU-F) and Their Progeny. *Blood* **1980**, *56* (2), 289–301.
- (5) Campagnoli, C.; Roberts, I. A.; Kumar, S.; Bennett, P. R.; Bellantuono, I.; Fisk, N. M. Identification of Mesenchymal Stem/progenitor Cells in Human First-Trimester Fetal Blood, Liver, and Bone Marrow. *Blood* **2001**, *98* (8), 2396–2402.
- (6) in 't Anker, P. S.; Scherjon, S. A.; Kleijburg-van der Keur, C.; Noort, W. A.; Claas, F. H. J.; Willemze, R.; Fibbe, W. E.; Kanhai, H. H. H. Amniotic Fluid as a Novel Source of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Transplantation. *Blood* **2003**, *102* (4), 1548–1549.
- (7) Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D. A.; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P.; Hedrick, M. H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13* (12), 4279–4295.

- (8) Nakahara, H.; Dennis, J. E.; Bruder, S. P.; Haynesworth, S. E.; Lennon, D. P.; Caplan, A. I. In Vitro Differentiation of Bone and Hypertrophic Cartilage from Periosteal-Derived Cells. *Exp. Cell Res.* **1991**, *195* (2), 492–503.
- (9) Koga, H.; Muneta, T.; Nagase, T.; Nimura, A.; Ju, Y.-J.; Mochizuki, T.; Sekiya, I. Comparison of Mesenchymal Tissues-Derived Stem Cells for in Vivo Chondrogenesis: Suitable Conditions for Cell Therapy of Cartilage Defects in Rabbit. *Cell Tissue Res.* **2008**, *333* (2), 207–215.
- (10) Maxson, S.; Lopez, E. a.; Yoo, D.; Danilkovitch-Miagkova, A.; LeRoux, M. a. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1* (2), 142–149.
- (11) Chamberlain, G.; Fox, J.; Ashton, B.; Middleton, J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* **2007**, *25* (11), 2739–2749.
- (12) Phinney, D. G.; Prockop, D. J. Concise Review: Mesenchymal Stem/multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair--Current Views. *Stem Cells* **2007**, *25* (11), 2896–2902.
- (13) Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. a.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **1999**, *284* (April), 143–147.
- (14) Wakitani, S.; Saito, T.; Caplan, A. I. Myogenic Cells Derived from Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Exposed to 5-Azacytidine. *Muscle Nerve* **1995**, *18* (12), 1417–1426.
- (15) Woodbury, D.; Schwarz, E. J.; Prockop, D. J.; Black, I. B. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons. *J. Neurosci. Res.* **2000**, *61* (4), 364–

370.

- (16) Schwartz, R. E.; Reyes, M.; Koodie, L.; Jiang, Y.; Blackstad, M.; Lund, T.; Lenvik, T.; Johnson, S.; Hu, W.-S.; Verfaillie, C. M. Multipotent Adult Progenitor Cells from Bone Marrow Differentiate into Functional Hepatocyte-like Cells. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109* (10), 1291–1302.
- (17) Uccelli, A.; Moretta, L.; Pistoia, V. Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8* (9), 726–736.
- (18) Furuhata, Y.; Yoshitomi, T.; Kikuchi, Y.; Sakao, M.; Yoshimoto, K. Osteogenic Lineage Commitment of Adipose-Derived Stem Cells Is Predetermined by Three-Dimensional Cell Accumulation on Micropatterned Surface. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (11), 9339–9347.
- (19) Furuhata, Y.; Kikuchi, Y.; Tomita, S.; Yoshimoto, K. Small Spheroids of Adipose-Derived Stem Cells with Time-Dependent Enhancement of IL-8 and VEGF-A Secretion. *Genes Cells* **2016**, *21* (12), 1380–1386.
- (20) McBeath, R.; Pirone, D. M.; Nelson, C. M.; Bhadriraju, K.; Chen, C. S. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Dev. Cell* **2004**, *6* (4), 483–495.
- (21) Peng, R.; Yao, X.; Cao, B.; Tang, J.; Ding, J. The Effect of Culture Conditions on the Adipogenic and Osteogenic Inductions of Mesenchymal Stem Cells on Micropatterned Surfaces. *Biomaterials* **2012**, *33* (26), 6008–6019.
- (22) Song, W.; Kawazoe, N.; Chen, G. Dependence of Spreading and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Micropatterned Surface Area. *J. Nanomater.* **2011**, *2011*, 1–9.
- (23) Kilian, K. A.; Bugarija, B.; Lahn, B. T.; Mrksich, M. Geometric Cues for Directing the

- Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (11), 4872–4877.
- (24) Discher, D. E.; Mooney, D. J.; Zandstra, P. W. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science* **2009**, *324* (5935), 1673–1677.
- (25) Shukla, A.; Slater, J. H.; Culver, J. C.; Dickinson, M. E.; West, J. L. Biomimetic Surface Patterning Promotes Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (34), 21883–21892.
- (26) Peng, R.; Yao, X.; Ding, J. Effect of Cell Anisotropy on Differentiation of Stem Cells on Micropatterned Surfaces through the Controlled Single Cell Adhesion. *Biomaterials* **2011**, *32* (32), 8048–8057.
- (27) Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **2006**, *126* (4), 677–689.
- (28) Yim, E. K. F.; Pang, S. W.; Leong, K. W. Synthetic Nanostructures Inducing Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Neuronal Lineage. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313* (9), 1820–1829.
- (29) Rustad, K. C.; Wong, V. W.; Sorkin, M.; Glotzbach, J. P.; Major, M. R.; Rajadas, J.; Longaker, M. T.; Gurtner, G. C. Enhancement of Mesenchymal Stem Cell Angiogenic Capacity and Stemness by a Biomimetic Hydrogel Scaffold. *Biomaterials* **2012**, *33* (1), 80–90.
- (30) Wang, W.; Itaka, K.; Ohba, S.; Nishiyama, N.; Chung, U. L.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. 3D Spheroid Culture System on Micropatterned Substrates for Improved Differentiation Efficiency of Multipotent Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials* **2009**, *30* (14), 2705–2715.
- (31) Zhang, S.; Liu, P.; Chen, L.; Wang, Y.; Wang, Z.; Zhang, B. The Effects of Spheroid

- Formation of Adipose-Derived Stem Cells in a Microgravity Bioreactor on Stemness Properties and Therapeutic Potential. *Biomaterials* **2015**, *41*, 15–25.
- (32) Potapova, I. A.; Gaudette, G. R.; Brink, P. R.; Robinson, R. B.; Rosen, M. R.; Cohen, I. S.; Doronin, S. V. Mesenchymal Stem Cells Support Migration, Extracellular Matrix Invasion, Proliferation, and Survival of Endothelial Cells in Vitro. *Stem Cells* **2007**, *25* (7), 1761–1768.
- (33) Yoshimoto, K.; Ichino, M.; Nagasaki, Y. Inverted Pattern Formation of Cell Microarrays on Poly(ethylene Glycol) (PEG) Gel Patterned Surface and Construction of Hepatocyte Spheroids on Unmodified PEG Gel Microdomains. *Lab Chip* **2009**, *9* (9), 1286.
- (34) Kojima, R.; Yoshimoto, K.; Takahashi, E.; Ichino, M.; Miyoshi, H.; Nagasaki, Y. Spheroid Array of Fetal Mouse Liver Cells Constructed on a PEG-Gel Micropatterned Surface: Upregulation of Hepatic Functions by Co-Culture with Nonparenchymal Liver Cells. *Lab Chip* **2009**, *9* (14), 1991.
- (35) Ikeda, Y.; Jomura, T.; Horiuchi, U.; Saeki, J.; Yoshimoto, K.; Ikeya, T.; Nagasaki, Y. Long-Term Survival and Functional Maintenance of Hepatocytes by Using a Microfabricated Cell Array. *Colloids Surf., B* **2012**, *97*, 97–100.
- (36) Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T. L. Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13*, 134.
- (37) Hirschhaeuser, F.; Menne, H.; Dittfeld, C.; West, J.; Mueller-Klieser, W.; Kunz-Schughart, L. A. Multicellular Tumor Spheroids: An Underestimated Tool Is Catching up Again. *J. Biotechnol.* **2010**, *148* (1), 3–15.
- (38) Yang, D. C.; Yang, M. H.; Tsai, C. C.; Huang, T. F.; Chen, Y. H.; Hung, S. C. Hypoxia Inhibits Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells through Direct Regulation of

- RUNX2 by TWIST. *PLoS One* **2011**, 6 (9), e23965.
- (39) Wagegg, M.; Gaber, T.; Lohanatha, F. L.; Hahne, M.; Strehl, C.; Fangradt, M.; Tran, C. L.; Schönbeck, K.; Hoff, P.; Ode, A.; Perka, C.; Duda, G. N.; Buttgereit, F. Hypoxia Promotes Osteogenesis but Suppresses Adipogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in a Hypoxia-Inducible Factor-1 Dependent Manner. *PLoS One* **2012**, 7 (9), e46483.
- (40) Martin-Rendon, E.; Hale, S.; Ryan, D.; Baban, D.; Forde, S.; Roubelakis, M.; Sweeney, D.; Moukayed, M.; Harris, A.; Davies, K.; Watt, S. Transcriptional Profiling of Human Cord Blood CD133+ and Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Response to Hypoxia. *Stem Cells* **2007**, 25 (4), 1003–1012.
- (41) Ejtehadifar, M.; Shamsasenjan, K.; Movassaghpour, A.; Akbarzadehlaleh, P.; Dehdilani, N.; Abbasi, P.; Molaeipour, Z.; Saleh, M. The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Adv. Pharm. Bull.* **2015**, 5 (2), 141–149.
- (42) Gustincich, S.; Schneider, C. Serum Deprivation Response Gene Is Induced by Serum Starvation but Not by Contact Inhibition. *Cell Growth Differ.* **1993**, 4 (9), 753–760.
- (43) 菊池有夏. 微小三次元培養環境における脂肪幹細胞の分化に関する研究. 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系修士論文 **2013**.
- (44) Fukuda, J.; Khademhosseini, A.; Yeo, Y.; Yang, X.; Yeh, J.; Eng, G.; Blumling, J.; Wang, C. F.; Kohane, D. S.; Langer, R. Micromolding of Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel for Spheroid Microarray and Co-Cultures. *Biomaterials* **2006**, 27 (30), 5259–5267.
- (45) Cheng, N. C.; Wang, S.; Young, T. H. The Influence of Spheroid Formation of Human Adipose-Derived Stem Cells on Chitosan Films on Stemness and Differentiation Capabilities. *Biomaterials* **2012**, 33 (6), 1748–1758.

- (46) Sgambato, A.; Russo, L.; Montesi, M.; Panseri, S.; Marcacci, M.; Caravà, E.; Raspanti, M.; Cipolla, L. Different Sialoside Epitopes on Collagen Film Surfaces Direct Mesenchymal Stem Cell Fate. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (24), 14952–14957.
- (47) Ghosh, S.; Dean, A.; Walter, M.; Bao, Y.; Hu, Y.; Ruan, J.; Li, R. Cell Density-Dependent Transcriptional Activation of Endocrine-Related Genes in Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316* (13), 2087–2098.
- (48) Frith, J.; Genever, P. Transcriptional Control of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Transfus. Med. Hemother.* **2008**, *35* (3), 216–227.
- (49) Harada, H.; Tagashira, S.; Fujiwara, M.; Ogawa, S.; Katsumata, T.; Yamaguchi, A.; Komori, T.; Nakatsuka, M. Cbfa1 Isoforms Exert Functional Differences in Osteoblast Differentiation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (11), 6972–6978.
- (50) Wu, Z.; Rosen, E. D.; Brun, R.; Hauser, S.; Adelmant, G.; Troy, A. E.; McKeon, C.; Darlington, G. J.; Spiegelman, B. M. Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity. *Mol. Cell* **1999**, *3* (2), 151–158.
- (51) 坂尾美帆. マイクロパタン培養法を用いる脂肪幹細胞の分化：三次元培養環境が脂肪細胞分化に与える影響. 東京大学生命・認知科学科基礎生命科学分科卒業論文 **2014**.
- (52) Wei, X.; Yang, X.; Han, Z.; Qu, F.; Shao, L.; Shi, Y. Mesenchymal Stem Cells: A New Trend for Cell Therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, *34* (6), 747–754.
- (53) Bartosh, T. J.; Ylöstalo, J. H.; Mohammadipoor, A.; Bazhanov, N.; Coble, K.; Claypool, K.; Lee, R. H.; Choi, H.; Prockop, D. J. Aggregation of Human Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) into 3D Spheroids Enhances Their Antiinflammatory Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (31), 13724–13729.

- (54) Bao, M.; Xie, J.; Piruska, A.; Huck, W. T. S. 3D Microniches Reveal the Importance of Cell Size and Shape. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 1962.
- (55) Furuhata, Y.; Nihongaki, Y.; Sato, M.; Yoshimoto, K. Control of Adipogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells via Endogenous Gene Activation Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6* (12), 2191–2197.
- (56) Stemmer, M.; Thumberger, T.; del Sol Keyer, M.; Wittbrodt, J.; Mateo, J. L.; Henrich, T. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* **2015**, *10* (4), e0124633.
- (57) Tontonoz, P.; Hu, E.; Spiegelman, B. M. Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR γ 2, a Lipid-Activated Transcription Factor. *Cell* **1994**, *79* (7), 1147–1156.
- (58) Ahfeldt, T.; Schinzel, R. T.; Lee, Y.-K.; Hendrickson, D.; Kaplan, A.; Lum, D. H.; Camahort, R.; Xia, F.; Shay, J.; Rhee, E. P.; Clish, C. B.; Deo, R. C.; Shen, T.; Lau, F. H.; Cowley, A.; Mowrer, G.; Al-Siddiqi, H.; Nahrendorf, M.; Musunuru, K.; Gerszten, R. E.; Rinn, J. L.; Cowan, C. A. Programming Human Pluripotent Stem Cells into White and Brown Adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14* (2), 209–219.
- (59) Qian, S.-W.; Li, X.; Zhang, Y.-Y.; Huang, H.-Y.; Liu, Y.; Sun, X.; Tang, Q.-Q. Characterization of Adipocyte Differentiation from Human Mesenchymal Stem Cells in Bone Marrow. *BMC Dev. Biol.* **2010**, *10* (1), 47.
- (60) Muruganandan, S.; Roman, A. A.; Sinal, C. J. Adipocyte Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Cross Talk with the Osteoblastogenic Program. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (2), 236–253.
- (61) Maeder, M. L.; Linder, S. J.; Cascio, V. M.; Fu, Y.; Ho, Q. H.; Joung, J. K. CRISPR RNA-Guided Activation of Endogenous Human Genes. *Nat. Methods* **2013**, *10* (10), 977–979.

- (62) Perez-Pinera, P.; Kocak, D. D.; Vockley, C. M.; Adler, A. F.; Kabadi, A. M.; Polstein, L. R.; Thakore, P. I.; Glass, K. A.; Ousterout, D. G.; Leong, K. W.; Guilak, F.; Crawford, G. E.; Reddy, T. E.; Gersbach, C. A. RNA-Guided Gene Activation by CRISPR-Cas9-Based Transcription Factors. *Nat. Methods* **2013**, *10* (10), 973–976.
- (63) Konermann, S.; Brigham, M. D.; Trevino, A. E.; Joung, J.; Abudayyeh, O. O.; Barcena, C.; Hsu, P. D.; Habib, N.; Gootenberg, J. S.; Nishimasu, H.; Nureki, O.; Zhang, F. Genome-Scale Transcriptional Activation by an Engineered CRISPR-Cas9 Complex. *Nature* **2014**, *517* (7536), 583–588.
- (64) Chavez, A.; Scheiman, J.; Vora, S.; Pruitt, B. W.; Tuttle, M.; P R Iyer, E.; Lin, S.; Kiani, S.; Guzman, C. D.; Wiegand, D. J.; Ter-Ovanesyan, D.; Braff, J. L.; Davidsohn, N.; Housden, B. E.; Perrimon, N.; Weiss, R.; Aach, J.; Collins, J. J.; Church, G. M. Highly Efficient Cas9-Mediated Transcriptional Programming. *Nat. Methods* **2015**, *12* (4), 326–328.
- (65) Tanenbaum, M. E.; Gilbert, L. A.; Qi, L. S.; Weissman, J. S.; Vale, R. D. A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging. *Cell* **2014**, *159* (3), 635–646.
- (66) Chavez, A.; Tuttle, M.; Pruitt, B. W.; Ewen-Campen, B.; Chari, R.; Ter-Ovanesyan, D.; Haque, S. J.; Cecchi, R. J.; Kowal, E. J. K.; Buchthal, J.; Housden, B. E.; Perrimon, N.; Collins, J. J.; Church, G. Comparison of Cas9 Activators in Multiple Species. *Nat. Methods* **2016**, *13* (7), 563–567.
- (67) Fu, Y.; Foden, J. A.; Khayter, C.; Maeder, M. L.; Reyon, D.; Joung, J. K.; Sander, J. D. High-Frequency off-Target Mutagenesis Induced by CRISPR-Cas Nucleases in Human Cells. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31* (9), 822–826.
- (68) Oishi, Y.; Manabe, I.; Tobe, K.; Tsushima, K.; Shindo, T.; Fujiu, K.; Nishimura, G.;

- Maemura, K.; Yamauchi, T.; Kubota, N.; Suzuki, R.; Kitamura, T.; Akira, S.; Kadowaki, T.; Nagai, R. Krüppel-like Transcription Factor KLF5 Is a Key Regulator of Adipocyte Differentiation. *Cell Metab.* **2005**, *1* (1), 27–39.
- (69) Harms, M.; Seale, P. Brown and Beige Fat: Development, Function and Therapeutic Potential. *Nat. Med.* **2013**, *19* (10), 1252–1263.
- (70) Giralt, M.; Villarroya, F. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology* **2013**, *154* (9), 2992–3000.
- (71) Seale, P.; Bjork, B.; Yang, W.; Kajimura, S.; Chin, S.; Kuang, S.; Scimè, A.; Devarakonda, S.; Conroe, H. M.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Rudnicki, M. A.; Beier, D. R.; Spiegelman, B. M. PRDM16 Controls a Brown Fat/skeletal Muscle Switch. *Nature* **2008**, *454* (7207), 961–967.
- (72) Kajimura, S.; Seale, P.; Kubota, K.; Lunsford, E.; Frangioni, J. V.; Gygi, S. P.; Spiegelman, B. M. Initiation of Myoblast to Brown Fat Switch by a PRDM16–C/EBP- β Transcriptional Complex. *Nature* **2009**, *460* (7259), 1154–1158.
- (73) Wu, J.; Boström, P.; Sparks, L. M.; Ye, L.; Choi, J. H.; Giang, A.-H.; Khandekar, M.; Virtanen, K. A.; Nuutila, P.; Schaart, G.; Huang, K.; Tu, H.; van Marken Lichtenbelt, W. D.; Hoeks, J.; Enerbäck, S.; Schrauwen, P.; Spiegelman, B. M. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* **2012**, *150* (2), 366–376.
- (74) Scott, M. A.; Nguyen, V. T.; Levi, B.; James, A. W. Current Methods of Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **2011**, *20* (10), 1793–1804.
- (75) Walkey, C. J.; Spiegelman, B. M. A Functional Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Ligand-Binding Domain Is Not Required for Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (36), 24290–24294.