

論文内容の要旨

論文題目 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

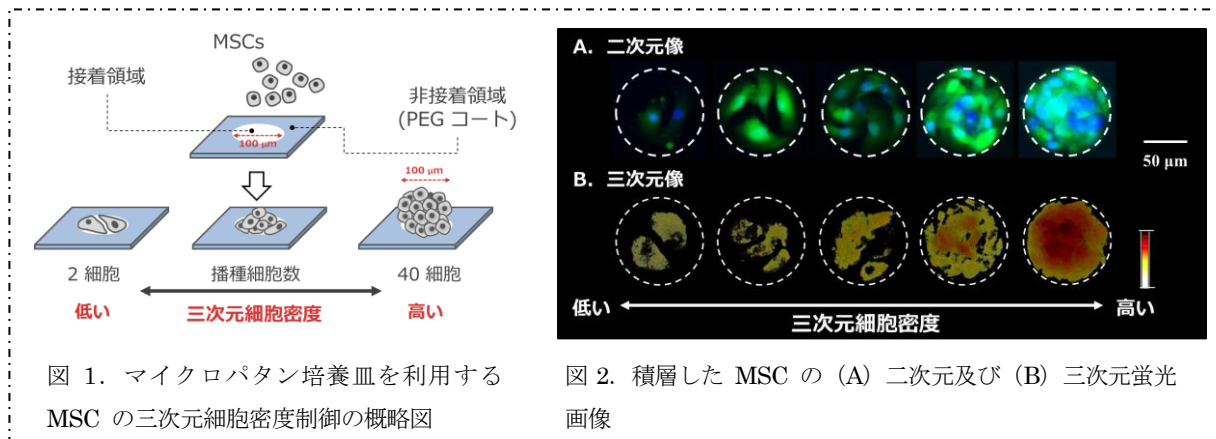
氏 名 古旗祐一

【緒言】間葉系幹細胞（MSC）は骨髄、脂肪、胎盤などの様々な組織から採取可能な体性幹細胞でありながら、高い多分化能と自己複製能を併せ持つ。そのため iPS 細胞や ES 細胞と比べて腫瘍化の危険性が低い、倫理的問題がないといった利点を有しており、細胞治療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、増殖因子や細胞外マトリクスなどの細胞外微小環境の変化と細胞内遺伝子ネットワークが連動して制御されている。こうした細胞内外の環境と分化指向性の関係を理解し、生体内における分化応答を生体外で再現できれば、幹細胞研究や再生医療に大きく貢献できると考えられる。

MSC は骨芽や脂肪、軟骨や神経といった多様な細胞に分化可能であるが、中でも骨芽細胞及び脂肪細胞には非常に効率的に分化する。さらにこの骨芽-脂肪分化軸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。本博士論文において、私は骨芽-脂肪分化軸に焦点を当て、細胞外微小環境の構築及び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た。その結果、第 2 章では「三次元細胞密度変化が MSC の骨芽分化誘導を運命づけること」を明らかとし、第 3 章では「CRISPR-Cas9 システムを用いる遺伝子制御が MSC の複数種の脂肪細胞への分化を効率よく誘導可能であること」を見出した。

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

【研究背景】MSC の分化指向性を制御する要因として、増殖因子や細胞外マトリクスといった生物学的微小環境に加えて近年注目を集めているのが、培養基板の弾性や細胞の大きさ、密度といった物理的な微小環境である。例えば脳や筋肉、骨などの弾性を模倣した培養基板は、MSC における各組織細胞への分化を促進する¹。こうした微小環境の中でも二次元培養系における細胞密度は、MSC の分化指向性に大きな影響を及ぼすことが知られている。MSC は低細胞密度では骨芽細胞へ、高細胞密度では脂肪細胞への分化指向性を示す²。これまでに多くの研究グループが二次元細胞密度の影響を評価している。一方、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った。そこで私は三次元細胞密度評価系の構築及び MSC 骨芽-



脂肪分化軸に対する三次元密度効果の解明を試みた。

【結果】三次元細胞密度評価系の構築に当たり、大きさの揃った細胞凝集塊を作製可能なマイクロパタン培養皿に着目した。マイクロパタン培養皿は細胞接着性の領域と非接着性領域の2つから構成されており、細胞は白い円形の領域に接着する(図1)。本培養法では円形部分の直径を小さく設定することで、通常の三次元培養に付随する酸素濃度の低下や老廃物の蓄積といった副産物的要因を排除でき、三次元培養の効果のみを評価可能である³。私は本培養基板上に細胞数を変えてMSCを播くことで蓄積レベルの異なる細胞を作製し、三次元細胞密度評価系とした(図1)。

マイクロパタン培養皿に1ドメイン当たり2から40細胞まで段階的に細胞数を変えてMSCを播種し、蛍光染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、1ドメイン当たり4細胞までは、MSCは単層状の構造を形成していた(図2)。一方で8細胞以上の場合、積層している様子が観察され、播種細胞数の増加に伴って、蓄積レベルが上昇していた。さらに細胞凝集体中の一細胞の体積を推算したところ、蓄積に伴って細胞が小さくなっており、三次元細胞密度が増加していることが明らかとなった。続いてMSCの分化能に及ぼす影響を評価するため、リアルタイムPCRを用いて骨芽及び脂肪分化マーカーの発現量を測定した。その結果分化誘導因子を添加していないにも関わらず、三次元細胞密度の増加に伴って骨芽分化マーカーの発現量が大きく上昇した。一方で脂肪分化マーカーの発現量は変化しない、もしくは顕著に減少するという興味深い挙動を示した。つまり三次元細胞密度が高いMSCは分化誘導前から骨芽分化に有利な状態にあることが示唆された。そこで最大三次元密度のサンプルにおいて骨芽及び脂肪分化を誘導したところ、三次元細胞密度は脂肪分化には影響しないが、骨芽分化を劇的に促進させ、分化に必要な時間を大幅に短縮させることが明らかとなった(図3)。

【結論】本研究では、マイクロパタン培養を応用して三次元細胞密度評価系を構築し、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(図4)。本知見は二次元培養系における細胞密度依存的な分化挙動とは正反対であり、MSCの分化を方向付ける要因として三次元細胞密度の重要性を示すものである^{3,4}。さらに高密度な三次

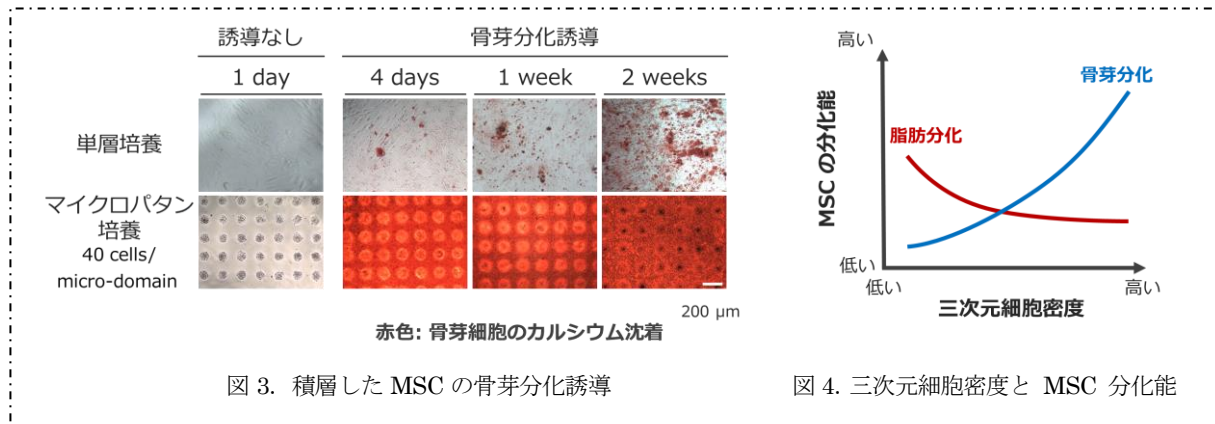


図 3. 積層した MSC の骨芽分化誘導

図 4. 三次元細胞密度と MSC 分化能

元培養環境に供することで、新規液性因子を添加することなく MSC の効率的かつ迅速な骨芽分化を達成した。

CRISPR-Cas9 システムを用いる遺伝子発現制御

【研究背景】第 2 章において、MSC の脂肪分化は三次元細胞密度を変化させても制御することができなかった。分化応答は細胞内遺伝子ネットワークを経由して引き起こされるため、仮に内在性脂肪分化関連遺伝子の転写を選択的に活性化することができれば、MSC の脂肪分化制御が可能であると考えた。本目的を達成するため、近年開発された CRISPR-Cas9 システムに着目した。本システム由来の dCas9 タンパク質は任意の DNA 配列に結合可能であり、転写活性化因子を融合することで内在遺伝子の転写を選択的に誘導できる。既に一遺伝子の機能解析から網羅的な遺伝子スクリーニングに至るまで幅広く利用されており、線維芽細胞の筋分化や iPS 細胞の神経分化といった分化制御への応用も報告され始めている⁵。本システムでは従来の外来遺伝子導入による分化制御では困難であった、内在遺伝子のエピジェネティックな制御や複数バリエーションの同時発現誘導が可能であり、より生体内に近い分化誘導が可能だとされている。そこで私は dCas9 タンパク質を用いて、MSC における脂肪細胞特異的な内在遺伝子の発現誘導及び脂肪分化制御を試みた。

【結果】内在遺伝子転写活性化システムとして、1 つの dCas9 タンパク質に対して複数種類の転写活性化因子を誘導することで強力な転写活性化が可能な synergistic activation mediator (SAM) システムを用いることとした (図 5)。まずレンチウイルスベクターを利用して SAM システムを MSC に導入し、脂肪分化制御因子である *PPARG*、*CEBPA* 及び *KLF5* の発現制御を試みた。その結果、どの遺伝子についても高効率な内在遺伝子発現誘導が観察された。続いて遺伝子転写活性化による MSC の脂肪分化誘導を試みたところ、*PPARG* または *CEBPA* の発現を誘導した場合、大きな油滴を産生する脂肪細胞が多数観察された。さらに脂肪細胞マーカーの発現解析により、誘導された脂肪細胞は白色脂肪細胞であることが示唆された。一般的に、MSC は単胞性の油滴を産生してエネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞、さらに多胞性の油滴を産生して熱産生を

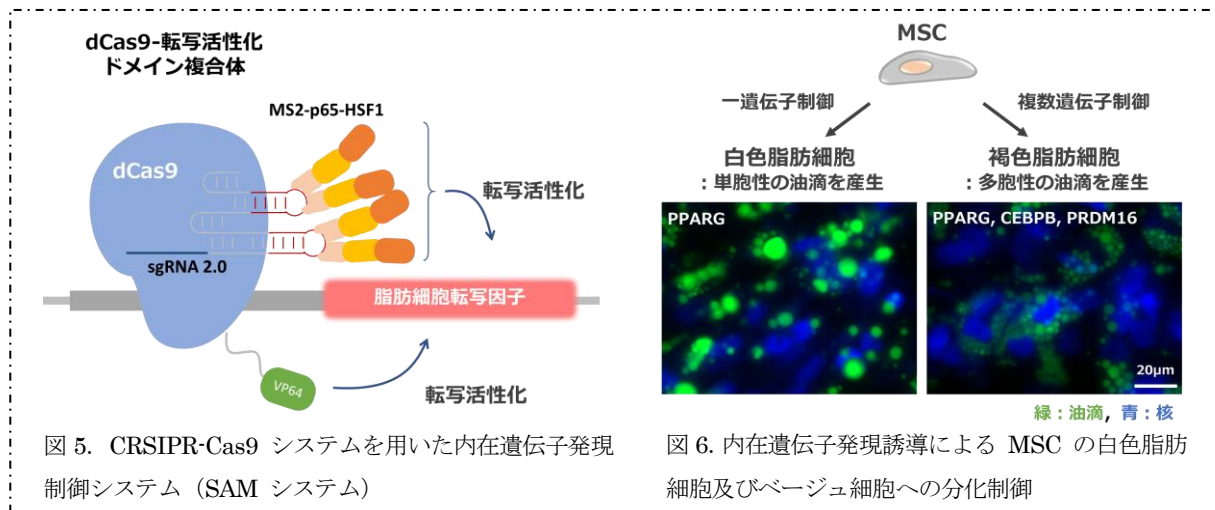


図 5. CRISPR-Cas9 システムを用いた内在遺伝子発現制御システム (SAM システム)

図 6. 内在遺伝子発現誘導による MSC の白色脂肪細胞及びベージュ細胞への分化制御

担うベージュ脂肪細胞に分化可能であることが知られている⁶。特にベージュ脂肪細胞は熱産生を担うため、生体の代謝バランスを整えるのに必須であり、効率的な分化誘導方法の確立が望まれている。そこで私はベージュ脂肪細胞を特徴づける転写因子である *PPARG*, *CEBPB* 及び *PRDM16* の同時発現誘導による分化誘導を試みた。その結果 MSC における 3 遺伝子同時発現誘導に成功し、さらに多胞性の小さな油滴を産生するベージュ脂肪様細胞の分化誘導に成功した (図 6)。さらに本細胞はベージュ細胞のマーカーである *TMEM26* 及び *SHOX2* を強く発現していた。

【結論】本研究では内在遺伝子の発現誘導により、MSC から白色脂肪様細胞とベージュ脂肪様細胞を誘導することに成功した。本知見は多分化能を持つ MSC の分化制御において内在遺伝子制御の有効性を示すものであり、脂肪分化メカニズムの解明や MSC の臨床応用への貢献が期待できる⁷。

【総括】本研究では細胞外微小環境における三次元細胞密度の効果を検証し、三次元細胞密度の増加に伴い 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にした。さらに CRISPR-Cas9 システムを利用することで、MSC の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 の分化応答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。

【参考文献】

- (1) Engler, A. J., et al., (2006) *Cell*, 126, 677–689.
- (2) McBeath, R., et al., (2004) *Dev. Cell*, 6, 483–495.
- (3) **Furuhata, Y.**, et al., (2016) *Genes Cells*, 21, 1380–1386.
- (4) **Furuhata, Y.**, et al., (2017) *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9, 9339–9347.
- (5) Dominguez, A. A., et al., (2015) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 17, 5–15.
- (6) Giralt, M., et al., (2013) *Endocrinology*, 154, 2992–3000.
- (7) **Furuhata, Y.**, et al., (2017) *ACS Synth. Biol.*, in press.