



Genome-wide screening by cDNA microarray of genes associated with matrix mineralization by human mesenchymal stem cells in vitro

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 土井, 光人 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/10271/1270 |

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

| | | | |
|-------|--|---------|-------------|
| 学位記番号 | 医博第 417号 | 学位授与年月日 | 平成16年 3月23日 |
| 氏 名 | 土 井 光 人 | | |
| 論文題目 | Genome-wide screening by cDNA microarray of genes associated with matrix mineralization by human mesenchymal stem cells <i>in vitro</i> (cDNA マイクロアレイを用いた細胞培養系におけるヒト間葉系幹細胞の基質石灰化に関与する遺伝子の網羅的発現解析) | | |

論文題目

Genome-wide screening by cDNA microarray of genes associated with matrix mineralization by human mesenchymal stem cells *in vitro*

(cDNA マイクロアレイを用いた細胞培養系におけるヒト間葉系幹細胞の基質石灰化に関する遺伝子の網羅的発現解析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ヒト間葉系幹細胞から骨芽細胞へ分化する過程で発現が変化する遺伝子をみつけることにより、新たな骨代謝に関与する分子群と経路を解明することは、骨代謝性疾患の診断および再生医療を含めたその治療の一助となる。本研究の目的はわれわれが開発した網羅的な解析が可能なヒト cDNA マイクロアレイを用いることにより、正常ヒト間葉系幹細胞から成熟骨芽細胞への分化および石灰化関連遺伝子を同定することである。

[材料ならびに方法]

骨髄由来の正常ヒト間葉系幹細胞を、培養維持液に何も添加しない系 (Control 群)、デキサメタゾン、アスコルビン酸、グリセロフォスフェートのすべてを添加した系 (OS 群)、デキサメタゾンのみ添加した系 (Dex 群)、アスコルビン酸とグリセロフォスフェートを添加した系 (AsAP/bGP 群)、の 4 つの系で培養した。培養 3 日、15 日、27 日において細胞の分化能を見るためにアルカリフォスファターゼ染色、アリザリンレッド染色を行い、また同じ日に RNA を抽出した。その RNA を逆転写しつつ蛍光標識し、ターゲット DNA が 4608 個、左右に重複してスポットされたスライドをハイブリダイゼーションし、合計 23,040 遺伝子の発現を網羅的に解析した。分化誘導前の Control 群、培養 3 日を Cy3 で標識し、対照となるその他の検体 (11 種類) を励起波長の異なる蛍光物質である Cy5 で標識し、同一スライド上で競合ハイブリダイゼーションすることにより、両者の蛍光強度の量比を算出した。発現強度の比が 2 倍以上と 2 分の 1 倍以下をそれぞれ発現増大および減少と定義し、それぞれに区分される遺伝子群を同定した。

[結果]

培養 15 日、27 日においてすべての系でアルカリフォスファターゼ陽性であったが、アリザリンレッド染色で石灰化が認められたものは培養 27 日の OS 群のみであった。この結果から、石灰化に関与する遺伝子の検索には OS 群 (培養 3 日、15 日、27 日) を用いることとした。11 種類すべての系の組み合わせのスライドでシグナル強度が条件を満たしたスポットのうち、OS 群で発現が増加していたのは 465 遺伝子であった。それらの遺伝子のうち、Control 群でも発現が増加していた 328 遺伝子、Dex 群でも発現が増加していた 309 遺伝子、AsAP/bGP 群でも発現が増加していた 191 遺伝子を 3 つの添加物が個々に与える影響を少なくするために除外した。残った 55 遺伝子を OS 群でのみ特異的に発現が増加していたとして同定した。そのうち 20 個は EST (mRNA に由来する cDNA クローンの断片配列) とよばれる未知遺伝子であった。同様に特異的に発現が減少していた遺伝子数は 82 個であった。既に骨代謝への関与が報告されているオステオプロテグリン (OPG) や骨代謝への関

与が未知であるメタロチオネイン 2a (MT2a)、S100 カルシウム結合蛋白 A10、Inhibitor of DNA binding 4 (Id4) などの既知の遺伝子につきマイクロアレイの結果を半定量的 RT-PCR 法により確認した。

[考察]

近年、特異的に発現の変動する遺伝子群を抽出および同定する新たな手法としてマイクロアレイ法が開発されつつある。本研究で用いたヒト cDNA マイクロアレイにより同定された遺伝子のうち、発現が増加していた MT2a は銅や亜鉛などと結合する蛋白であるが、骨芽細胞の分化の段階で osterix のような zinc-finger を有する転写因子が関与していることと、亜鉛が骨芽細胞の蛋白合成の増進を介して細胞核 DNA 合成増大をもたらすことが知られており、分化と増殖を促進していることと関係していると考えた。OPG は破骨細胞の分化、作用を抑制し骨量の増加に関与するという事がマウスを用いた実験で証明されている。また OPG 遺伝子欠失マウスの表現形態は骨量減少を呈するばかりでなく、大血管や腎動脈に異所性石灰化を起こしていたという事が報告されている。同様に発現が増加していた S100 カルシウム結合蛋白 A10 やカルパイン 2 はこれまで骨芽細胞や骨代謝への関与の報告はないが、細胞外基質のカルシウムと無機物の結合を促進すると考えられており、骨芽細胞においても類似の機能を呈していると予測される。発現が減少していた Id4 はヘリックス・ループ・ヘリックスを有する蛋白と結合することが知られており、発現が減少することでヒト間葉系幹細胞の分化を促進することに作用する転写活性を活性化していると考えられた。石灰化の機構において、その現象を促進する遺伝子が発現増加するばかりでなく、抑制に働く遺伝子の発現が減少する事でさらにその現象を促進していると考えられた。最後に、同定された遺伝子群の中には機能未知の遺伝子や全長の cDNA が取られていないものもあり、今後はこのリストの中の遺伝子とその発現される蛋白の機能についての解析をすすめ、それぞれの遺伝子による骨代謝への関与を明らかにしていく必要がある。

[結論]

われわれが開発したヒト cDNA マイクロアレイを用いることにより、骨芽細胞への分化と石灰化という現象における数千の遺伝子発現の変化を網羅的、体系的にそして容易にとらえることが可能である。本研究において抽出された遺伝子のうち骨代謝への関与がこれまでに報告のない Id4 をはじめとする遺伝子や EST とよばれる未知遺伝子群は、骨芽細胞への分化および石灰化を規定するものであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒト間葉系幹細胞から骨芽細胞へ分化する過程で発現が変化する遺伝子をみつけることにより、骨代謝に関与する新たな分子群とその経路を解明することは、骨代謝性疾患の診断および再生医療を含めたその治療の一助となる。本研究は申請者等が開発した網羅的な解析が可能なヒト cDNA マイクロアレイを用いることにより、正常ヒト間葉系幹細胞から、成熟骨芽細胞への分化および石灰化に寄与する遺伝子を網羅的に解析したものである。

骨髄由来の正常ヒト間葉系幹細胞を、Clontech 社の培養維持液に何も添加しない系 (Control 群)、デキサメタゾン、アスコルビン酸、グリセロフォスフェートのすべてを添加した系 (OS 群)、デキサメタゾンのみ添加した系 (Dex 群)、アスコルビン酸とグリセロフォスフェートを添加した系 (AsAP/bGP 群)、の 4 つの系で培養した。培養 3 日、15 日、

27 日において細胞の分化能を見るためにアルカリフォスファターゼ染色、アリザリンレッド染色を行い、また同じ日に RNA を抽出した。その RNA を cDNA に逆転写し、同時に蛍光標識した。これを用いて、ターゲット DNA が 4608 個、左右に重複してスポットされたアマシヤムファルマシア製の Type VII ミラーズライド上にハイブリダイゼーションし、合計 23,040 遺伝子の発現を網羅的に解析した。分化誘導前の“Control 群、培養 3 日”を Cy3 で標識し、対照となるその他の検体 (11 種類) を励起波長の異なる蛍光物質である Cy5 で標識し、同一スライド上で競合ハイブリダイゼーションすることにより、両者の蛍光強度の量比を算出した。発現強度の比が 2 倍以上と 2 分の 1 倍以下をそれぞれ発現増大および減少と定義し、それぞれに区分される遺伝子群を同定した。

培養 15 日、27 日においてすべての系でアルカリフォスファターゼ陽性であったが、アリザリンレッド染色で石灰化が認められたものは培養 27 日の OS 群のみであった。この結果から、石灰化に関与する遺伝子の検索には OS 群 (培養 3 日、15 日、27 日) を用いることとした。11 種類すべての系の組み合わせのスライドでシグナル強度が条件を満たしたスポットのうち、OS 群で発現が増加していたのは 465 遺伝子であった。それらの遺伝子のうち、Control 群でも発現が増加していた 328 遺伝子、Dex 群でも発現が増加していた 309 遺伝子、AsAP/bGP 群でも発現が増加していた 191 遺伝子を 3 つの添加物が個々に与える影響を少なくするために除外した。残った 55 遺伝子を OS 群でのみ特異的に発現が増加していた遺伝子として同定した。そのうち 20 個は EST (mRNA に由来する cDNA クローン) の断片配列) とよばれる未知遺伝子であった。同様に特異的に発現が減少していた遺伝子数は 82 個であった。既に骨代謝への関与が報告されているオステオプロテグリン (OPG) や骨代謝への関与が未知であるメタロチオネイン 2a、S100 カルシウム結合蛋白 A10、Inhibitor of DNA binding 4 (Id4) などの既知の遺伝子につきマイクロアレイの結果を半定量的 RT-PCR 法により確認した。

本研究で用いたヒト cDNA マイクロアレイにより同定された遺伝子のうち、発現が増加していた MT2a は銅や亜鉛などと結合する蛋白であるが、骨芽細胞の分化の段階で osterix のような zinc-finger を有する転写因子が関与していることと、亜鉛が骨芽細胞の蛋白合成の亢進を介して細胞核 DNA 合成増大をもたらすことが知られており、分化と増殖を促進していることと関係していると考えられた。また、OPG は破骨細胞の分化や機能を抑制し骨量の増加に関与するという事がマウスを用いた実験で証明されている。同様に発現が増加していた S100 カルシウム結合蛋白 A10 やカルパイン 2 は、細胞外基質のカルシウムと無機物の結合を促進すると考えられており、骨芽細胞においても類似の機能を呈していると予測される。発現が減少していた Id4 はヘリックス・ループ・ヘリックスを有する蛋白と結合することが知られており、発現が減少することでヒト間葉系幹細胞の分化を促進することに作用する転写活性を活性化していると考えられた。また、同定された未知の遺伝子群についても、潜在的な骨代謝への関与が期待された。審査委員会では、申請者等が開発したヒト cDNA マイクロアレイを用いることにより、骨芽細胞への分化と石灰化という現象における数千の遺伝子発現の変化を網羅体系的に捉えたことを高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 石灰化の同定方法について
- 2) ヒト cDNA マイクロアレイ法の詳細について
- 3) ES 細胞から間葉系幹細胞までの分化について
- 4) 間葉系幹細胞からの細胞分化を規定するものは何か

- 5) 群の設定、及びサンプル採取時期設定の根拠について
- 6) メタロチオネイン 2a の機能について、本研究における意義は何か
- 7) 間葉系幹細胞から分化するさいに関与する転写因子と今回の研究で同定された蛋白との関係
- 8) 間葉系幹細胞における分化能と増殖能の関係
- 9) 石灰化と今回の研究で同定された蛋白との関係

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

| | | | |
|---------|----|---------|------------|
| 論文審査担当者 | 主査 | 佐藤 康 二 | |
| | 副査 | 堀 田 喜 裕 | 副査 三 浦 克 敏 |