

氏名	野村 優
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6149号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	DNA Methylation-Based Regulation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Chondrogenic Differentiation (ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨細胞分化に与える DNA メチル化の影響)
論文審査委員	上岡 寛 教授 池亀 美華 准教授 中野 敬介 准教授

学位論文内容の要旨

【目的】 幹細胞は、組織工学または再生医療に必要不可欠な存在として広く研究され、組織発生や再生における役割が明らかにされてきた。中でも、間葉系幹細胞は、骨や軟骨、脂肪、筋、神経など様々な組織に分化することが可能なことから、多くの臓器再生に応用され、すでに整形外科領域において、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cells; BMSCs) を軟骨創傷部や欠損部位に移植する幹細胞治療が実施されている。しかし、BMSCs の未分化性維持機構や分化制御メカニズムに関して未だ不明な点が多い。

また、幹細胞は、環境要因にさらされることでエピジェネティックなメカニズムを通してゲノムの状態が変化し、様々な細胞へと分化することが知られている。このエピジェネティックな変化には、DNA メチル化、ヒストン修飾、non-coding RNA などがある。特に、DNA メチル化は、DNA に長期間維持されるメモリであり、高等生物において正常な発生と細胞分化において極めて重要な役割を担っている。そしてこの DNA メチル化には、DNA 複製の間に娘鎖に DNA メチル化様式を複製するために必要な DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) 1 と発生初期に DNA メチル化様式を形成する DNMT3A, 3B などがある。そこで我々は、BMSCs が軟骨細胞へと分化する過程において、DNMT family により制御される DNA のメチル化が深く関与しているのではないかと考えた。そこで本研究では、hBMSCs の軟骨細胞分化過程における DNMT family の役割の一部を明らかにした。

【材料と方法】

1. hBMSCsの軟骨細胞分化培養法とDNMTの発現パターン解析

ヒト BMSCs (hBMSCs) をマイクロマス培養法にて 21 日間培養し、軟骨細胞分化過程における DNMT family 遺伝子の発現パターンを定量性 RT-PCR 法にて評価した。

2. DNMT の過剰発現および発現抑制が軟骨細胞分化に与える影響の検討

DNMT3A および DNMT3B 過剰発現ベクターまたは、DNMT3A を標的とする siRNA を hBMSCs に遺伝子導入した。遺伝子導入 3 時間後、幹細胞関連遺伝子の発現を定量性 RT-PCR 法にて、また、遺伝子導入した hBMSCs をマイクロマス培養法で培養し、軟骨細胞分化関連遺伝子の発現量を定量性 RT-PCR 法にて評価した。また、組織切片を作製し、トルイジンブルー染色、COL II の免疫組織化学染色を行い、組織学的に評価した。

3. DNA メチル化阻害薬が hBMSCs の軟骨細胞分化に与える影響の検討

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

評価した。

4. 幹細胞マーカー遺伝子のプロモーター領域のメチル化の確認

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

【結果】

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

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

2. DNMT過剰発現および発現抑制が軟骨細胞分化に与える影響

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

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

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

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

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

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

【結論と考察】

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

論文審査結果の要旨

申請者は骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cells; BMSCs)が軟骨細胞へと分化する過程において、DNMT familyにより制御されるDNAのメチル化が生じることを示し、軟骨細胞分化に深く関与しているとの仮説を立て、培養細胞を用いたDNMT familyおよび軟骨関連因子の遺伝子発現系の解析を行い次の結果を報告した。

1. 軟骨細胞分化過程においてDNMT1の発現に差はなかったが、DNMT3AとDNMT3Bの発現は上昇した。
2. DNMT3A及びDNMT3Bを過剰発現させると軟骨細胞分化関連遺伝子のACAN, COL2A1, COL10A1の発現はDNMT3A及びDNMT3B共に上昇し、その分化誘導能はDNMT3Aの方が高かった。
3. DNMT3A及びDNMT3Bを強制発現させると幹細胞マーカーであるNANOG及びPOU5F1の発現は、有意に抑制された。また、NANOG及びPOU5F1のプロモーター領域はDNMT3A及びDNMT3Bを強制発現させることによりメチル化が亢進した。
4. hBMSCを外因性脱メチル化剤の5-AZAで処理した結果、DNMT3Aの発現量は有意に減少し、ACAN, COL2A1, COL10A1は発現抑制され、軟骨基質形成が顕著に抑制された。また、siRNAにてDNMT3Aを発現抑制した結果、ACAN, COL2A1, COL10A1は発現抑制され、軟骨基質形成も抑制された。

以上の結果からBMSCsの軟骨細胞への分化過程において、遺伝子発現が増加するDNMT3A及びDNMT3Bは、BMSCsの軟骨細胞分化を正に制御し、その効果はDNMT3Aの方が顕著であることを明らかにした。そのメカニズムの一つとして、DNMT3AやDNMT3Bは、NANOG, POU5F1遺伝子のプロモーター領域のメチル化を促進し遺伝子発現を抑制することで、BMSCsを未分化状態から解放している可能性が示唆された。

本論文はすでにCells Tissues Organsに受理(掲載)されており、国際的にも評価されている。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。