

Title	マウス骨髄間葉系幹細胞の骨系分化へのDNAメチル化の関与
Author(s)	蘆田, 俊二
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/49263">http://hdl.handle.net/11094/49263</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	あし だ しゅん じ 蘆 田 俊 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 2 1 9 1 1 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	マウス骨髄由来間葉系幹細胞の骨系分化への DNA メチル化の関与
論文審査委員	(主査) 教授 矢谷 博文 (副査) 教授 阪井 丘芳 講師 山田 聡 講師 佐藤 淳

### 論文内容の要旨

#### 【緒言】

近年、組織幹細胞を用いた再生医療の試みが盛んに行われるなか、骨髄に存在する間質細胞 (BMSC) は、多分化能を有する間葉系幹細胞源として注目され、その分化機構の解明に関心が集まっている。DNA とヒストン修飾によるエピジェネティクス機構は、DNA 塩基配列の変化なしに細胞世代を超えて継承される遺伝子発現調節機構である。最も基本的なエピジェネティクス機構の一つである DNA メチル化は幹細胞の分化決定因子の一つとして機能することがわかってきた。これまでの BMSC の分化機構の研究は、増殖分化因子などの細胞外来性シグナルを中心に進められてきたが、DNA メチル化という細胞内在性のプログラム機構に着目した研究報告はみあたらない。本研究の目的は、BMSC を骨系分化誘導した場合のゲノム DNA メチル化の変化を検索し、BMSC の骨系分化とエピジェネティックな機構の関与を検討することである。

#### 【実験方法】

成体 C57BL/6J マウスの大腿骨骨髄より分離培養した初代 BMSC を長期継代培養によって自然不死化させ、10 種類のクローン細胞 (clonal BMSC : cBMSC) を樹立した。このなかで多分化能 (骨系および脂肪系分化能) を有する 4 種類の細胞株 (cBMSC-2、-4、-7、-10) を骨系分化誘導培地で 21 日間培養し、分化誘導前後における骨関連遺伝子、osteocalcin (OCN)、osteopontin (OPN) の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。また、分化誘導前後の cBMSC-2、-4、-7、-10 について、これら骨関連遺伝子のプロモーター領域 (翻訳開始部位上流) CpG における DNA メチル化の状態を bisulfite PCR 法により検討した。対照としてマウス脳組織および歯肉線維芽細胞、頭蓋骨組織、C2C12 筋芽細胞のトータル RNA およびゲノム DNA を用いた。さらに、メチル化感受性制限酵素である *Not I* を用いた Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS) 法により、cBMSC-2、-4 の分化誘導前後の DNA メチル化プロファイルをそれぞれ作成し、ゲノム DNA 上に散在する CpG 配列のメチル化状態の網羅的な解析を試みた。

#### 【結果および考察】

bisulfite PCR 法の結果、cBMSC 全クローンにおける OCN 翻訳開始部位前後の 6 か所の CpG の平均メチル化率は、骨系分化誘導前後で大きな変化は認められなかった。また、それぞれの CpG 部位について、遺伝子発現状態と

メチル化の状態が関連している部位を検索したところ、4番目の CpG 部位のメチル化状態は OCN が高発現している BMSC、C2C12 筋芽細胞、頭蓋骨組織では低く、OCN がまったく発現しない歯肉線維芽細胞、脳組織では高い傾向が認められた。cBMSC における OPN 翻訳開始部位上流 4 か所の CpG の平均メチル化状態を解析した結果、骨系分化誘導前後で 1～3 番目の CpG 部位の平均メチル化率に著明な変化は認められないが、4 番目 CpG 部位の平均メチル化率は 75% から 28.6% に減少した。また、骨系分化前後で変化の認められた 4 番目 CpG 部位について、遺伝子発現状態とメチル化の状態の関連を検討した結果、この部位のメチル化状態は、OPN 遺伝子が高発現している骨系誘導 cBMSC、歯肉線維芽細胞、C2C12 筋芽細胞、頭蓋骨組織では低いものに対して、OPN 遺伝子が低発現である非誘導 cBMSC、脳組織では高い傾向が認められた。

cBMSC の骨系分化誘導前後の RLGS プロファイルを比較した結果、cBMSC-2 および cBMSC-4 を骨系分化誘導した場合、それぞれ 3.8% (313 スポット中 12 スポット) および 2.4% (338 スポット中 8 スポット) の RLGS スポットに変化が認められた。また、非誘導状態のふたつの細胞クローンを cBMSC-2 と cBMSC-4 を用いて比較した場合、1.2% (693 スポット中 8 スポット) の RLGS スポットに相違が認められた。中胚葉組織由来細胞の cBMSC-4 と外胚葉由来組織である脳組織の RLGS プロファイルを比較した場合、8.7% (472 スポット中 41 スポット) の RLGS スポットに相違が認められた。

以上の結果から、マウス BMSC は BMSC 特異的なメチル化プロファイルを有しており、骨系分化過程では DNA のメチル化状態は部分的に変化することが明らかとなった。特に OCN および OPN では特定 CpG 部位のメチル化状態が高い細胞・組織において遺伝子発現が抑制される傾向が認められたことから、翻訳開始部位上流の限られた部位の CpG のメチル化状態の変化がこれらの遺伝子の発現機構に関与している可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、骨髄由来間葉系幹細胞の骨系分化へのエピジェネティック機構の関与を検討することを目的とし、マウス骨髄由来間質細胞骨系分化時のゲノム DNA メチル化の変化を検討したものである。

その結果、特定の骨関連遺伝子の発現機構には、翻訳開始部位上流の特定の CpG 部位のメチル化状態が関与している可能性が示唆され、骨系分化によってメチル化状態が部分的に変化していることが明らかとなった。

以上の結果は、骨髄由来間葉系幹細胞の骨系分化時におけるメカニズムを解明する一助となるものであり、博士(歯学)の学位取得に値するものと認める。