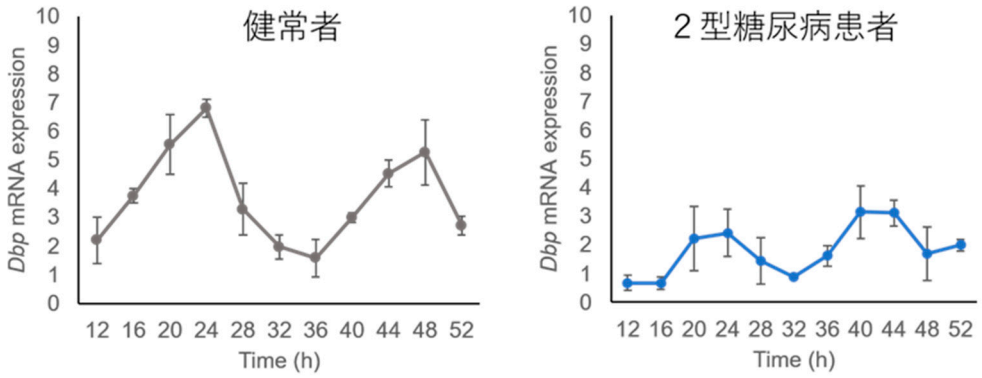
94　時計遺伝子を指標とした幹細胞製剤の開発	堀口　道子

【目的】幹細胞を用いた再生治療において、移植の成功を左右する重要な課題は、移植に必要な品質の高い幹細胞を培養する技術である。そして、移植後も安定した高い再生治療効果を有する幹細胞製剤の開発である。幹細胞は培養条件に依存し、分化し幹細胞性を失うと、再生治療材料としての能力が急激に低下してしまう。また、幹細胞は、生物由来製剤であり、その由来となるドナーの条件によって品質が影響を受ける。一方、時計遺伝子は、周期的な振幅により生体の様々な機能の恒常性維持を司っており、時計遺伝子の変動は幹細胞の細胞状態を反映する指標となる。本研究では、移植効率の高い幹細胞製剤を構築するため、時計遺伝子を指標として幹細胞の評価を行った。本研究によって、時計遺伝子に着目し、移植効率の高い幹細胞ドラッグデリバリー製剤を構築する。

【方法】生活習慣病の基礎疾患を有するドナーより採取した幹細胞の時計遺伝子（*Dbp*、*Per2*、*Cry1*）の発現を定量的PCR 法により 4 時間おきに解析した。幹細胞の時計遺伝子の振幅は、細胞の恒常性に大きな影響を与える。そこで、幹細胞のエネルギー産生を担う細胞小器官ミトコンドリアを透過型電子顕微鏡により観察した。さらに、ミトコンドリア酵素活性を、MTT アッセイ法を用いて定量し、ミトコンドリア DNA コピー数を定量的 PCR により定量した。移植効果の違いを明らかにするため、我々が開発した幹細胞スフェア培養法により幹細胞製剤を調製し、免疫不全マウスの背部皮下に移植した。幹細胞割合を明らかにするため、フローサイトメトリーを用いて幹細胞マーカー（CD90、CD73、CD105）陽性細胞を定量した。細胞障害を評価するため、核膜タンパク質の発現を免疫染色法・ウエスタンブロット法を用いて定量した。

【結果】本研究では、移植効率の高い幹細胞製剤を構築するため、時計遺伝子を指標として幹細胞の評価を行った。Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞では、時計遺伝子の発現振幅が健常者由来の幹細胞に比較して弱い事ことを明らかにした。時計遺伝子の振幅が低下したドナー由来の幹細胞製剤では、ミトコンドリアが変性し、ATP 活性やミトコンドリア DNA コピー数が低下することを明らかにした。時計遺伝子の振幅が低下したドナー由来の幹細胞製剤では、幹細胞割合が低下することで移植効率が悪くなることを明らかにした。本研究により、幹細胞製剤を開発する上で、時計遺伝子を定量することの重要性が明らかとなった。本研究成果は、幹細胞製剤の開発に重要な成果となり、再生治療の普及に繋がるものであった。

幹細胞における時計遺伝子の発現変動



94. 時計遺伝子を指標とした幹細胞製剤の開発

堀口　道子

山陽小野田市立山口東京理科大学 薬学部 薬学科 薬剤学・製剤学分野

Key words：時計遺伝子，幹細胞，製剤，移植，生活習慣病

緒　言

幹細胞を用いた再生治療において、移植の成功を左右する最重要課題は、移植に必要な品質の高い幹細胞を培養する技術である。そして、移植後も安定した高い再生治療効果を有する幹細胞製剤の開発である。幹細胞は培養条件に依存して、分化し幹細胞性を失うと、再生治療材料としての能力が急激に低下してしまう。幹細胞は3次元培養などの平面での培養が基本であるが、移植の際に剥離すると時計遺伝子の振幅が大きく変動し、幹細胞性の著しい消失が認められる。そのため、安定して高い幹細胞性を保つことは困難であった。

時計遺伝子は、周期的な振幅により生体の様々な機能の恒常性維持を司っている。そのため、時計遺伝子の変動は、幹細胞の細胞状態を反映する指標となる可能性を有している。本研究では、移植効率の高い幹細胞製剤を構築するため、時計遺伝子を指標として幹細胞の評価を行った。本研究によって、時計遺伝子に着目し、移植効率の高い幹細胞ドラッグデリバリー製剤を構築した。

方法および結果

1. 幹細胞の時計遺伝子の発現解析

はじめに、移植効率の高い幹細胞製剤を構築するため、時計遺伝子を指標として幹細胞の評価を行った。生活習慣病の基礎疾患を有するドナーより採取した幹細胞の時計遺伝子の発現を、デキサメタゾンによる時計遺伝子の同調処理を行い4時間おきに定量的PCR法により解析した。その結果、Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞では、時計遺伝子（*Dbp*、*Per2*、*Cry1*）の発現振幅が正常に比較して弱いことを見出した（図1）。

2. 幹細胞のミトコンドリアの解析

幹細胞の時計遺伝子の振幅は、細胞の恒常性に大きな影響を与える。そこで、幹細胞の細胞小器官ミトコンドリアに着目した。ミトコンドリア内膜には、呼吸鎖複合体およびATP合成酵素が存在しており、エネルギー源であるATPを産生している。健常者由来の幹細胞では、ミトコンドリアのクリステ構造が規則正しく折り重なっている様子が確認できた（図2A）[1]。一方、Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞では、ミトコンドリアが膨張しており、クリステ構造が短く、変性が確認された（図2B）[1]。

そこで、ミトコンドリア機能を比較するため、ミトコンドリアの酵素活性をMTTアッセイにより評価した。MTTアッセイの結果、ミトコンドリア酵素活性は、Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞では健常者に比較して4分の1に有意に低下した（図3A）[1]。さらに、ミトコンドリアDNAコピー数を定量的PCR法により定量した。Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞では、健常者に比較して、ミトコンドリアDNAコピー数が有意に低下し、ミトコンドリアDNA量が低下したことが明らかになった（図3B）[1]。以上の結果より、Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞では、ミトコンドリアのクリステ構造の変性・酵素活性・DNAコピー数の低下が起こっていることが明らかとなった[1]。

3. 幹細胞の移植効率の評価

移植効果の違いを明らかにするため、我々が開発した幹細胞スフェア培養法により幹細胞製剤を調製し［2］、免疫不全マウスの背部皮下に移植した。Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞は、健常者に比較して移植片の体積や重量が有意に低下し、移植効率が低いことが明らかとなった（図 4A～D）。フローサイトメトリーを用いて、幹細胞性を評価した結果、Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞は、健常者に比較して幹細胞マーカーの割合が有意に低下していることを明らかにした（図 4E～K）。そこで、幹細胞の核膜を評価したところ、Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞は、健常者に比較して核膜タンパク質である Emerin や Lamin の発現が有意に低下していることを明らかにした（図 5）［1］。

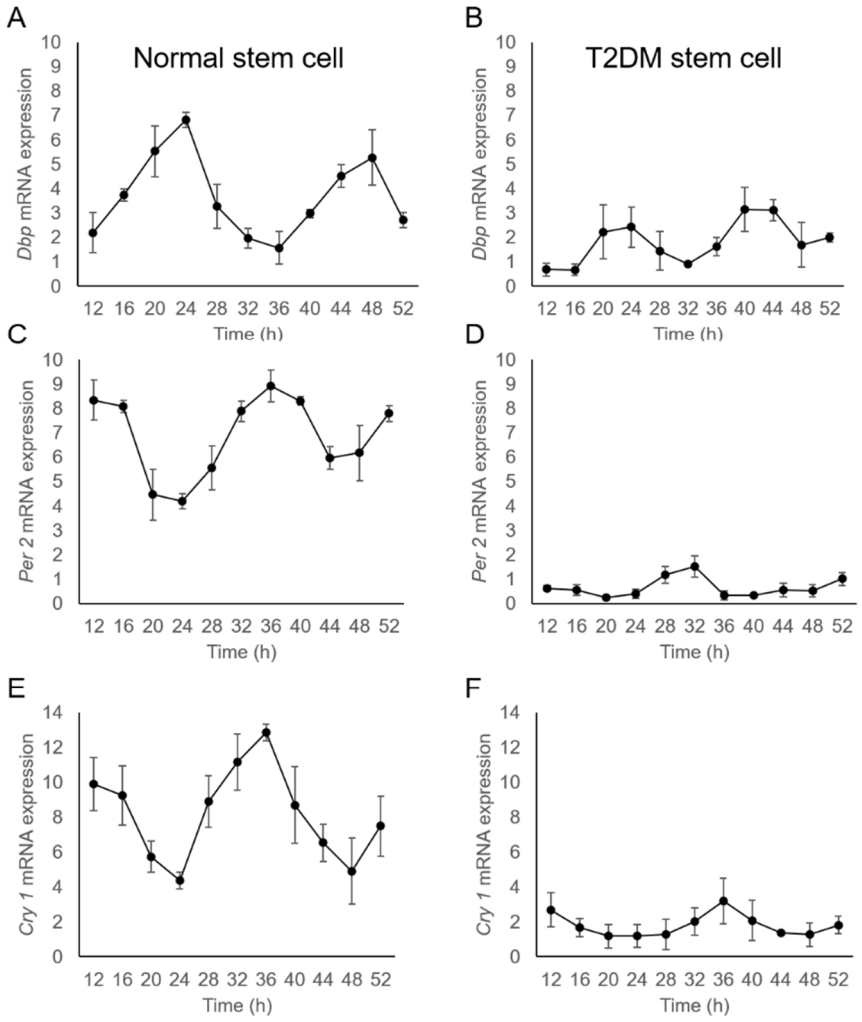


図 1. 幹細胞における時計遺伝子の評価

定量的PCR法による健常者由来およびⅡ型糖尿病患者由来の幹細胞の時計遺伝子の振幅。A、C、E：健常者由来幹細胞、B、D、F：糖尿病患者由来幹細胞。

A、B）時計遺伝子*Dbp*。

C、D）時計遺伝子*Per2*。

E、F）時計遺伝子*Cry1*。

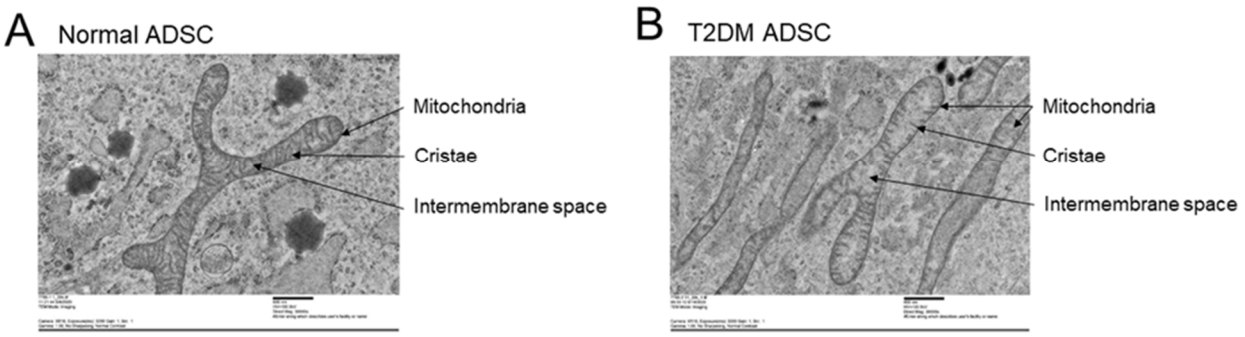


図 2. 幹細胞のミトコンドリアの観察

透過型電子顕微鏡（TEM）を用いたミトコンドリアの観察（スケールバー：600 nm）。

A） 健常者由来間葉系幹細胞。

B） Ⅱ型糖尿病由来間葉系幹細胞。

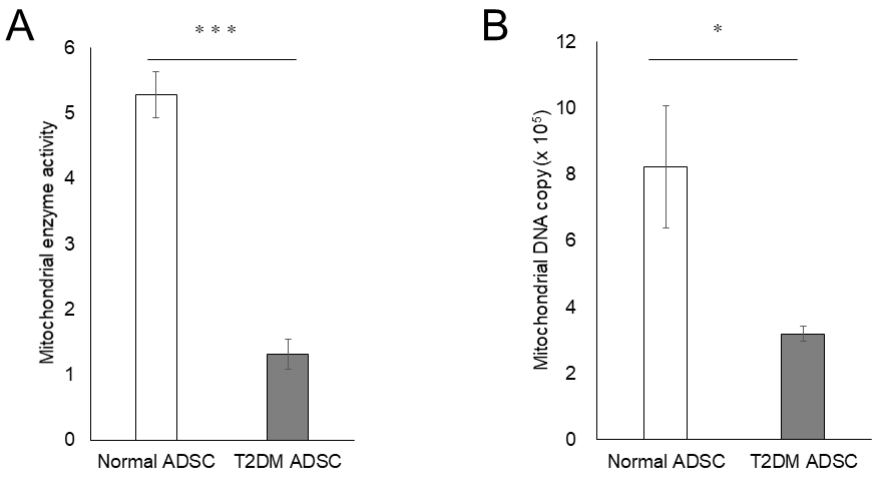


図 3. ミトコンドリア酵素活性の評価

A） ＭＴＴアッセイ法を用いたミトコンドリア酵素活性の定量（***P＝0.0007）。

B） ミトコンドリア DNA コピー数の定量（*P＝0.0425）。

グラフは、健常者由来間葉系幹細胞（白カラム）、Ⅱ型糖尿病患者由来間葉系幹細胞（グレーカラム）を示す。表示は、mean±SEM。サンプル数はｎ＝9。独立して 3 回評価し、有意差検定は t-test を用いた。

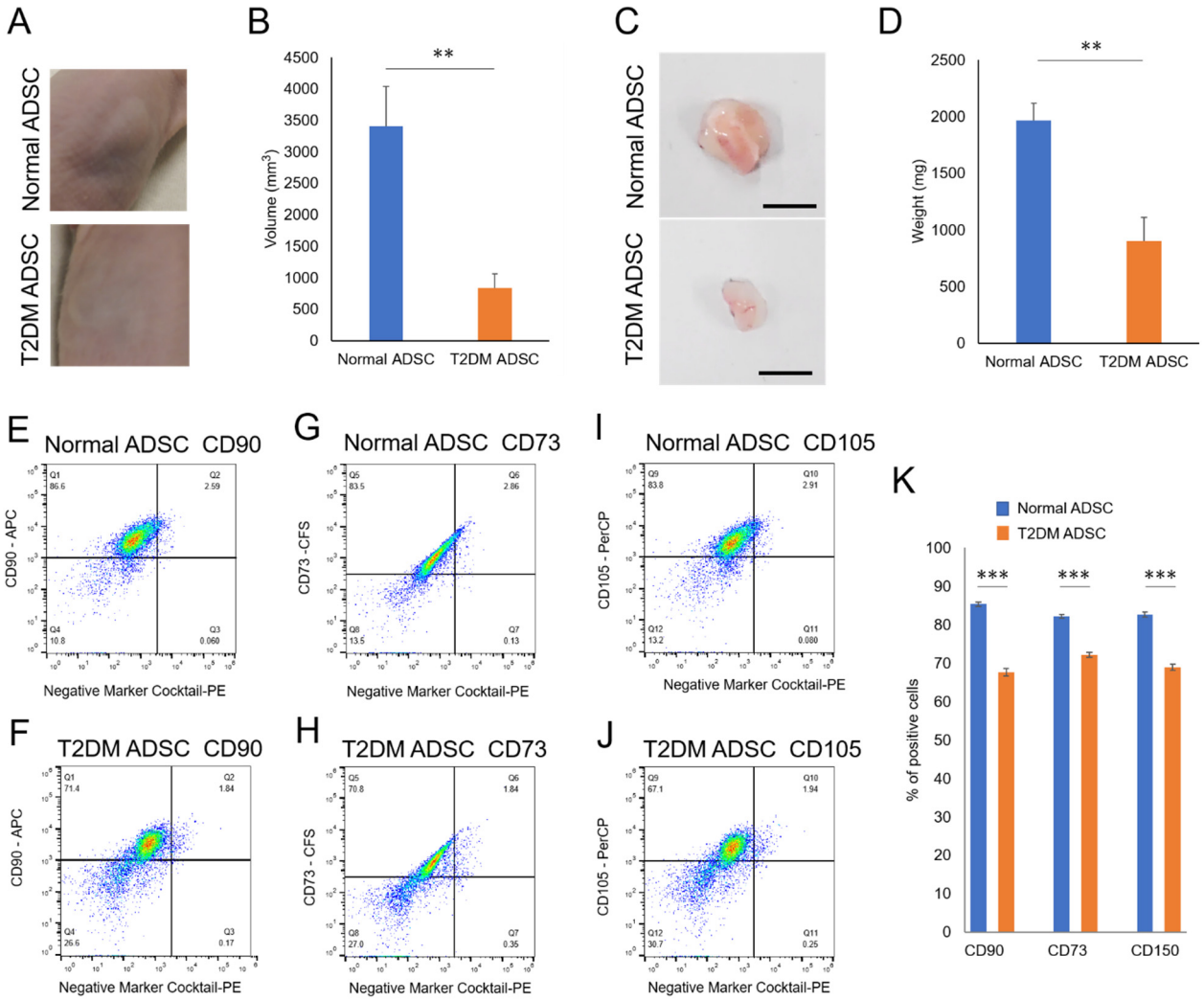


図 4. 幹細胞移植効率の評価

幹細胞製剤の免疫不全マウスの背部皮下に移植効率の定量。

サンプル数はｎ=3、独立して 3 回評価し、有意差検定は t-test を用いた。

A) 幹細胞製剤を移植し 2 週間後の免疫不全マウスの移植部位の外観の写真を示した。

B) 移植部位の体積（mm^3）を計測し、平均値±SEM 値を示した（**P=0.006）。

C) 移植片の外観の写真を示した（スケールバー：10 mm）。

D) 移植片の重量（mg）を量り、平均値±SEM 値を示した（**P=0.0037）。

E～K) 幹細胞割合の変化をフロ-サイトメトリーを用いて定量した。

健常者由来幹細胞（E、G、I）、Ⅱ型糖尿病患者由来幹細胞（F、H、J）、幹細胞マーカーCD90（E、F）、幹細胞マーカーCD73（G、H）、幹細胞マーカーCD105（I、J）。

幹細胞マーカー陽性細胞の割合を算出し、平均値±SEM 値を示した（CD90：***P=0.0002、CD73：***P=0.0006、CD105：***P=0.0004）。

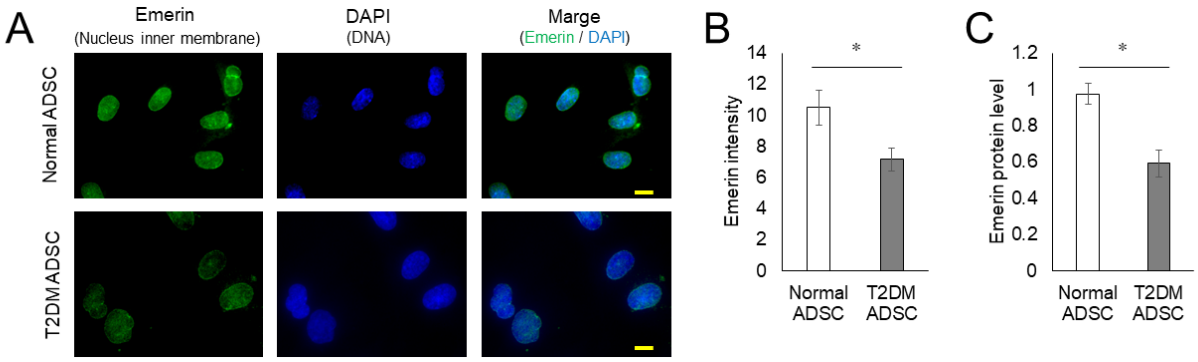


図 5. 幹細胞の核膜の変性評価

健常者由来およびⅡ型糖尿患者由来の幹細胞の核膜タンパク質 Emerin 発現解析。

A）免疫染色（スケールバー：10μm）

B）免疫染色定量（*P=0.0232）。

C）ウ エスタンブロットタンパク定量（*P=0.0146）。

表示は、mean±SEM、サンプル数は n=3、独立して 3 回評価し、有意差検定は t-test を用いた。

考　察

本研究の結果より、時計遺伝子を指標に幹細胞の機能を評価することができた。時計遺伝子の振幅が低下したドナー由来の幹細胞製剤では、ミトコンドリアが変性することを明らかにした。ミトコンドリアは ATP 産生を担う重要な細胞小器官である。免疫不全マウス幹細胞における移植効率の低下には、時計遺伝子の振幅低下によるミトコンドリアの変性が影響することが示唆された。さらに、時計遺伝子の振幅低下による移植効率の低下は、幹細胞割合の低下や核タンパク質の発現低下に影響し、幹細胞製剤の品質を低下させる指標となることを明らかにした。

本研究によって、幹細胞製剤を開発する上で、時計遺伝子の重要性が明らかとなった。これらの成果を生かし、現在、時計遺伝子を指標として見出した移植効率の高い幹細胞製剤を用いて、臓器不全に対する再生治療法の有用性を評価している。本研究成果は、幹細胞製剤の開発に重要な知見であり、再生治療の普及に繋がるものであった。

謝　辞

本研究の実施にあたり、上原記念生命科学財団の御支援を頂き心より御礼申し上げます。

文　献

1） Horiguchi M, Hata S, Tsurudome Y, Ushijima K, Characterizing the degeneration of nuclear membrane and mitochondria of adipose-derived mesenchymal stem cells from patients with type II diabetes、Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021 Mar 23. PMID: 33759360 DOI: 10.1111/jcmm.16484

2） Billing D, Horiguchi M, Wu-Baer F, Taglialatela A, Leuzzi G, Nanez SA, Jiang W, Zha S, Szabolcs M, Lin CS, Ciccia A, Baer R. The BRCT Domains of the BRCA1 and BARD1 Tumor Suppressors Differentially Regulate Homology-Directed Repair and Stalled Fork Protection. Mol Cell. 2018 Oct 4;72(1):127-139.e8. Epub 2018 Sep 20. PMID: 30244837 DOI: 10.1016/j.molcel.2018.08.016.