

学位論文審査結果の報告書

氏 名 小野寺 勇太

生年月日 (昭和)・平成 58 年 12 月 31 日

本籍 (国籍) 大阪府

学位の種類 博 士 (工 学)

学位記番号 生 第 50 号

学位授与の条件 学位規程第 5 条該当
(博士の学位)

論文題目

幹細胞を取り巻く環境の変化と分化・変性に関する研究

学位論文受理日 平成 30 年 1 月 26 日

学位論文審査終了日 平成 30 年 2 月 7 日

審査委員

(主 査) 細 井 美 彦 教授



(副主査) 松 本 和 也 教授



(副主査) 三 谷 匡 教授



(副 査)



(指導教員) 細 井 美 彦 教授



論文内容の要旨

近年、細胞を利用した移植治療に注目が集まっており、中でも、幹細胞を移植資源とした臨床応用が期待されている。ES細胞やiPS細胞、体性幹細胞などを用いて移植用の細胞材料として分化誘導方法や効率化といった研究が行われ、創薬や発生学の研究においても利用されてきた。しかし、移植先である臓器や移植対象である症例ごとに多様性が存在し、移植したとしても細胞の機能が十分に発揮されない、生着しないといった課題も明らかとなってきた。そこで、特に、多くの組織、幅広い症例で認められる慢性的な炎症に注目し、幹細胞や体細胞の恒常性に対し、炎症反応がどのような影響を与え、その性質を変化させるのかを検討した。また、移植治療を目指す多くの疾患・症状に認められ、活性酸素種(ROS)の蓄積を伴う炎症反応に着目し、生体内に存在する幹細胞と移植した幹細胞のそれぞれに認められるROS蓄積のメカニズムの解明を目指した。

慢性炎症は通常の老化と病的な老化の双方に関連している。複数の相互作用および複雑なメカニズムが炎症および老化に寄与し、突発的な感染や他の生理学的・物理学的ストレスの有無にかかわらず炎症性メディエーターのレベルは年齢と共に増加する。ROSは、炎症関連の組織変性および老化の促進に寄与する主要な分子である。正常な状態でもROSは生成されており、細胞シグナル伝達などの重要な生理学的応答にとって必須であるが、ROSは反応性が高く有毒である。高レベルなROS産生または抗酸化カスケードの調節抑制により、細胞は機能不全や異常、最悪、細胞死に至り、さらなる炎症および臓器/組織の老化をもたらす。中でも、組織再生のキープレイヤーである幹細胞が過剰なROSに暴露されると、組織の代謝循環や再生が急激に悪化する。さらに、自己複製および分化能力といった幹細胞らしさ(Stemness)を損なうことも示唆されている。したがって、ROSの蓄積に起因するStemnessの低下は、老化過程において不可避とも言えるメカニズムであると考えられる。そこで本論文では、「幹細胞と炎症に関する研究」を中心に以下の3章にまとめた。

1.「ヒアルロン酸(HA)の抗炎症・疼痛作用の解明」

現在、我が国の臨床で使用されているHA製剤は、加齢や筋力低下、運動不足、強い衝撃等によって生じる変形性関節症において関節内投与されている。これらにおいては、炎症反応の緩和と加齢により減少したHAの補充、組織変性の抑制、組織再生の亢進等の効果が期待されている。急速な高齢化社会の進行を背景に、臨床での利用状況は増加の一途を辿っているが、HAへの依存度とは裏腹に明確なHAの薬理的作用の分子メカニズムは解明されていない。そこで本章では、「HAの抗炎症作用」、「HAの疼痛抑制効果」について検証した。

【HAの抗炎症作用】軟骨細胞におけるHAの持つ薬理的に重要な機能の1つは、細胞のROSの生成および蓄積の減少である。本章では、ウシ関節軟骨細胞において、HA補充とNrf2遺伝子の蓄積との関係を検証した。Nrf2は細胞レドックス応答時における主要な転写因子である。HAを添加して培養した軟骨細胞では、Aktの活性化、Nrf2およびその下流の抗酸化関連遺伝子の発現が亢進された。そこで、そのシグナル伝達経路について検討を行った。HAはAktを活性化しており、HA受容体のCD44 / RHAMMのsiRNAによる抑制、またはAktの活性阻害によって、HAが媒介するNrf2の蓄積は抑制された。さらに、Nrf2のsiRNA処理により、抗酸化酵素に対するHA効果が阻害された。以上より、HAがAktの活性化を通じてNrf2の発現を亢進し、下流の抗酸化遺伝子群を制御することでROSを減少させることが明らかとなった。本研究により、軟骨細胞における細胞外マトリックスが媒介するレドックスシグナル亢進の新しいメカニズムが示唆された。

【HAの疼痛抑制効果】関節炎におけるROSは、組織変性および炎症性メディエーターの産生に関与する。Cox-2は、炎症作用、疼痛および炎症組織における様々な異化反応のメディエーターである。本研究では、関節研究のモデル動物であるウシを用い、関節内の関節液を生成している滑膜組織から滑膜細胞を樹立し、ROSとCox-2発現との直接的な関係を検証した。また、ROSがMAPKKKの1つであるTAK1の活性化を介してMAPKsおよびNF- κ Bのリン酸化による活性化を誘導し、Cox-2およびプロスタグランジンE2(Pge2)の発現を増加させる新規メカニズムを明らかにした。最後に、in vitroおよびin vivoで、代表的な抗酸化剤であるN-アセチルシステアミン、HAをそれぞれ補充することによって、ROS誘発性のCox-2発現が阻害されることを示した。

本研究の成果から、ROSは滑膜由来の線維芽細胞におけるCox-2の産生に重要な因子であり、その中和は慢性関節炎の緩和療法における有効な戦略であると期待できる。

2.「間葉系幹細胞における炎症性miRNA(miR-155)制御による新規治療の可能性」

炎症誘発性の過剰なROSは、細胞機能障害、老化または疾患関連の組織変性を引き起こす重要な因子である。また、幹細胞におけるROSの蓄積は、Stemnessの低下をもたらす、組織の再生または恒常性を変化させるこ

とが知られている。病理学的なROS産生は複数のステップによって誘導され、抗酸化系の機能障害が大きな原因となっている。このプロセスを媒介する中心分子の同定は、老化、老化関連疾患、または幹細胞治療のための新規治療薬の開発の道を開くと考えられる。

本章では、炎症時における幹細胞のStemnessの変化を探ることを目的とした。MSCは軟骨細胞や筋細胞、骨細胞など中胚葉由来の細胞へと分化可能であり再生医療への応用が始まっている実用的な幹細胞である。MSCを材料とした臨床研究については近畿大学医学部附属病院も含め世界的に報告されているが、未分化維持や分化・増殖に関わる主たる制御機構やnichなどの体内環境といったMSCの特性は未だ十分な理解に至っていない。また、加齢の様な長期的な要因を探る幹細胞研究は少ない。そこで、本研究では、炎症の中でも加齢性の炎症と幹細胞に焦点を絞った。

近年、ノンコーディング RNA の1つであるmicro RNA (miRNA) について、炎症や幹細胞の機能を含む多くの生物学的反応における重要性が示されている。特に、炎症特異的に発現亢進するmiRNAは、細胞毒性作用を示すことが報告されている。そこで本研究では、炎症において最も顕著な発現亢進がみられるmiR-155が幹細胞において炎症によって誘導されるROS産生に関与すると仮定した。老齢マウス由来MSCを解析した結果、抗酸化遺伝子Nfe2l2、Sod1、およびHmox1が抑制されており、その一方でmiR-155-5pが高発現していることを見出した。In silico 分析で、miR-155-5pが抗酸化遺伝子を制御する主要な転写因子C/ebpβを標的とすることで、抗酸化遺伝子の発現を抑制し、ROS産生を誘導することを明らかにした。また、細胞移植実験によって、同メカニズムが細胞移植時のROS産生および移植幹細胞の喪失を引き起こす原因の1つであることが示唆された。最後に、miR-155ノックアウトMSCにおいて、抗酸化物質の減弱およびROS蓄積が部分的に抑制された。

本研究の成果から、加齢に伴う炎症によるmiR-155の発現亢進は、幹細胞における抗酸化関連遺伝子の発現抑制を介してROSの分解機能の低下を招き、体内での幹細胞の生存に大きな影響を与えることが示された。

3. 「雌性発生胚に由来するES細胞の組織寄与能力に関する研究」

これまでの研究によって、体外においてPgES細胞は三胚葉それぞれに由来する細胞へと分化可能であると報告されている。しかし、体内でのPgES細胞の分化多能性についての詳細は未だに明らかとなっていない。

本研究では、マウスPgES細胞を樹立し、体内・体外それぞれにおける分化能について定量的な解析を行った。体外での検証は、三胚葉それぞれに代表される神経細胞(外胚葉)、心筋細胞(中胚葉)、アルブミン産生細胞・インスリン産生細胞へと分化誘導を行い、ウェスタンブロット法と画像解析により評価した。体内での検証は、ES細胞が持つ能力の1つであるキメラ寄与能力について評価した。従来のキメラ形成実験では、毛色による違いを中心とした寄与した割合(キメリズム)によって評価していたが、基準が不明確であり、定量性が低い。そこで、本研究ではミトコンドリアDNA(mtDNA)の一塩基多型を有する宿主胚を用いてキメラマウスを作製することにより、サザンブロット法によって体内の組織におけるPgES細胞のキメリズムの割合を評価した。

本研究の成果から、PgES細胞が体内で全身の組織に寄与すること、また、成体においても安定的に維持されていることが明らかとなった。さらに、本研究で開発したmtDNAを利用した寄与率の測定法は従来型の毛色判定では判断しえなかった組織ごとのキメリズムを知る新たな定量的解析手法として有効であることが示された。

組織修復および再生は、組織のホメオスタシスの維持において最も重要である。組織修復や再生能力は、組織特異的な幹細胞の性質・機能を維持出来るか否かに依存するが、加齢と共に誘発する炎症に関連したROSの蓄積を原因としてこの性質や機能は低下する。最近の研究では、長寿遺伝子として注目を集めるサーチュインがmiRNAおよび抗酸化遺伝子を標的とし、ROS抑制の重要な役割を果たしていることが示されているが、miRNAと抗酸化シグナル伝達経路との間の直接的な関係は不明なままであった。今回行った研究では、炎症性サイトカイン、IL-1βおよびTNFαの発現レベルが高齢マウスの骨髄組織において亢進しており、一貫してROSの蓄積が高水準であることを実証し、組織の老化現象の引き金となっている可能性が示唆された。

本研究の成果から、miR-155は加齢や様々な疾患において炎症およびROSの蓄積をもたらす重要な因子であると考えられる。アルツハイマー病やパーキンソン病などの加齢性神経障害は酸化ストレスと関連しており、ROSの非恒常性産生によって引き起こされている。重要なことに、miR-155の発現亢進もこれらの疾患で報告されており、miR-155-5pもまたこれらの疾患におけるROSの産生に関与する可能性が高い。現在、miRNAターゲティング療法は、医療および医薬品分野での関心が高まっており、多くのヌクレオチド化合物が前臨床および臨床試験中である。抗酸化のような重要な生物学的システムでは複数の調節機構が存在することが多く、分子間相互作用の組み合わせや、量やタイミング、作用時間の微調整により恒常性が維持されていると考えられる。抗酸化メカニズムのさらなる理解は、炎症関連ストレスおよび細胞機能の維持や生存に関わる堅牢性のモデルならびにROS関連ヒト疾患のための新規治療法の開発において有益な情報を提供するものと期待される。

論文審査結果の要旨

“老化”をもたらす主たる因子の一つは炎症である。感染や他の生理学的・物理学的ストレスの有無にかかわらず炎症性メディエーターのレベルは年齢と共に増加する。このような炎症を伴う組織変性や老化を促進する主要な分子として、活性酸素種（ROS）が中心的な役割を果たしている。一方で、正常な状態でもROSは生成されている。近年、レドックスバランスの制御により細胞シグナル伝達およびいくつかの重要な細胞応答を担う分子スイッチとしてはたらいっていることが明らかとなり、その生理学的役割が注目されている。しかしながら、ROSは反応性が高く有毒な分子であり、高レベルなROS産生または抗酸化カスケードの調節抑制により、細胞は機能不全や異常、細胞死に至り、さらなる炎症および臓器／組織の老化をもたらす。その結果、過剰なROSに暴露されると、組織の代謝循環や再生が急激に悪化する。過剰なROSはまた、生体内でライフサイクルを通じて恒常性の維持や組織再生のキープレーヤーとして不可欠な様々な幹細胞にも影響を及ぼし、自己複製および分化能力といった幹細胞らしさ（Stemness）を損なう可能性も示唆されている。そこで本論文では、ROSの蓄積に起因するStemnessの低下は、老化過程において不可避とも言えるメカニズムであるとの着想に基づき、「幹細胞と炎症・老化」に着目し、ROSの発生が炎症に関わる分子カスケードに及ぼす影響について、従前にはない切り口による解析を試みている。

第2章では、膝関節におけるヒアルロン酸（HA）の抗炎症作用と疼痛抑制機構について解析している。現在、加齢や筋力低下、運動不足、強度の強い衝撃等によって生じる変形性関節症に対して、炎症反応の緩和と加齢により減少したHAの補充、組織変性の抑制、組織再生の亢進等の効果を期待してHA製剤の関節内投与が施されている。しかしながら、HAの薬理的作用の分子メカニズムに関する理解は十分とは言いがたい。そこで本章では、関節部においてHAがどのようにして抗炎症作用を示し、その結果、疼痛抑制効果をもたらすのかについて解析している。

前半では、「HAの抗炎症作用」について検証している。HAの薬理的作用として、細胞内ROSの生成および蓄積の減少に着目し、ウシ関節軟骨細胞において、HA補充と細胞レドックス応答時における主要な転写因子であるNrf2遺伝子の発現動態について検証した。その結果、HAを添加して培養した軟骨細胞では、Aktの活性化、Nrf2およびその下流の抗酸化関連遺伝子の発現亢進を認めた。さらに、HA受容体のCD44 / RHAMMのsiRNAによる抑制、またはAktの活性阻害がNrf2の蓄積を抑制すること、Nrf2のノックダウンが抗酸化酵素遺伝子の誘導を阻害することを明らかにした。これらの結果は、HAがAktの活性化を通じてNrf2の発現を亢進し、下流の抗酸化遺伝子群を制御することでROSを減少させるという、軟骨細胞における細胞外マトリックスが媒介するレドックスシグナル亢進の新しいメカニズムを提示する優れた成果である。

後半では、「HAの疼痛抑制効果」について検証している。関節炎における疼痛のメカニズムとして、組織変性および炎症性メディエーターの産生に関与するROSと、炎症作用、疼痛および炎症組織における様々な異化反応のメディエーターであるCox-2に着目し、ウシをモデルとして関節内の関節液を生成している滑膜組織から滑膜由来繊維芽細胞（SF細胞）を樹立し、ROSとCox-2発現との関係について検証を試みている。その結果、ROSがMAPKKKの1つであるTAK1の活性化を介してMAPKsおよびNF- κ Bのリン酸化による活性化を誘導し、Cox-2およびプロスタグランジンE2（Pge2）の発現を増加させる新規メカニズムを明らかにするとともに、抗酸化剤のN-アセチルシステアミンやHAの補充により、*in vitro*および*in vivo*でROS誘発性のCox-2発現が阻害されることを示した。本研究の成果は、ROSがSF細胞におけるCox-2の産生に重要な因子であり、その中和は慢性関節炎の緩和療法における有効な治療戦略につながることを期待させる優れた成果である。

第3章では、「miR-155による間葉系幹細胞（MSC）における抗酸化関連遺伝子の制御機構について解析している。MSCは軟骨細胞や筋細胞、骨細胞といった中胚葉由来の細胞へと分化可能な幹細胞であり再生医療への応用が始まっている実用的な幹細胞であるが、未分化維持や分化・増殖・老化に関わるメカニズムについて十分な理解に至っていない。そこで本章では、加齢性の炎症時における幹細胞のStemnessの変化を探ることを目的として、ノンコーディングRNAの1つであるmicro RNA（miRNA）に着目し、炎症において最も顕著な発現亢進が報告されているmiR-155

が幹細胞における炎症によって誘導されるROS産生に関与すると仮定して検証を行っている。その結果、老齢マウス由来MSCでは、抗酸化遺伝子Nfe2l2、Sod1、およびHmox1が抑制されており、その一方でmiR-155-5pが高度に発現していることを見出している。さらに、in silico 分析により、miR-155-5pの標的を予測し、実際に、抗酸化遺伝子を制御する主要な転写因子C/ebp β を標的とすることで、抗酸化遺伝子の発現を抑制し、ROS産生を誘導すること、miR-155ノックアウトMSCにおいて、抗酸化物質の減弱およびROS蓄積が部分的に抑制されることを明らかにした。また、細胞移植実験によって、同メカニズムが細胞移植時のROS産生および移植された幹細胞の喪失を引き起こす原因の1つであることを示した。これらの結果は、加齢に伴う炎症によるmiR-155の発現亢進が幹細胞における抗酸化関連遺伝子の発現抑制をもたらすことでROSの分解機構の低下を招き、体内における幹細胞の存在比に大きな影響を与える仕組みを分子レベルで示したものである。一方、加齢とROSについては、アルツハイマー病やパーキンソン病などの加齢性神経障害は酸化ストレスと関連しており、ROSの非恒常的な産生によって引き起こされるが、miR-155の発現亢進もこれらの疾患で報告されている。したがって、本研究の成果は、老化、老化関連疾患、幹細胞治療のための新規治療薬の開発へとつながる優れた成果として当該研究領域へ大きく貢献する成果である。

第4章では、幹細胞の機能や分化能力についての評価方法を確立することを目的として、単為発生 (Parthenogenesis : Pg) 胚から樹立されたES細胞 (PgES細胞) をモデルにその多分化能について解析している。これまで、体外においてPgES細胞は三胚葉それぞれに由来する細胞へと分化可能であることが報告されている。しかし、体内でのPgES細胞の分化多能性については詳細な解析はなされておらず、その評価はPgES細胞のポテンシャルを測るうえで不可欠なものである。本研究では、マウスPgES細胞を樹立し、体内・体外それぞれにおける分化能について定量的な解析を行っている。体外での評価は、三胚葉それぞれに代表される神経細胞 (外胚葉)、心筋細胞 (中胚葉)、アルブミン産生細胞・インスリン産生細胞 (内胚葉) へと分化誘導を行い、免疫細胞化学とウェスタンブロット解析により行った。体内での評価は、ES細胞が持つ能力の1つであるキメラ形成能力について、新規の定量評価法を開発した。従来キメラ形成実験では、毛色による違いを中心とした寄与した割合 (キメリズム) によって評価していたが、基準が不明確であり定量性が低い。そこで本研究では、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の一塩基多型を有する宿主胚を用いてキメラマウスを作製し、サザンブロット法によって体内の組織におけるPgES細胞のキメリズムを評価している。本研究の結果から、PgES細胞がキメラ個体内で全身の主要な組織に寄与していること、また、それが成体動物においても安定的に維持されていることを明らかにしており、従前にはないきわめて興味深い知見を提示している。さらに、本研究で用いたmtDNAを利用した寄与率の測定法は従来型の毛色判定では判断しえなかった組織ごとのキメリズムを知る新たな定量的解析手法を提示するなど、多能性幹細胞の研究に新たな評価軸を提供する成果といえる。

以上のように、本論文は、加齢に伴う幹細胞への影響について、細胞内ROSの蓄積の分子メカニズムを明らかにするとともに、miRNAの関与など、新たな重要な知見を提示している。さらに、HAなどの細胞外マトリクスや炎症にともなう分子シグナルカスケードを人為的に制御することにより細胞内ROSの低減や炎症反応の抑制を示すなど、ROSに関わる老化や疾患などの新規治療法の開発に大きく貢献する成果を提示している。そして、体内にごく僅かに存在する多能性幹細胞の分化能力を高感度・高精度に評価する技術を新たに開発することにより、再生医療や老化研究のカギを握る幹細胞生物学研究で有用となるツールを提供するなど技術的な成果も示した論文となっている。このように、本論文は、これまで明らかにされていなかった幹細胞と炎症の分子メカニズムの解明や再生・移植医療の発展に資する内容であり、博士 (工学) 論文として価値のあるものと認める。