

遺伝子改変マウスを利用した生体内間葉系幹細胞の階層性の理解

Dissecting the hierarchy and lineage of mesenchymal stem cells
by mouse genetics

宝田 剛志

Takeshi Takarada

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科組織機能修復学分野

Department of Regenerative Science

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Determination of stem cell hierarchy/lineage is indispensable for a better understanding and augmentation of many aspects of medical sciences, including the mechanisms of tissue development and maintenance of tissue homeostasis, as well as disease development. It also has implications in the field of tissue regeneration for medical treatments and disease modeling for drug discovery using iPSC technology. Mesenchymal stem cells are multipotent stem cell that can differentiate into various type of cells including osteoblasts, adipocytes, myocytes and chondrocytes. Runt-related transcription factor 2 (Runx2) is an essential transcriptional regulator of osteoblast differentiation. Runx2 deficiency in Prx1⁺-derived cells (*Runx2^{prx1}^{-/-}* mice) resulted in defective intramembranous ossification. Double-positive cells for Prx1-GFP and stem cell antigen-1 (Sca1) (Prx1⁺Sca1⁺ cells) in the calvaria expressed *Runx2* at lower levels and were more homogeneous and primitive as compared with Prx1⁺Sca1⁻ cells. Our results suggest that osteoblast differentiation *in vivo* may begin at the Prx1⁺Sca1⁺ MSC stage with sequential progression to Prx1⁺Sca1⁻ cells, then Osx⁺Prx1⁻Sca1⁻ osteoblast precursors, which eventually form mature α1(I)-collagen⁺ osteoblasts.

発生、成長段階、および組織傷害の修復には、組織中に存在する組織幹細胞が重要な役割を果たしている。生体骨髄中には、その一種として知られる造血幹細胞以外に、間葉系細胞へ分化することができる間葉系幹細胞

(Mesenchymal stem cell, MSC) の存在が確認されている。MSC は、自己複製能と間葉系細胞(骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞等)への多分化能を有する幹細胞であり、骨髄以外にも真皮、骨格筋あるいは脂肪など様々な組織にも存在することが報告されている^{1,2)}。しかしながら、生体内における詳細な局在や動態、成体個体レベルでの役割など、MSC の生理学的性質には未解明な点が多い。私は、MSC の実態を明らかとし、その生理学的・病態生理学的意義を追究することを目的に、MSC から骨芽細胞への分化過程に必須な転写制御因子 Runt-related transcription factor-2 (Runx2) に着目している。本稿では、Runx2 を細胞種特異的に欠損させることが可能な遺伝子改変マウス (Runx2 コンディショナル欠損マウス) の作出から、それを利用した解析 (=細胞系譜の階層性) についての最近の基礎研究成果について紹介したい。

Runx2 は、Cbfb と 2 量体を形成することで核内に移行し、種々の遺伝子の転写を活性化することにより、間葉系幹細胞から骨芽細胞

への分化過程を制御している^{3,4)}。しかしながら、Runx2 全身性欠損マウスが生後直ちに死亡することから^{5,6)}、生体内における Runx2 機能に関する遺伝的解析は実現していない。この問題を解決するために我々は、Runx2 を特定の細胞・時期に欠損させることのできる Cre/loxP システムを利用した Runx2 コンディショナル欠損マウス (*Runx2^{lox}* マウス) の作製に着手した。Runx2 遺伝子の Exon 4 を loxP 配列にて挟んだ Targeting vector を作製し、それを ES 細胞である TT2 細胞に遺伝子導入した。組み換えをおこした ES 細胞クローンを Southern blotting により選別し、選別した ES 細胞を胚盤胞にインジェクションし、キメラマウスを得た。得られたキメラマウスは、C57BL6/J マウスと交配し、変異型遺伝子が germline transmission したことを確認し、その後 FLP マウスと交配することにより、薬剤耐性遺伝子である neo 配列を除いたマウス (*Runx2^{lox/+}*) マウスを得た⁷⁾。

現状では、MSC を定義する多数のマーカーが乱立しており、どのマーカー陽性な MSC が真に生体内での骨形成に重要であるのかは不明である。そこでまずは、MSC マーカーとして知られる Paired related homeobox 1 (Prx1)^{8,9)} と Nestin¹⁰⁾ に注目した。マウス遺伝学手法を用いて、Prx1⁺細胞 (Prx1-Cre マウス⁸⁾)、ある

いは Nestin⁺細胞 (Nestin-Cre マウス¹¹⁾、それぞれの細胞特異的な Runx2 欠損マウスを製作し (*Prx1-Cre; Runx2^{flx/flx}/flx/flx*, *Nestin-Cre; Runx2^{flx/flx}*)、その骨格標本を解析した。その結果、*Nestin-Cre; Runx2^{flx/flx}* では著明な変化は認められないのに対して、*Prx1-Cre; Runx2^{flx/flx}* マウスでは、骨格形成に異常が認められ、特に、膜性骨化が行われる頭蓋冠にて骨化が顕著に障害されていることが分かった。つまり、Prx1⁺細胞の系譜細胞にて Runx2 が、骨芽細胞分化過程に重要であることが遺伝学的に証明された。

Prx1⁺細胞の局在や性質を調べるために、Prx1⁺細胞が GFP にてラベルされる *Prx1-GFP* マウス¹²⁾を使用した。同マウスの頭蓋冠を観察すると、GFP にてラベルされた Prx1⁺細胞が縫合の部位に非常に多く存在することが分かった。この Prx1⁺細胞を頭蓋冠から酵素処理により単離し、各種 MSC マーカー (CD29, CD49e, CD51, CD61, CD90, CD105, PDGFR α , Sca1) の発現を Flow cytometry 法により単一細胞レベルで解析した。その結果、Prx1⁺細胞中での各マーカー陽性細胞の割合に関しては、高値と低値を示すマーカー種が混在していることが分かり、Prx1⁺細胞は、均一な集団ではなく、ヘテロな集団を構成することが考えられた。Prx1⁺細胞中での陽性細胞の割合が一番低かった Sca1 に注目し、Prx1⁺Sca1⁺細胞と Prx1⁺Sca1⁻細胞とに分けて解析した。その結果、Prx1⁺Sca1⁺細胞では、ほとんどの MSC マーカーに対する陽性細胞の割合が 100% 近くに達し、Prx1⁺Sca1⁻細胞ではそのような傾向は認められなかった。つまり Prx1⁺Sca1⁺細胞は、均一同一な MSC 集団であることが示唆された。更に、Prx1⁺Sca1⁺細胞と Prx1⁺Sca1⁻細胞を、それぞれ Cell Sorter により分取し、自己複製能の指標としての Colony forming unit-fibroblasts (CFU-F) 形成率、多分化能の指標としての骨芽細胞系列、脂肪細胞系列への分化実験を実施した。その結果、Prx1⁺Sca1⁺細胞は、Prx1⁺Sca1⁻細胞と比べて、CFU-F の形成率は非常に高く、分化実験においては、骨芽細胞系列だけではなく、脂肪細胞系列への分化も認められた。つまり、Prx1⁺細胞の中でも Prx1⁺Sca1⁺細胞が、自己複製能と多分化能を持つ MSC としての性質をもつことが明らかとなった。

Prx1⁺Sca1⁺細胞は、実際の組織内においてどのような場所に存在するのか?それを調べるために、*Prx1-GFP* マウスの頭蓋冠の冠状断の切片にて、Sca1 の免疫染色を実施したとこ

ろ、Prx1⁺Sca1⁺細胞は骨化部位から離れた縫合部位に局限して存在し、Prx1⁺Sca1⁻細胞は、縫合部位や骨化部位近傍に、Prx1⁺Sca1⁻細胞は、骨化部位表面やその周囲に多く存在することが分かった。また、この Prx1⁺Sca1⁻細胞の集団には、オステオポンチン陽性かつ Collagen I 陽性な成熟骨芽細胞と、従来前骨芽細胞として定義されていた Osterix (Osx) 陽性な細胞が含まれる事を確認した。

これらの研究結果から、MSC から骨芽細胞に至る分化過程においては、Prx1⁺Sca1⁺細胞、Prx1⁺Sca1⁻細胞、Prx1⁻Sca1⁻Osx⁺前骨芽細胞、そして Prx1⁻Sca1⁻CollagenI⁺成熟骨芽細胞が存在し、これらの細胞が順次分化・成熟化することにより、骨形成が行われることが推察される。従来は、どういった MSC が、前骨芽細胞や骨芽細胞となり、骨形成に関与するのかが分かっておらず、そのため、Runx2 が骨芽細胞分化系列のどういった段階で重要であるのかも長らく不明であった。既存の複数の MSC マーカーを用いた研究の結果から、その内の 2 つ、Prx1 と Sca1 が共陽性な MSC が最も幹細胞性の高い MSC であり、まず Sca1 陰性なり、次に Prx1 陰性な Osx 陽性細胞となり、そして成熟した骨芽細胞となる、という骨形成への分化過程の階層性構造の詳細を明らかにした¹³⁾。

本研究では、骨化に必須な因子である Runx2 に注目し、同因子の個体レベルでの解析を可能とする研究ツールを開発することで、発生段階での骨形成を担う MSC の細胞生物学的な特徴づけを行った。この特徴づけの情報は、移植再生医療において、MSC のみだけではなく、iPS/ES 細胞などを使用した際の、適切な分化誘導技術を確立するための指標としても重要となると考えられる。さらに今後は、発生段階だけでなく「成体や病態」においても同様に細胞生物学的な特徴づけを進めることが、実際の臨床現場への応用を考えた場合の「橋渡し」として重要である。他の幹細胞と比べて、間葉系幹細胞の機能の多くが未解明であり、個体レベルでの機能解明はほとんど進んでいない。従来の視点とは異なる分化以前の幹細胞に注目した基礎研究は、有効な治療薬や予防薬の開発が難航している現状に新規な治療戦略をもたらすことを期待したい。

参考文献

- 1) Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 7841-7845 (2001).
- 2) Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H., *Tissue Eng.*, **7**, 211-228

- (2001).
- 3) Lian J.B., Gordon J.A., Stein G.S., *J. Bone Miner. Res.*, **28**, 2060-2063 (2013).
 - 4) Komori T., *J. Cell. Biochem.*, **112**, 750-755 (2011).
 - 5) Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y.H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S., Kishimoto T., *Cell*, **89**, 755-764 (1997).
 - 6) Otto F., Thornell A.P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K.C., Rosewell I.R., Stamp G.W., Beddington R.S., Mundlos S., Olsen B.R., Selby P.B., Owen M.J., *Cell*, **89**, 765-771 (1997).
 - 7) Takarada T., Hinoi E., Nakazato R., Ochi H., Xu C., Tsuchikane A., Takeda S., Karsenty G., Abe T., Kiyonari H., Yoneda Y., *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **28**, 2064-2069 (2013).
 - 8) Logan M., Martin J.F., Nagy A., Lobe C., Olson E.N., Tabin C.J., *Genesis*, **33**, 77-80 (2002).
 - 9) Matsuzaki Y., Mabuchi Y., Okano H., *Cell stem cell*, **15**, 112-114 (2014).
 - 10) Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., Macarthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N., Frenette P.S., *Nature*, **466**, 829-834 (2010).
 - 11) Zimmerman L., Parr B., Lendahl U., Cunningham M., McKay R., Gavin B., Mann J., Vassileva G., McMahon A., *Neuron*, **12**, 11-24 (1994).
 - 12) Kawanami A., Matsushita T., Chan Y.Y., Murakami S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **386**, 477-482 (2009).
 - 13) Takarada T., Nakazato R., Tsuchikane A., Fujikawa K., Iezaki T., Yoneda Y., Hinoi E., *Development*, **143**, 211-218 (2016).