

平成27年2月

# 奈良井節 学位論文審査要旨

主 査 久 郷 裕 之  
副主査 岡 田 太  
同 領 家 和 男

## 主論文

Construction of a luciferase reporter system to monitor osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by using a mammalian artificial chromosome vector

(哺乳類人工染色体ベクターを用いてヒト間葉系幹細胞株の骨分化をモニターする蛍光ルシフェラーゼレポーターシステムの作成)

(著者：奈良井節、加藤基伸、井上敏昭、谷口真、香月加奈子、香月康宏、佐藤建三、小谷勇、領家和男、押村光雄)

平成27年 Yonago Acta medica 掲載予定

## 参考論文

### 1. 小児の口咽頭および咽頭部穿通性外傷の3例

(著者：奈良井節、小谷勇、土井理恵子、横木智、小川修史、谷尾俊輔、井東朗子、領家和男)

平成25年 口腔顎顔面外傷 12巻 44頁～48頁

# 学 位 論 文 要 旨

Construction of a luciferase reporter system to monitor osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by using a mammalian artificial chromosome vector

(哺乳類人工染色体ベクターを用いてヒト間葉系幹細胞株の骨分化をモニターする蛍ルシフェラーゼレポーターシステムの作成)

ヒト間葉系幹細胞(MSC)は骨芽細胞への分化能を有しており、骨の再生医療の幹細胞ソースとして注目されている。MSCから骨芽細胞への分化過程に関しては、分化制御遺伝子の発現変化について解明が進みつつあるが、一方で細胞への投与によって分化を促進する因子については未だ十分に解明されていない。インビトロ培養実験レベルでは、MSCに対してデキサメタゾンを追加することにより骨分化が誘導されることが報告されているが、ステロイドホルモンを生体投与すると骨粗鬆症の副作用があり、骨再生を目的とした臨床現場での使用は現実的でない。これらのことから、MSCの骨分化を誘導する有用な物質を簡便に検索できるモニター細胞が必要とされている。本研究では骨芽細胞で発現するオステオカルシン(OC)遺伝子に着目し、哺乳類人工染色体ベクターを用いてヒト間葉系幹細胞株の骨分化をモニターする蛍ルシフェラーゼレポーターシステムを作成したので報告する。

## 方 法

MSCを骨芽細胞に分化誘導した際に起きるOC遺伝子の発現を検索できるようにする為に、OC遺伝子上流約10 kbの制御配列に発光タンパク質ルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター遺伝子を構築した。レポーター遺伝子を搭載するベクターとして、宿主細胞内で導入遺伝子の安定が保たれ、長期に発現可能となる人工染色体を利用した。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞内に保持されているマウス人工染色体ベクターに発光タンパク質ルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター遺伝子を搭載し、これを微小核細胞融合法でMSCに導入した。

## 結 果

ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入して得られたCHO細胞株(18クローン)についてゲノムDNAをPCR解析したところ、2株を除きレポーター遺伝子が人工染色体ベクター上の受容サイトに挿入されていることを確認した。CHO細胞では内在のOC遺伝子が低レベルで発現

することが知られているので、これらのCHO細胞株についてルシフェラーゼの活性を測定したところ、株毎に異なる発現量を呈した。レポーター遺伝子を導入する前の親株と比較して有意に発現量が高い12株について染色体FISH解析を行ったところ、導入したレポーター遺伝子が人工染色体ベクター上に搭載されていることを確認した。OC遺伝子のプロモーター領域には、ビタミンD3受容体の結合配列が存在する。そこでレポーター遺伝子を保持するCHO細胞のうち4株を選んで活性型ビタミンD3を投与したところ、非投与群と比較してルシフェラーゼ活性の上昇を認めた。このことから、人工染色体上に搭載されたOC遺伝子制御配列が機能的に動作することが確認された。

次にレポーター遺伝子の供与細胞として2株を選び、MSCに対し微小核細胞融合法による染色体ベクター移入を行い、6株の移入クローン候補を取得した。染色体FISH解析を行ったところ核型の変化がみられたため、これらのうちから染色体ベクターが独立して維持されている2株を選別した。これらMSC2株を、デキサメタゾンを含む骨分化誘導培地で培養したところ、分化の指標であるアルカリホスファターゼ活性の上昇が認められたことから、レポーター遺伝子導入したMSC株が骨分化能を維持していることが確認された。続いて前述の細胞株に対するデキサメタゾンと活性型ビタミンD投与の影響を検索した。ルシフェラーゼ活性はデキサメタゾン投与では上昇せず、活性型ビタミンD3投与によって上昇を認めた。これら正負の応答性は、骨芽細胞分化における内在のOC遺伝子発現変動を調べた先行研究の結果と一致することから、本研究で構築したMSC株が骨芽細胞への分化過程をモニターできる可能性が示唆された。

## 考 察

ヒト間葉系幹細胞の骨分化過程は、骨芽細胞への分化（前期）、骨芽細胞の成熟（中期）を経て骨細胞への転換（後期）が生じることが知られている。インビトロでのデキサメタゾンによる分化誘導系では、OC遺伝子は骨芽細胞への分化過程（前期）では抑制されており、分化後の骨芽細胞成熟過程（中期）で発現上昇することが報告されている。OC制御配列を利用して構築したモニター細胞を利用することで、前期における分化誘導因子と中期における分化促進因子のいずれか、あるいは両方を検索することが可能であると考えられる。

## 結 論

本研究で構築したモニター細胞は、MSCから骨芽細胞への分化と、骨芽細胞が成熟する段階に効果を示す薬剤の検出に役立つ可能性が示された。