トピックス

ヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞の分化と長期自己再生能にはビタミン C と鉄が必要

Ascorbate and iron are required for the differentiation and long-term self-renewal of human iPS cells-derived mesenchymal stem cells

骨格筋に存在する間葉系幹細胞は、軟骨、骨脂肪組織などに分化するが、その分化能や自己再生能は in vitro での長期培養により減弱することがよく知られる.

ビタミン C (VC, L-ascorbic acid) は還元物質であるとともに、多くの生化学反応の補因子として働く.これまで微量栄養素のひとつとして考えられてきた VCだが、近年驚くべきことに、エピジェネティクスや人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) への細胞初期化 (脱分化) にも関与することが報告された $^{1)}$. さらに Liu ら $^{2)}$ は、培地中に添加した VCが iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化を促し、間葉系幹細胞の自己再生能や骨軟骨形成能を高めることを明らかにした.彼らは、そのメカニズムとして鉄と VCが共役して JmjC ヒストン脱メチル化酵素のひとつである lysine-specific demethylase 4B (KDM4B) の機能を促進すると報告している (図 1). JmjC ヒストン脱メチル化酵素は、ヒストン脱メチル化を触媒する Jumonji ドメインと呼ぶ領域を持つ.そこで本稿では、Liu ら $^{2)}$ の報告を概説する.

Liuら²⁾は、はじめにヒト胎生肺線維芽細胞および皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作製した. 次に、iPS 細

胞を間葉系幹細胞に誘導するため、fibroblast growth factor-2 (FGF2), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), epidermal growth factor (EGF) など様々な成長因子を個々に培地中に加 え, 間葉系幹細胞マーカーである CD73, CD105, CD44 および SRY-box transcription factor 9 (SOX9) の遺伝子発 現を調べた、その結果、個々の成長因子の添加により、 どの成長因子でも程度の差はあるが間葉系幹細胞マー カーの遺伝子発現が増加した。さらに、VC がこれら成 長因子による間葉系幹細胞への誘導効率を高めるか否 かを調べるため、VCも同時に培地に添加した. すると, VC 添加群では非添加群と比較して、間葉系幹細胞マー カーの発現が約2倍高くなった. さらに、複数の成長 因子と VC を組み合わせた結果, FGF2, PDGF, EGF および VC を共添加した培地が最も効率的に間葉系幹 細胞を誘導した. すなわち, この培地で間葉系幹細胞 を11日間培養すると、CD73の陽性率が94.6%に達した.

次に、VC存在下で誘導された iPS 細胞由来間葉系 幹細胞の性質を調べるため、遺伝子発現やヒストン修 飾を網羅的に解析して、骨髄由来の間葉系幹細胞と比 較した、その結果、遺伝子発現パターンは、iPS 細胞

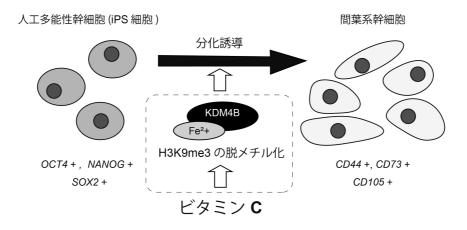


図1 VC は鉄を介した KDM4B の補因子として H3K9me3 の脱メチル化を促進する

由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞の間で正の相関を示した(r=0.954). また、ヒストン H3 の 4 番目のリジンが脱メチル化した H3K4me3 およびヒストン H3 の 27 番目のリジンが脱メチル化した H3K27me3 のメチル化程度も骨髄由来間葉系幹細胞と類似していた. Gremlin1, DAN family BMP antagonist (GREMI) は、骨髄由来間葉系幹細胞や骨格筋由来間葉系幹細胞のマーカーとして報告された遺伝子である³). VC 存在下で誘導された iPS 細胞由来間葉系幹細胞でも、GREMI は骨髄由来間葉系幹細胞と同等なレベルで発現することが認められた. また、iPS 細胞由来間葉系幹細胞のコロニー形成能も骨髄由来間葉系幹細胞と同様に、VC 存在下で誘導された iPS 細胞由来間葉系幹細胞と同様に、VC 存在下で誘導された iPS 細胞由来間葉系幹細胞も軟骨、骨、脂肪組織などに分化することを確認した.

VC 存在下で誘導された iPS 細胞由来間葉系幹細胞 は、VC 非存在下で誘導された iPS 細胞由来間葉系幹 細胞に比べて軟骨形成マーカーである collagen type II alpha 1 chain (COL2A1) や aggrecan (AGC1) の発現が高 かかった. しかし、VC存在下で誘導された iPS 細胞 由来間葉系幹細胞は, collagen type X alpha 1 chain (COL10A1) の発現は低かった. これは、VC がただ単 に軟骨を肥大させるのではなく、正常な硝子軟骨の形 成を促進する可能性を示している.変形性関節症など. 関節の変性疾患における関節軟骨の修復には、硝子軟 骨の形成が必要である. このように VC が iPS 細胞由 来間葉系幹細胞の軟骨形成を促した一方で、骨形成に 関わる遺伝子 bone gamma-carboxyglutamate protein (OC) と collagen type I alpha 1 chain (COL1A1), そして 脂肪細胞分化に関わる遺伝子 CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBP α) \succeq peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARy) の発現量は増加しなかった. これは、VC が iPS 細胞由来間葉系幹細胞の軟骨形成 のみを促進する可能性を示している.

VC は還元剤であると同時に、鉄依存性ジオキシゲナーゼファミリーの補因子としても知られる。VC のiPS 細胞由来間葉系幹細胞への上記の効果が還元作用であるのか否か、または補因子としての作用であるのか否かを明らかにするため、他の還元剤や酸化剤の培地への添加および鉄キレート剤デフェロキサミンの培地への添加により効果を比較した。デフェロキサミンは、体内の過剰な鉄に結合して尿や便から鉄を体外に排泄させる鉄キレート剤であり、培地への添加により鉄依存性ジオキシナーゼの活性を阻害することで知られる。実験の結果、還元剤や酸化剤を添加した培地では間葉系幹細胞マーカーの遺伝子発現は変化しなかっ

た. 一方, デフェロキサミンを添加した培地では, 間 葉系幹細胞マーカー遺伝子の発現が低下した. これは, VC が酸化還元反応ではなく、鉄依存性ジオキシナー ゼの補因子として作用したことを示している. ヒスト ン修飾は、幹細胞の分化に深く関与する、そこで、ヒ ストン修飾の程度をウェスタン法により調べたところ, H3K4me3, H3K9me3, H3K36me3 および H3K27me1 が VC の添加により減少することを見いだした.次に、 H3K9me3 の脱メチル化酵素である KDM4B のノックダ ウンや過剰発現を行ったところ、KDM4B の発現変動 が間葉系幹細胞マーカーの発現変動と正に相関するこ とが明らかとなった. さらに、VC 単独でも KDM4B の 発現を増加させることも明らかとなった. KDM4B過 剰発現モデルへの VC 添加は、今まで検討した中で間 葉系幹細胞マーカーの発現を最も高めた. これは、VC が鉄依存性ジオキシナーゼのひとつ Jmic ヒストン脱メ チル化酵素 KDM4B の補因子として作用し、間葉系幹 細胞の誘導を促進する可能性を示している.

さらに、これらの結果を基に、次に間葉系幹細胞に 鉄含有トランスフェリンと VC を添加し、鉄と VC の 相互作用を調べた。その結果、トランスフェリンまた は VC の単独添加の場合、合計 32 回の細胞継代を行っ た後、間葉系幹細胞にアポトーシスが誘導されて細胞 数が減少した。一方、トランスフェリンと VC の共添 加の場合は、骨形成に関与する転写因子 RUNX family transcription factor 2 (RUNX2) の遺伝子発現の上昇を 伴って間葉系幹細胞の自己再生能が維持され、合計 32 回の細胞継代以降も細胞数が増加した。この結果は、トランスフェリンと VC を共添加した培養では、間葉 系幹細胞の骨軟骨分化効率が向上することを示唆して いる。

次に、トランスフェリンと VC を共添加して培養した間葉系幹細胞の機能を評価するため、7 日間 in vitroで軟骨誘導した iPS 細胞由来間葉系幹細胞およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞をそれぞれ免疫抑制したラット関節の軟骨欠損部位に移植した。移植 12 週間後に細胞が十分に生着して軟骨が再生したことは、ラミン A/C による免疫組織染色により確認された。この際の組織学的な評価では、iPS 細胞由来間葉系幹細胞由来の軟骨は骨髄由来間葉系幹細胞由来の軟骨と同程度の成績を示した。

VC は iPS 細胞の初期化に有用である 11 . Liu 21 らの 結果は、VC とトランスフェリンを共添加して培養した iPS 細胞由来間葉系幹細胞が軟骨再生に有用であることを示した。Liu 21 らの方法は、既存の方法に比べ、効率よく iPS 細胞を分化させることができるため、より

迅速に軟骨欠損の治療に必要な細胞の供給が期待できる。また、細胞の安定供給は、骨形成に重要なビタミン K や他の分子を培地に添加した際の効果の検討にも有効であることは言うまでもない。しかし、VC 添加により COL2AI の発現量が増加した一方で、COL10AI の発現量が減少したメカニズムについては、いまだ不明である。これら遺伝子の発現調節がどのように行われているのか、また VC と鉄の摂取が様々な幹細胞の自己再生能とその維持に有用なのかはとても興味深い。

(2020.6.9 受付)

Key words :ascorbic acid, histone demethylation, iPS cells, iron, mesenchymal stem cells, vitamin C

¹Molecular Regulation of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

²Molecular Cell Biology Laboratory, Department of Bioscience and Engineering, College of System Engineering and Sciences, Shibaura Institute of Technology

Yurika Niimura 1,2, Yuta Doshida 1, Koji Fukui 2,

Akihito Ishigami¹

- 1 東京都健康長寿医療センター研究所分子老化制御
- ² 芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科 分 子細胞生物学研究室

新村 柚里香 ^{1,2}, 土志田 裕太 ¹, 福井 浩二 ², 石神 昭人 ¹

文 献

- Chen J, Guo L, Zhang L, Wu H, Yang J, Liu H, Wang X, Hu X, Gu T, Zhou Z, Liu J, Liu J, Wu H, Mao S-Q, Mo K, Li Y, Lai K, Qi J, Yao H, Pan G, Xu G-L, Pei D (2013) Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet* 45, 1504-1509
- 2) Liu TM, Yildirim ED, Li P, Fang HT, Denslin V, Kumar V, Loh YH, Lee EH, Cool SM, Teh BT, Hui JH, Lim B, Shyh-Chang N (2020) Ascorbate and Iron Are Required for the Specification and Long-Term Self-Renewal of Human Skeletal Mesenchymal Stromal Cells. Stem Cell Rep 14, 210-225
- 3) Worthley Daniel L, Churchill M, Compton Jocelyn T, Tailor Y, Rao M, Si Y, Levin D, Schwartz Matthew G, Uygur A, Hayakawa Y, Gross S, Renz Bernhard W, Setlik W, Martinez Ashley N, Chen X, Nizami S, Lee Heon G, Kang HP, Caldwell J-M, Asfaha S, Westphalen CB, Graham T, Jin G, Nagar K, Wang H, Kheirbek Mazen A, Kolhe A, Carpenter J, Glaire M, Nair A, Renders S, Manieri N, Muthupalani S, Fox James G, Reichert M, Giraud Andrew S, Schwabe Robert F, Pradere J-P, Walton K, Prakash A, Gumucio D, Rustgi Anil K, Stappenbeck Thaddeus S, Friedman Richard A, Gershon Michael D, Sims P, Grikscheit T, Lee Francis Y, Karsenty G, Mukherjee S, Wang Timothy C (2015) Gremlin 1 Identifies a Skeletal Stem Cell with Bone, Cartilage, and Reticular Stromal Potential. Cell 160, 269-284