



TITLE:

Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells, and potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Shibata Kotaro Roberts

---

CITATION:

Shibata Kotaro Roberts. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells, and potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. 京都大学, 2008, 博士 (医学)

ISSUE DATE:

2008-01-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/135789>

RIGHT:

氏 名	柴 田 弘 太 郎 口 巴 ー ツ
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3169 号
学位授与の日付	平 成 20 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells, and potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. (p16INK4A 遺伝子の発現はヒト間葉系幹細胞の老化に関与し、体外培養の過程で DNA メチル化により消失しうる)
論文調査委員	(主 査) 教 授 開 祐 司 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 武 田 俊 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells、MSC) は多分化能を有し、比較的単離、調製が容易であることから既に再生医療応用が開始されている。しかし MSC の定義はいまだ明確でなく、増殖機構を含め、その生物学的な基礎データは乏しい。また体外培養過程における悪性転化の実例が報告され、体外培養における増殖制御機構を理解することは臨床応用を安全に行う上で重要な課題である。本研究はヒト MSC の体外培養における増殖能及び増殖制御機構に関与する因子の同定を目的に行った。

京都大学医学部医の倫理委員会の承認を受けた研究協力依頼に基づいて提供された 29 例の MSC を使用した。密度勾配遠心法により有核細胞の分画を抽出し、プラスチック培養皿に播種して付着した細胞を MSC と定義した。単離された MSC の多分化能を確認するため、既報の分化誘導法に従って骨、軟骨、脂肪への分化誘導を行った。単離後は 3T3 様の継代培養を行い、増殖が停止するまで培養を継続し、最終培養日数、最終 Population Doubling (以下 PD) を検討した。第 2 継代時、最終継代時の細胞群で Southern blotting 法で Telomere 長を計測した。またこれらの培養過程で細胞周期調節因子 p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現を RT-PCR 法、Western blot 及び免疫染色法で解析した。

29 例全例で骨、軟骨、脂肪の 3 方向への分化能を確認できた。平均最終培養日数は 151.2±47.7 日であり、平均 PD は 28.1±7.2 回であった。第 2 継代時の Telomere 長は最終 PD 数と相関しており、継代可能回数を推測する目安になり得ると考えられた。また p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子 mRNA の発現レベルは PD との間に強い正の相関を認めた。p16<sup>INK4A</sup> 免疫染色と Senescence Associated  $\beta$  Gal (SA- $\beta$ -Gal) 染色、Ki67 免疫染色の三重染色を行った結果、p16<sup>INK4A</sup> 陽性細胞は SA- $\beta$ -Gal 染色陽性、Ki67 陰性であった。更に p16<sup>INK4A</sup> 陽性細胞でその発現を small interfering RNA (siRNA) によって抑制したところ、SA- $\beta$ -Gal 染色陽性の割合が低下し、DNA 合成能が更新することが確認された。これらの結果から p16<sup>INK4A</sup> 発現亢進が MSC の増殖能の低下及び細胞老化を誘導していることが示唆された。そこで 29 例の MSC における p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子の発現と継代との関連を詳細に検討した。25/29 例 (87%) では継代とともに発現が継時的に上昇した (漸増群) が、2/29 例 (7%) では発現が継代停止時まで上昇せず (不変群)、2/29 例 (7%) では発現が一旦上昇してから急速に低下した (漸増後低下群)。発現低下の原因を解析するために、p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子転写調節領域の DNA メチル化解析を行ったところ、漸増群ではメチル化は認めなかったが、不変群 2 例、漸増後低下群 2 例ともにメチル化を認めた。更に漸増後低下群の 1 例では最終培養日数、最終 PD 共に延長し (334 日、53 回)、継代後期の細胞では染色体構造の異常を示していた。

以上の結果より、MSC の体外培養における増殖制御には telomere 長と p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子発現の両者が関与していることが明らかになった。特に体外培養過程において p16<sup>INK4A</sup> 遺伝子の転写調節領域のメチル化修飾が約 14% の例で発生する事実は、今後の臨床応用にあたり留意すべき点であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

骨髄間質細胞 (Bone Marrow Stromal Cell, BMSC) は多分化能を有し、再生医療応用が開始されているが、その体外培養における増殖制御機構は未だ明らかではない。そこで特に細胞周期制御因子である p16 遺伝子に注目し BMSC の増殖能の解析を行った。

腸骨骨髄由来の BMSC 29 例を使用した。全例で骨、軟骨、脂肪の 3 方向への分化能を確認され、平均最終培養日数は  $151.2 \pm 47.7$  日、平均倍加数 (PD) は  $28.1 \pm 7.2$  回であった。第 2 継代時のテロメア長は最終 PD 数と相関しており、継代可能回数を推測する目安になり得ると考えられた。一方 p16 遺伝子の発現レベルは継代とともに亢進し、small interfering RNA による一過性阻害により増殖能の再獲得及び老化回避が認められ、p16 の発現亢進が MSC の増殖能の低下及び細胞老化を誘導していることが示唆された。継代過程における p16 遺伝子の発現レベルを詳細に検討したところ、漸増群 (25/29 例、87%)、不変群 (2/29 例、7%)、及び漸増後低下群 (2/29 例、7%) の 3 群に分類された。後者 2 群では全例で p16 遺伝子転写調節領域の DNA がメチル化されており、漸増後低下群の 1 例では最終培養日数 (334 日)、最終 PD (53 回) が共に延長し、継代後期の細胞では染色体異常を伴っていた。

以上の解析により、BMSC の体外培養における増殖制御にはテロメア長と p16 遺伝子発現の両者が関与しており、体外培養過程において約 14% の例で p16 遺伝子の発現が転写調節領域のメチル化により消失することが明らかになった。以上の内容は再生医療における BMSC の体外培養法の開発及び安全性評価において寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は平成 19 年 11 月 15 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。