

《様式B》

研究テーマ 「低温プラズマによるヒト人工多能性幹細胞分化誘導における細胞内代謝回路とエピジェネティクスの関与」			
研究責任者	所属機関名	岐阜薬科大学	
	官職又は役職	助教	
	氏名	大塚 智裕	メールアドレス otsuka-to@gifu-pu.ac.jp
共同研究者	所属機関名	岐阜薬科大学	
	官職又は役職	教授	
	氏名	原 宏和	
共同研究者	所属機関名	岐阜薬科大学	
	官職又は役職	准教授	
	氏名	神谷 哲朗	

(令和6年度募集) 第37回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

本研究では、低温プラズマ (non-thermal plasma, NTP) がヒト多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cell, hiPSC) の分化誘導を促進するか検討を行った。また、NTP の作用における細胞内代謝経路やエピジェネティクスの関与について研究した (図1)。

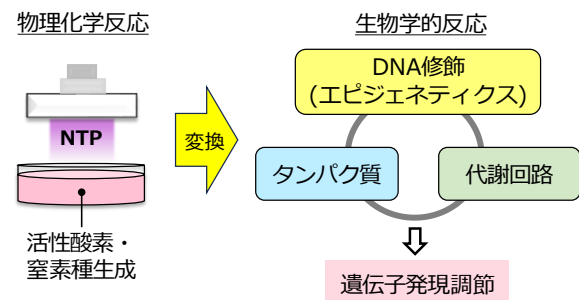


図1 本研究の概略

NTP を hiPSC に照射し、その後の遺伝子・タンパク質・代謝物の発現変化を real-time qRT-PCR 法、ウエスタンブロット・ドットブロット法、LC-MS/MS による分析により確認した。NTP の照射により、hiPSC において中胚葉分化遺伝子である T (BRACHYURY) の発現の上昇が認められたため、中胚葉系の分化を促進する可能性があることを確認した。また、細胞内代謝について検討したところ、S-アデノシルメチオニン (SAM) の低下、S-アデノシルホモシステイン (SAH) の上昇および NAD⁺ の低下が認められた。よって、NTP の照射は DNA のメチル化に関与するメチオニン回路およびヒストンなどのアセチル化に関与する NAD⁺ の発現に影響をおよぼす可能性が考えられた。加えて、実際のエピジェネティクスの状態を DNA や

ヒストンのメチル化・アセチル化の状態を指標に検討したところ、DNAメチル化の亢進傾向が確認された一方で今回検討したヒストンのメチル化には影響しなかった。また、p-53のアセチル化を促進した。よって、NTPによる代謝経路への影響が実際に細胞のエピジェネティクス状態に影響をおよぼしていることを確認した。

以上より、本研究ではNTPのhiPSCに対する新規の作用を複数見出すことができた。今後はこれらの知見を基にhiPSCの分化においてNTP照射が活用できる装置・照射条件・分化段階の最適化を行い、特許出願・実用化に向けた開発を継続する。

2. 実施内容および成果の説明

近年hiPSCの研究が精力的に行われており、再生医療や細胞医療、希少疾患の治療薬の開発などへの発展が期待されている。一方、これらの応用を目指す上で細胞の品質、コスト、提供速度などの課題も多く残されている。中でも目的の細胞に分化誘導させた際の分化効率の低さが問題となることが多く、効率の良い分化誘導方法の開発が求められている。NTPの照射は活性酸素種

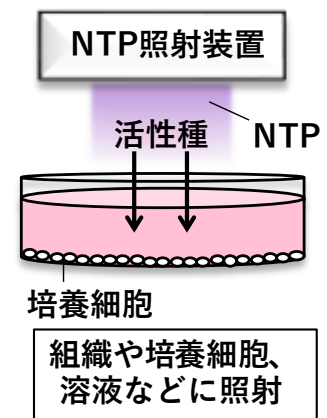


図2 NTP照射

(ROS) や活性窒素種 (RNS)などを生成するが、これらは細胞内ではセカンドメッセンジャーとして生理機能にか

かわるため、NTPの生体反応におけるNTP由来のROSやRNSの機能の研究が行われている。一方で、これらの研究は成熟組織や細胞に対する報告が多く、幹細胞などの未分化な細胞に対するNTPの影響は十分に解析されていない。そこで本研究では、NTPがhiPSCの分化誘導を促進するか、またその作用に細胞内代謝経路やエピジェネティクスがかかわる可能性について検討を行った。

まず初めにNTPをhiPSCに照射し(図2)、細胞の分化に与える影響を確認した。NTPの照射は装置側の条件(プラズマジェット、浴面プラズマ)の他にも照射時間、照射距離によって発生する活性種の生成割合や量が変わるため、複数の条件にて検討を行ったところ、一部の照射条件において中胚葉分化遺伝子であるT(BRACHYURY)のmRNA発現上昇が起こることを確認した。一方で、その上昇は通常分化誘導培地による分化促進時のT(BRACHYURY)発現上昇より低かった

ため、より高い発現上昇を示す NTP 照射条件を引き続き検討していく予定である。また、NTP の照射が hiPSC とは異なる細胞において wnt- β -catenin 経路を促進すること、wnt- β -catenin 経路の促進剤 (GSK3 β 阻害剤) により中胚葉への分化が促進されることが報告されているため検討を行ったところ、hiPSC に対する NTP の照射によって β -catenin の核移行が促進される傾向が認められた。

次に、NTP 照射により細胞内代謝に影響があるかを LC-MS/MS により検討した。エピジェネティクス、特に DNA やヒストンのメチル化に関与することが知られているメチオニン回路に関連する代謝物およびヒストンのアセチル化に関与する NAD⁺について NTP 照射による影響を確認したところ、NTP 照射 24 時間後において細胞内のメチオニン回路因子 S-アデノシルメチオニン (SAM) の低下および S-アデノシルホモシステイン (SAH) の上昇に加えて、NAD⁺の低下が認められた。これらの結果から、NTP の照射は細胞内の代謝経路を変動させ、エピジェネティクスを制御することで hiPSC に何らかの影響を与えていると予想された。

実際に NTP 照射による細胞内代謝経路の変動がエピジェネティクスの状態に影響しているかについて検討を行った。P53 タンパク質は NAD⁺要求性のヒストン脱アセチル化酵素 SIRT タンパク質により脱アセチル化されることや、p53 活性が未分化幹細胞の中胚葉系細胞への分化を促進することが報告されている。よって、NTP の照射が p53 のアセチル化におよぼす影響を確認したところ、NTP の照射は p53 のアセチル化を促進することを確認した。次に、メチル化に対する影響を確認するため、トリメチル化ヒストンである H3K27me3 及び H3K4me3 の発現をウエスタンブロットにて確認したところ、これらのメチル化ヒストン量に大きな変化は確認されなかった。一方で、DNA のメチル化に対する影響を評価するためにゲノム DNA を用いたドットブロットを行い、メチルシトシン抗体を用いて DNA 中のメチル化シトシン量を評価したところ、一部の照射条件において DNA のメチル化を促進する傾向が認められた。通常メチル化された遺伝子の発現は抑制されるため、DNA 全体的なメチル化が増加することは分化誘導の阻害因子として知られている。一方で、分化誘導時に多能性遺伝子の DNA のメチル化の増加が必要であることも報告されている。よって、NTP 照射によるメチル化の増加は興味深い知見であり、分化誘導にどのような影響を与えているのかについては今後の検討課題と考えている。

以上より、hiPSC に対する NTP の照射は細胞内代謝経路の変動を介してエピジェネティクスを変動させ、分化関連タンパク質の機能を変化させることを明らかにした。本研究においてはこれまでに報告のある中胚葉分化誘導に関する影響を中心に確認したが、今回得られた NTP の作用がどの分化誘導段階においてより大きな影響を与えるか、また各段階におけるこれら因子の変動量を今後も引き続き検討することで、中胚葉分化に加えてさらに別の分化誘導段階における NTP の新たな促進作用を見出すことができると考えられる。