

主論文の要旨

Identification of Meflin as a Potential Marker for Mesenchymal Stromal Cells

〔 間葉系幹細胞の新規マーカー候補分子 Meflin の同定 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：後藤 秀実 教授)

前田 啓子

【緒言】

間葉系幹細胞 (mesenchymal stromal cells、以下 MSCs)は培養皿における付着増殖能、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能、および複数のマーカー分子の発現によって定義されており、骨髄の他、全身臓器の血管周囲に局在する細胞である。MSCs はその免疫調節能を利用して多様な疾患に臨床応用されているが、特異的なマーカー分子は特定されていない。我々は過去の網羅的遺伝子発現解析により MSCs に高発現する分子の一つである Meflin (別名 ISLR)に着目をした。Meflin はロイシンリッチリピートと免疫グロブリン様ドメインを有する GPI アンカー型分子であるが、現在までその局在、機能は不明である。今回我々は Meflin の局在、また MSCs における機能について培養細胞、ノックアウトマウスを用いて検討を行った。

【方法】

ウェスタンブロット法 (WB 法) 免疫染色法により MSCs や各種細胞株における Meflin の発現や局在を検討した。またマウスでの Meflin の局在を In situ hybridization 法 (ISH 法)を用いて解析した。

次にヒト及びマウス MSC を骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化を誘導し、Meflin の発現の変化を定量 PCR 法、WB 法にて解析した。その後同細胞の分化誘導において Meflin のノックダウンあるいは強制発現が転写因子および各種分化マーカーに与える影響を検討した。また骨芽細胞への分化を制御する転写因子である Forkhead box O1 (FoxO1)との関連を核内分画を抽出し WB 法にて解析した。

最後に Meflin ノックアウトマウスを作成し、骨、MSC における表現型の解析を行った。またフローサイトメトリーにて、マウスの MSCs を既存のマーカーである platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α)と Sca-1 で染色し各分画での Meflin の発現を定量 PCR で解析した。

【結果】

Meflin は WB 法にて MSCs と皮膚線維芽細胞に発現を認めた (Fig.1B)。上皮系細胞、血管内皮、平滑筋細胞および癌細胞には Meflin の発現は認めなかった。また 293 の Meflin 安定発現細胞株を用い免疫染色法で局在を見たところ Meflin は細胞膜に局在していた (Fig.1C)。マウスにおいては、E18.5 では Meflin は各臓器の間質や骨組織の軟骨原基に局在していた。P56 では骨髄の類洞周囲細胞、各臓器の間質、血管周囲の細胞に局在していた (Fig.2)。骨組織においては、幼若な骨芽細胞、軟骨芽細胞に局在していた。次に MSC 及び C3H10 T1/2 細胞を骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化誘導を行うと、Meflin の発現は著明に低下した (Fig.4A)。同様にヒト MSCs においても各系譜へ分化誘導を行うと Meflin の発現の低下を認めた。一方 Meflin を外因性に発現させると骨芽細胞、軟骨細胞への分化誘導に伴い RUNX2、SOX9、Osteopontin など各分化マーカーの発現が抑制された (Fig.3B、C)。また逆に Meflin の発現を RNA 干渉により抑制 (ノックダウン)した細胞では、分化誘導に伴い各分化

マーカーの発現の上昇が認められた。その後 Meflin を外因性に発現させると骨芽細胞分化の制御因子である FoxO1 の核内分画での発現が抑制されることが分かった。逆に Meflin をノックダウンした細胞では FoxO1 の核内移行が促進された(Fig.5)。FoxO1 のリン酸化には影響を与えなかった。

最後に Meflin ノックアウトマウスを作成し、骨、MSC の表現型を解析したところ、骨において Meflin ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して骨表面における骨芽細胞の数、表面積の増加、脛骨、橈骨伸長の促進を認めた。MSC においては、Meflin ノックアウトマウスは骨髄由来細胞のコロニー形成率の低下という表現型を示した。また Meflin は、マウスの MSC において PDGFR α と Sca-1 の発現している未分化な MSCs の分画で他の分画と比較して高い発現を認めた。

【考察】

Meflin は MSCs と線維芽細胞に特異的に発現しており、マウスにおいて MSC の局在する骨髄類洞周囲細胞や各臓器の血管周囲の細胞に局在することから MSC の新規マーカーの候補になりうる分子である。Meflin は MSCs の中でも PDGFR α 、Sca-1 の発現する未分化な MSCs の分画に発現が高いことや、各系譜への分化誘導により発現が低下することからも、未分化な MSCs のマーカーとなりうる可能性もあると考えられる。また発現様式や局在からも、MSCs の既存のマーカーよりも特異性は高いと考えられる。今後はフローサイトメトリーや免疫染色で使用できる抗体を作成し、既存のマーカーとの共局在や Meflin 陽性細胞を回収して機能を検討する必要があると考えられる。

Meflin を外因性に発現させると各系譜の分化マーカーの発現が抑制されることや、Meflin ノックアウトマウスにおいて骨芽細胞の数の増加、長管骨の伸長の促進が認められることから、Meflin は MSCs の未分化な状態の維持に関与している可能性がある。また骨芽細胞への分化を抑制する機序としては FoxO1 の核内移行を抑制する機能が考えられる。しかしながら、FoxO1 の核内移行を制御する機序は不明であり今後検討する必要があると考えられる。

骨髄由来の MSCs は造血幹細胞のニッチを形成する機能や骨の再生、リモデリングに関与するという機能が報告されており、これらの機能への Meflin の関与も検討していく必要があると考える。また Meflin は腫瘍の間質や線維化疾患で発現が高い分子の一つであるという報告もあり、これらの疾患における Meflin の機能も検討していく予定である。

【結論】

Meflin は MSCs において未分化な状態の維持に関与する分子の一つと考えられ、またその発現様式から MSC のマーカーとなりうる分子だと考えられた。