

論文内容要旨

Hypergravity enhances RBM4 expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and accelerates their differentiation into neurons

(過重力環境はヒト骨髄由来間葉系幹細胞における RBM4 発現を高め神経分化を促進する)

Regenerative therapy, 22:109-114, 2023

主指導教員：浦川 将教授

(医系科学研究科 運動器機能医科学)

副指導教員：竹野 幸夫教授

(医系科学研究科 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学)

副指導教員：二川 浩樹教授

(医系科学研究科 口腔生物工学)

寺西 正貴

(医系科学研究科 総合健康科学専攻)

Introduction: Numerous studies have demonstrated that various physical stimuli significantly affect biological events in living organisms. These studies reveal that physical stimuli trigger the biochemical signals related to molecular cascades that result in altered cell proliferation and differentiation and thus in variations in tissue structure and function. In recent years, studies focusing on gravity have been to attract attention among physical stimuli. An increasing number of studies have reported that altered gravity affects the human body at the cellular level and is also involved in regulating stem cell differentiation. A previous study has indicated that the regulation of stem cell differentiation is crucial for improving the quality of stem cells. We have shown that microgravity is useful for maintaining undifferentiated mesenchymal stem cells (MSCs) and may affect neural differentiation of MSCs. We also demonstrated that the nuclear structure and cytoskeleton are altered in MSCs cultured with microgravity. However, the effects of hypergravity on the differentiation of MSCs, especially on neural differentiation related to neural development, have not been clarified. Therefore, the present study induced neural differentiation of MSCs in normal gravity (1G) or hypergravity (3G) conditions.

Methods: We induced neural differentiation of human bone marrow-derived MSCs (hbMSCs) for 10 days under 1G or 3G conditions using a gravity controller, Gravite®. HbMSCs were collected, and cell number and viability were measured 3 and 10 days after induction. RNA was also extracted from the collected hbMSCs, and the expression of neuron-associated genes correspond to nestin (NES), achaete-scute homolog 1 (ASCL1), neuron-specific class III beta-tubulin (TUJ1), microtubule-associated protein 2 (MAP2), neurofilament medium chain (NF-M), and neurofilament heavy chain (NEFH) and regulator markers of neural differentiation corresponding to RNA binding motif protein 4 (RBM4), polypyrimidine tract binding protein 1 (PTB), pyruvate kinase M 1 (PKM1), and pyruvate kinase M 2 (PKM2) was analyzed using real-time polymerase chain reaction (PCR). Additionally, we evaluated the NF-M-positive cell rate 10 days after induction using immunofluorescent staining.

Results: The expression of neuron-related genes MAP2, NF-M, and NEFH and the percentage of NF-M positive cells under 3G conditions for 10 days after the induction were significantly increased compared to those under 1G conditions. The mRNA expression of RBM4 and PKM1 was also significantly higher in the 3G group than in the 1G group after 10 days of induction.

Conclusions: The induction of neuronal differentiation under 3G conditions can enhance expression of neuron-related genes via upregulating RBM4 and PKM1, promoting the neural differentiation of hbMSCs.

緒言：様々な物理的刺激が、細胞の増殖や分化に関与する分子カスケード内の生化学的シグナルを制御し、組織の構造や機能が変化することが明らかになっている。近年、物理的刺激の中でも重力に着目した研究が注目されている。宇宙空間での重力環境を再現した模擬微小重力（MG： $10^{-3}G$ ）環境が細胞レベルで人体に影響を与え、幹細胞の分化制御や形態構造の変化にも関与しているという報告が増加している。先行研究において、幹細胞の分化制御が幹細胞の移植効果を向上させるために極めて重要であることが指摘されている。我々はこれまでに、MG環境が間葉系幹細胞（MSCs）の未分化維持に有用であること、中枢神経系疾患モデルの運動機能改善効果を高めること、MSCsの神経分化に影響を与える可能性があることを示した。しかし、通常重力（1G）環境よりも重力負荷を加えた過重力環境が、MSCsの分化制御において、骨および筋芽細胞への分化を促進するという報告があるものの、神経再生に関わる神経分化に及ぼす影響については明らかにされていない。したがって、本研究では、1Gまたは過重力（3G）環境下で、MSCsの神経分化を誘導し、それぞれの神経分化能を比較、検討した。

方法：ヒト骨髄由来MSCs（hbMSCs）に対し、重力制御装置 Gravite®を用いて、1Gまたは3G条件下で10日間の神経分化誘導を行い、それぞれを1G群および3G群とした。誘導3、10日後にそれぞれの条件下で分化誘導したhbMSCsを回収し、トリパンブルー染色により細胞数と生存率を計測した。また、回収したhbMSCsからtotal RNAを抽出し、相補的DNA（cDNA）を作製した。リアルタイム-ポリメラーゼ連鎖反応（Real time-PCR）を用いて、神経細胞関連遺伝子としてネスチン（NES）、クラスIIIβチューブリン（TUJ1）、ASCL1、微小管結合タンパク質2（MAP2）、ニューロフィラメント中鎖（NF-M）、ニューロフィラメント重鎖（NEFH）の発現を、神経分化制御遺伝子としてRNA結合タンパク質4（RBM4）、ポリピリミジン配列結合タンパク質（PTB）、ピルビン酸キナーゼM1, 2（PKM1, 2）の発現を解析した。さらに、蛍光免疫染色を用いて、誘導10日後のhbMSCsにおけるNF-M陽性細胞率を評価した。

結果：10日間神経分化誘導したhbMSCsにおいて、神経細胞関連遺伝子NES、TUJ1、ASCL1のmRNA発現は、1G群と3G群ともに分化誘導に伴う有意な変化はみられなかった。一方で、MAP2、NF-M、NEFHのmRNA発現は分化誘導に伴い有意に増加し、誘導10日後では1G群よりも3G群で有意に高値を示した。さらに蛍光免疫染色によるNF-M陽性細胞率は、誘導10日後において1G群よりも3G群で有意に高値を示した。また、神経分化制御に関与するRBM4およびPKM1のmRNA発現も分化誘導に伴い有意に増加し、誘導10日後において1G群よりも3G群で有意に高値を示した。

考察：本研究では、hbMSCsの神経分化誘導に過重力環境がどのような影響を与えるか検討した。1G環境下よりも3G環境下において、神経細胞関連遺伝子MAP2、NF-M、NEFHのmRNA発現量やNF-M陽性細胞率が有意に高値を示した。MAP2、NF-M、NEFHは神経分化の後期に成熟した神経細胞で特異的に発現することが知られている。MSCsの神経分化に関連するシ

グナル伝達や遺伝子発現の制御に、物理的刺激による培養環境の変化が関与し、神経分化に影響を与えることが報告されている。したがって、3G環境が神経分化後期における遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。

また、3G環境下において、MSCsの神経分化において重要な役割を担うRBM4およびPKM1の発現が1G環境下よりも有意に増加することが明らかになった。RBM4は、スプライシング制御によるPKM1の発現増強を介してMSCsの神経分化を促す役割を果たすことが報告されている。本研究により、3G環境下での神経分化誘導はRBM4の発現を活性化し、hbMSCsの神経分化を促進する可能性が示唆された。

結論：過重力（3G）環境下での神経分化誘導は、hbMSCsにおけるRBM4およびPKM1の発現増強を介して神経関連遺伝子MAP2、NF-M、NEFHの発現を高め、神経分化を促進する可能性が示唆された。hbMSCsは神経再生医療分野で臨床応用される幹細胞の一つであり、その神経分化のメカニズムを解明することは、臨床応用される様々な幹細胞の分化誘導期間の短縮および分化制御の効率化に寄与する可能性がある。