

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05173

研究課題名(和文) 生体内間葉系幹細胞の可視化による未分化性維持と細胞運命トレーシング

研究課題名(英文) Maintenance of undifferentiated state and cell fate tracing by visualization of mesenchymal stem cells in vivo

研究代表者

松崎 有未 (Matsuzaki, Yumi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：50338183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではMSCの未分化性維持や分化の方向決定における分子機構を体系的に解明することにより、幹細胞・前駆細胞・成熟細胞の未分化性維持、分化の方向性決定をコントロールするメカニズムをin vivo・in vitro両面から理解する試みを行った。その結果、FZD5およびNotch2の強制発現およびノックダウンにより、FZD5は非古典経路を活性化することによって細胞老化を抑制すること、Notch2は低酸素条件下で発現が上昇し、細胞増殖を誘導することが明らかになった。さらにMSC特異的遺伝子発現調節領域を用いたレポーター遺伝子導入マウスを作成し、その発現が未分化MSCに限局することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのMSC研究は培養MSC又は不死化した細胞株を用いた実験に頼らざるを得ず、得られた結果が真にMSCの性状を反映したものは不明であった。また、生体内での性状解析もほとんど解析されて来なかった。本研究では、高純度のヒトMSC(REC)を用いて未分化性維持機構の解析を行った。さらに、独自に開発したレポーターマウスを用いて、MSCからの間質細胞への細胞系譜の可視化と動態の解析を行った。これらのアプローチは、個々の細胞が持つ性質を解析する上で生理的条件に最も近く、間葉細胞系譜の生理機能を本質的に理解するには必要かつ適切であり、学術的ばかりでなく、安全な先進医療を確立する上でも大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：By systematically elucidating the molecular mechanism in determining the undifferentiated maintenance of MSC and determining the direction of differentiation in this study, the mechanism to control the undifferentiated maintenance of stem cells / progenitor cells / mature cells and the directionality of differentiation is inscribed. An attempt was made to understand both in vivo and in vitro. As a result, FZD5 suppresses cellular senescence by activating the non-classical pathway by forced expression and knockdown of FZD5 and Notch2, and that Notch2 is upregulated under hypoxic conditions and induces cell proliferation. It became clear. Furthermore, we generated a reporter transgenic mouse using MSC specific gene expression regulatory region and clarified that its expression is localized to undifferentiated MSC.

研究分野：幹細胞生物学

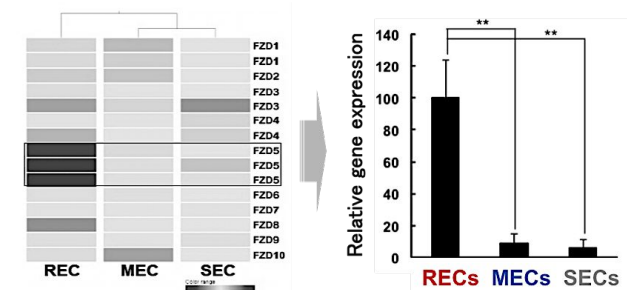
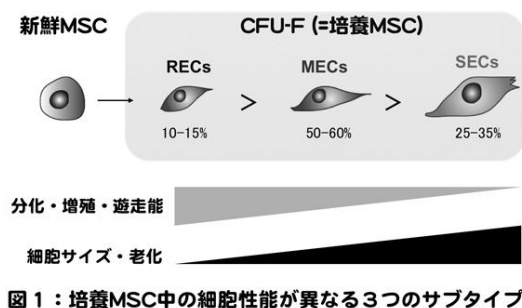
キーワード：間葉系幹細胞 未分化性維持 Wntシグナル Notchシグナル レポーター遺伝子 体内動態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) は様々な培養条件下におくことで、間質細胞のみならず神経 (Kondo PNAS 2005)・骨筋筋 (Dezawa Science 2005)・心筋 (Miyahara Nature Med 2006)などをはじめとする様々な細胞への分化能を示すことから、これらの組織の難治性疾患に対する細胞移植療法のための魅力的な細胞ソースとして注目され、臨床応用を目指した研究が国内外で盛んに行われているが、培養 MSC の性状解析で得られた結果が必ずしも MSC そのものの性状を反映するとは限らないという問題点が指摘されている。また生体内での局在や細胞機能など *in vivo* 動態の解析はほとんど行われていない。このような理由から、純度の高い MSC を用いての遺伝子・タンパク発現や生理機能の解析、あるいは特異的レポーター遺伝子を用いた可視化による体内動態の解析など、安全で効率的な臨床応用のために必須である基礎的知見の蓄積と研究基盤開発が望まれている。

そこで申請者らは Flow cytometry (FCM) を駆使し、MSC に特徴的な細胞表面マーカー探索を行い、ヒトおよびマウス骨髄細胞より極めて高純度な MSC の単離法を確立した (Morikawa, J Exp Med, 2009, Mabuchi, Stem Cell Reports, 2013)。この単離法により得られた MSC には増殖速度、細胞形態の異なる 3 種類のサブタイプ (REC: Rapidly Expanding Cells; MEC: Moderately Expanding Cells; SEC: Slowly Expanding Cells) があり、その内の REC のみが高い未分化性を有していることを見出した (図 1)。各サブタイプの細胞機能の違いをもたらす分子メカニズムを明らかにするため、網羅的遺伝子発現解析から REC 特異的に高発現を示す 18 遺伝子を同定した。その中でも、Frizzled family receptor 5 (*FZD5*) と Notch2 は REC と MEC/SEC 間で特に顕著な差が見られた遺伝子の一つで、REC の未分化状態維持と増殖および遊走能維持に Wnt/Notch シグナル経路が強く関与していることが示唆された (図 2)。



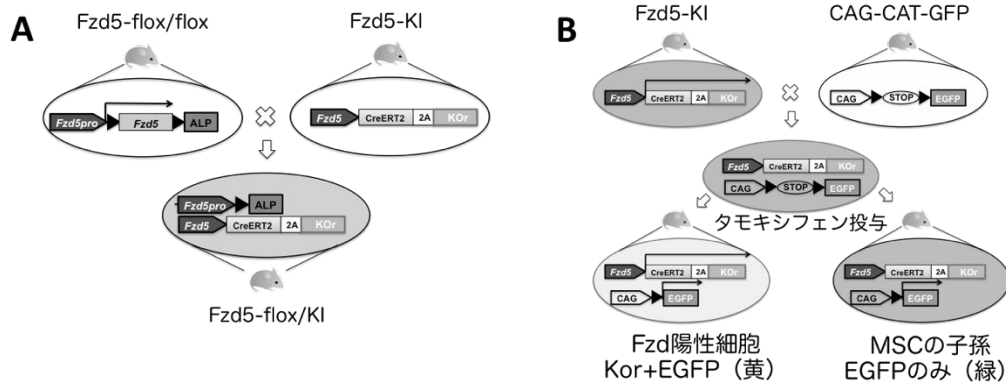
## 2. 研究の目的

骨髄中には造血幹細胞に加え、**間葉系幹細胞**(Mesenchymal Stem Cells: **MSC**)が存在しており、脂肪・軟骨・骨など間質細胞への分化能を持つことが知られている。申請者らはこれまでに骨髄中に存在するマウスおよびヒト間葉系幹細胞(MSC)の選択的マーカーを標識に、フローサイトメトリーを用いて骨髄から直接分離する手法を開発した。本研究では、高純度未分化 MSC で特異的に発現する遺伝子 *FZD5* および *Notch2* の機能解析により、未分化性維持機構を明らかにし、臨床応用においてより安全な MSC を選択できるようにする。特異的遺伝子発現調節領域を用いたレポーター遺伝子導入マウスを用いて、MSC とその細胞系譜にある子孫細胞の細胞運命をトレースすることで、これまで明らかでなかった細胞起源や、創傷・慢性炎症・炎症性発癌モデル動物における炎症・再生へどのように関与するかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では申請者らが開発した細胞分離技術やレポーター遺伝子群を活用し、MSC の未分化性維持や分化の方向決定において、Wnt/Notch シグナルがもたらす分子機構を体系的に解明することによって、幹細胞・前駆細胞・成熟細胞のふるまい (未分化性維持、分化の方向性決定) をコントロールするメカニズムを *in vivo*・*in vitro* 両面から理解する。その具体的な方法として、shRNA・CRISPR 等を用いた遺伝子発現抑制および全長 cDNA 強制発現による影響など *in vitro* での機能検討を行うと共に、レポーター遺伝子導入動物を用いた *in vivo* 解析を並行して行う。具体的にはマウス MSC 特異的な *Fzd5* 遺伝子座へ CreERT2-KOr (KOr: Kusabira Orange) のカセットをノックイン (KI) し、タモキシ

フェン投与によって任意の時期に MSC 特異的に Cre と蛍光タンパクを発現させることを目指す。Fzd5-KI マウスはすでに作製済みであり、Notch2 および Fzd5 の flox マウスと交配を行い、MSC 特異的に Fzd5 および Notch2 をノックアウトすることで、*in vivo* における幹細胞の未分化性維持に両遺伝子がどのように関与しているかを明らかにする（下図 A）。さらに Fzd5-KI と CAG-loxP-CAT-loxP-GFP を交配し、その時点でマーカー遺伝子が発現している細胞（MSC）と過去に発現していた細胞（子孫細胞）を検出し細胞運命トレースを行う（下図 B）。この手法を用い、生体骨髄内 MSC の発生起源を探ると共に正常時および炎症免疫反応時に骨髄から遊走する MSC の末梢動態解析により、これまで不明であった MSC の生体内での生理機能を明らかにする試みを行った。



A: Fzd5-flox/flox に対する MSC 特異的遺伝子ターゲティング

B: レポーター遺伝子導入動物による細胞運命トレース

#### 4. 研究成果

##### (1) MSC の未分化性維持および分化の方向性を決定する機序の検討

###### Fzd5 および Notch2 の loss/gain of function による機能解析

MSC の *in vitro* における未分化性維持と Notch/Wnt の関係性を明らかにするため、候補遺伝子の shRNA・CLISPR もしくは全長 cDNA を発現ベクターに組み込み、これを Wnt/Notch 下流レポーター遺伝子と共に MSC クローンに導入後、*ex vivo* 増殖能解析や骨・軟骨・脂肪へ *in vitro* で分化させることで、遺伝子発現を抑えた状態、または過剰に発現させた状態、それぞれの増殖・分化能に対する影響を解析した。その結果、Notch2 および Fzd5 の発現抑制により MSC の自己複製能が著しく阻害されることが明らかになった（Harada et al Stemcells リバイス中）。

###### Fzd5 および Notch2 コンディショナルノックアウトマウスの解析

Notch2 KO マウスは神経系の発生異常により胎生致死となる。コンディショナル KO マウス (McCright Genesis 2006) もすでに作製され、骨芽細胞特異的に Cre を発現させた場合に骨過形成が起こる (Hilton Nat Med 2008)。しかし MSC 特異的に Cre を発現させ、ターゲティングした例は報告されておらず、成体骨髄 MSC における Notch2 の機能は不明である。また Fzd5 に関しても同様で、生体骨髄 MSC における機能は明らかではない。そこで Notch2 および Fzd5-flox マウスに対し MSC 特異的に Cre を発現させることで、Notch/Wnt シグナルが MSC に与える影響を明らかにする下記の試みを行った。

- MSC 特異的に CreERT2-KOr を発現するマウス(Fzd5-Tg)を作成した。F0 において Cre 活性が認められた系統より F1-F2 交配を行い、現在大きく 4 系統について Cre 活性の検出および発現局在の検討を行っている。
- 他グループより報告された MSC を含む造血支持細胞全般で Cre を発現させることのできる LepR-Cre および Prx1-Cre マウスを用い、LepR と Prx1 の発現を Fzd5 と比較したところ、発現がより広汎で MSC に特異的ではないが、血球系細胞での発現は見られないことから、MSC とその子孫細胞で蛍光タンパクを発現させる、という我々の目的には充分利用可能と考えた。そ

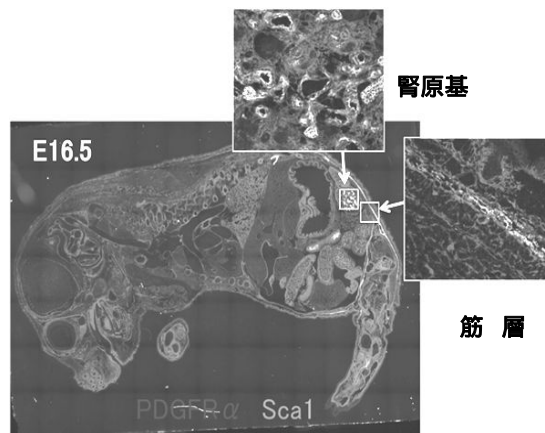
ここで Prx1-Cre マウス(DeFalco J Science 2001, Logan Genesis 2002)と Fzd5 flox/flox マウスの交配を行った結果、E11.5 において神経管閉鎖不全が認められ、胎生致死であることが明らかとなった。

### 胎児期における MSC の細胞運命トレース

胚発生におけるMSCの起源は意外にも不明で、神経堤・沿軸中胚葉など諸説あるが、この2者の関与はごく一部で、成体骨髄中の大部分のMSCはそのいずれからも派生しない (Morikawa BBRC 2009, Niibe I&R 2011)。

マウスMSCマーカー (PDGFR Sca-1共陽性 : P S) を発現する細胞の胎生期における局在を蛍光免疫組織学的に解析したところ、E11.5-E15.5ではP S細胞が全く検出されず、E16.5に初めて背部筋層直下に出現することが判明した (右図)。

現在1)で作製したFzd5-TgマウスとCAG-CAT-GFPマウスを交配し、妊娠マウスに対しタモキシフェンをE11.5-16.5にかけて一過性に投与することで、胎生期から成体にかけてのMSCの全身組織への分布を経時的に解析し、不明だった成体骨髄MSCの発生源を解明する試みを行っている。



PDGFR と Sca1 の免疫染色(E16.5)

P S細胞はE16.5で筋層直下に整列する。

腎原基ではSca1単独陽性細胞のみが検出

### マウス骨髄由来間葉系幹細胞の幹細胞性維持における活性酸素種の影響

骨髄由来間葉系幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、また抗炎症作用を有するとして再生医療における大変魅力的な医療材料となることが期待されている。これまでに骨髄内の低酸素環境が幹細胞性の維持に関与していることが示唆されているが、その詳細な機構は明らかでない。そこで、マウス骨髄由来間葉系幹細胞を用いて幹細胞性の維持に関わるシグナル経路を明らかにすることを試みた。

C57BL/6J野生型雌マウス(6-8週)の腹腔内に細胞内低酸素を検出するHypoxypromerを投与した後、フローサイトメーターによる解析の結果、大部分の間葉系幹細胞は低酸素環境下に存することが確認された。次に、単離した間葉系幹細胞を大気下環境(21%酸素濃度)および低酸素環境(1%酸素濃度)で培養し、細胞増殖能および脂肪・骨分化能を比較した。その結果、低酸素下培養の方が細胞増殖能、脂肪分化能および骨分化能がより長期に渡り維持されることが示された。

以上の実験結果により、間葉系幹細胞の低酸素下における細胞増殖にはNotch-c-Myc経路が関与していること、Notchシグナル伝達経路が間葉系幹細胞の幹細胞性維持に密接に関与していることが示された。ヒトではNotch2遺伝子異常を有するHajdu-Cheney症候群と、NotchのリガンドであるJagged1(JAG1)遺伝子異常を有するAlagille症候群が知られている。これらはいずれも骨形成異常を示し、ヒトにおいてもNotch2シグナル伝達経路が骨形成に関与している可能性がある。今回の研究でNotch2-c-Myc経路以外のシグナル伝達に関与も考えられるが、同シグナル伝達がマウス骨髄由来間葉系幹細胞の幹細胞性維持を一部担っていることが示唆された。以上の成果はProsOne誌に掲載された。

### (2) ヒト歯髄幹細胞の同定分離

(hDPSC)は増殖能が高く、智歯などの抜去歯より比較的採取しやすいため、再生医療に用いるマテリアルとして有用であると考えられる。しかしながら、従来の接着培養法によるhDPSCの分離では、血球系や成熟細胞等の他の細胞が混入し、分離培養した細胞間で増殖能や骨形成能に差が生じる可能性がある。そこで、予期的に高純度のhDPSCを分離する手法の確立を目指し、フローサイトメーターを用いてヒト歯髄幹細胞特異的な細胞表面マーカーの同定を行った。歯髄組織より培養を経ることな

く直接的にフロサイトメトリーにて分離したところ、骨髄にはない分画に存在する LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup>+ hDPSCが高いコロニー形成能および間葉系幹細胞マーカーの発現を示した。この細胞はマウス頭蓋骨欠損モデルに移植すると他分画の細胞と比較して高い増殖能を示し、長期生存する。またμCTを用いて骨形成量について評価を行ったところ、高い骨形成能を示した。以上より、LNGFR<sup>Low</sup> THY-1<sup>High</sup> hDPSCは骨再生治療のマテリアルとして有用である可能性が示唆された。以上の成果はJournal of Dental Research誌 (IF: 4.688)に掲載済み。

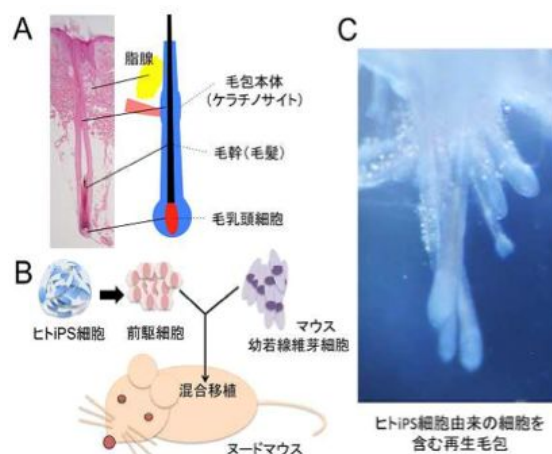
### (3) ドナー由来間葉系幹細胞が引き起こす組織線維化メカニズム

全身の線維化は、自己免疫疾患が持つ特徴の1つで、免疫系が自己の細胞を異物と誤って認識し、体の結合組織を攻撃することによって生じる。T細胞をはじめとした免疫担当細胞が結合組織に集積して、特に強皮症では皮膚硬化をきたすが、これまで何が個体の結合組織にT細胞を集積させるのか不明な部分があった。我々は主要組織適合抗原は一致しているものの、マイナー組織適合抗原は不一致である骨髄移植後に強皮症様の症状を呈する病態モデルマウスを用い、ドナー骨髄細胞中に含まれる間葉系幹細胞がレシピエント体内でT細胞を活性化し、過剰な免疫応答を引き起こすことで強皮症に極めて類似した所見を呈することを明らかにした。以上の成果はELife誌に掲載済み。

### (4) ヒト iPS 細胞を用いた毛包の部分再生

ヒトiPS細胞からケラチノサイトになる手前の様々なものになる余力を残した前駆細胞を誘導し、それを用いて毛包の再生を試みた。

まず異なるドナーから作成された3つの系統のヒトiPS細胞を、ケラチノサイトへの分化を促進する条件で培養し、ケラチノサイトになる手前の前駆細胞を作製した。次にヒト毛乳頭細胞と3系統のヒトiPS細胞由来の前駆細胞を一緒に培養したところ、ヒトiPS細胞株201B7から得た前駆細胞が毛乳頭細胞と最も良好に相互作用することが判明した。さらに201B7 iPS細胞株由来前駆細胞と毛を誘導する能力の高いマウスの幼若線維芽細胞を混合して免疫不全マウスの皮下に移植したところ(図B)、2-3週間後に毛包の構造が再現された(図C)。



ヒト iPS 細胞を利用して毛包を再生できる可能性が示され、脱毛症の病態研究、再生医療の実現に向けての一助となると思われる (Veraitch O et al, Scientific Report, 2017)。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計8件)

1. Bai Y, Sha J, Kanno T, Miyamoto K, Hideshima K, Matsuzaki Y. Comparison of the Bone Regenerative Capacity of Three-Dimensional Uncalcined and Unsintered Hydroxyapatite/Poly-d/l-Lactide and Beta-Tricalcium Phosphate Used as Bone Graft Substitutes. J Invest Surg. 23:1-14, 2019.
2. Bai Y, Kanno T, Tatsumi H, Miyamoto K, Sha J, Hideshima K, Matsuzaki Y. Feasibility of a Three-Dimensional Porous Uncalcined and Unsintered Hydroxyapatite/poly-d/l-lactide Composite as a Regenerative Biomaterial in Maxillofacial Surgery. Materials. 11(10): E2047, 2018
3. Veraitch O, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Sasaki T, Okuno H, Tsukashima A, Amagai M, Okano H, Ohyama M. Induction of hair follicle dermal papilla cell properties in human induced pluripotent stem cell-derived multipotent LNGFR(+) THY-1(+) mesenchymal cells. Sci Rep. 7: 42777, 2017.
4. Yasui T, Mabuchi Y, Morikawa S, Onizawa K, Akazawa C, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. Inflamm Regen. 10(37):8, 2017.

5. Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi H, Ebine T, Niibe K, Houlihan DD, Morikawa S, Onizawa K, Kawana H, Akazawa C, Suzuki N, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration. J Dent Res. 95(2): 206-214, 2016.
6. Ogawa Y, Morikawa S, Okano H, Mabuchi Y, Suzuki S, Yaguchi T, Sato Y, Mukai S, Yaguchi S, Inaba T, Okamoto S, Kawakami Y, Tsubota K, Matsuzaki Y, Shimmura S. MHC-compatible bone marrow stromal/stem cells trigger fibrosis by activating host T cells in a scleroderma mouse model. Elife. 26(5): e09394, 2016.
7. Sato Y, Mabuchi Y, Miyamoto K, Araki D, Niibe K, Houlihan DD, Morikawa S, Nakagawa T, Nakajima T, Akazawa C, Hori S, Okano H, Matsuzaki Y. Notch2 Signaling Regulates the Proliferation of Murine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells via c-Myc Expression. PLoS One. 11(11): e0165946, 2016.
8. Mabuchi Y, Matsuzaki Y. Prospective isolation of resident adult human mesenchymal stem cell population from multiple organs. Int J Hematol. Feb;103(2):138-44, 2016.

〔学会発表〕(計9件)

1. Purified human bone marrow derived mesenchymal stem cell “REC”, Asian cellular therapy organization, ACTO 2018, Technical Seminar
2. Human cell therapy by purified human bone marrow derived stem cells, 中日免疫医学峰会(天津) 特別講演
3. 『超高純度ヒト間葉系幹細胞 "REC"』 第38回 日本炎症再生学会 教育講演
4. 『超高純度ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の分離とその性状解析』 日本放射線影響学会第60回大会 幹細胞シンポジウム
5. 『超高純度間葉系幹細胞の分離とその臨床応用への展望』 第22回東海 HSCT 懇話会 特別講演
- 6.
7. 『超高純度ヒト間葉系幹細胞 "REC" ～再生医療に向けて』 第39回 日本炎症再生学会 教育講演
8. 『間葉系幹細胞分離とトランスレーションへの挑戦』 第28回 日本フローサイトメトリー学会学術集会 会長講演
9. 『超高純度ヒト間葉系幹細胞 "REC" による希少疾患治療展望』 第8回細胞再生医療研究会 シンポジウム1

〔産業財産権〕

出願状況(計6件)

- 伊谷有未、馬淵洋、岡野栄之；公開番号：再表 2016 - 017795；出願人：PuREC(株)；出願日：H27.7.31；発明の名称：ヒト間葉系幹細胞の品質評価方法、ヒト間葉系幹細胞の分離、選別及び培養方法並びに増殖の早いヒト間葉系幹細胞の細胞集団；国際公開番号：W0.2016017795.A1、米国公開番号：US.2017204374.A1、欧州公開番号：EP.3176253.A4、カナダ公開番号：CA.2954245.A1、シンガポール公開番号：SG.11201610795V.A、オーストラリア公開番号：AU.2015297347.A1

取得状況(計1件)

- 伊谷有未、馬淵洋、岡野栄之；出願人：伊谷有未；特許第 6463029 号；出願日：H26.8.1；発明の名称：ヒト間葉系幹細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体並びにこれを用いたヒト間葉系幹細胞の分離及び/または品質評価を行う方法

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし