

令和元年6月4日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10376

研究課題名(和文)次世代間葉系幹細胞の作成と機能制御

研究課題名(英文)Functional regulation and production for next-generation of mesenchymal stem cells

研究代表者

田嶋 克史(Tajima, Katsushi)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80292423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞から間葉系幹細胞(iMSCs)を誘導することは、大量で均一な利用可能な間葉系幹細胞を得る上で、組織抽出間葉系幹細胞に代わる魅力的な方法である。適切な培養基材を利用することでiMSCsの増殖・分化を制御出来る。本研究では、適切な培養基材を利用することで簡便かつ効果的なマウスiMSCs誘導法を確立した。

これらのiMSCsは放射線照射された細胞の細胞死を保護する作用があった。我々が確立した本手法は、種々の動物モデルに利用可能なツールとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞(MSC)は多分化能、抗炎症作用、血管新生、組織損傷部位へのホーミング等の生物活性を示すことから、放射線障害をはじめとした様々な病態の細胞治療ソースとして注目を集めてきた。一方、由来組織(骨髄、脂肪、臍帯)、培養条件により分泌因子の産生性や選択性が制限されることも知られている。これらの理由により、個々の研究の正確な比較を困難にしてきた。また投与されたMSCが、期待された効果を示さず反対の作用を示すこともあり、臨床応用上、問題となっていた。本研究では、iPS細胞から人為的にMSCを誘導することで、生物活性を自在に制御できる次世代型の間葉系幹細胞の創生した。

研究成果の概要(英文)：The generation of induced-pluripotent stem cells (iPSCs)-derived mesenchymal stem cells (iMSCs) is an attractive and promising approach for preparing large, uniform batches of applicable MSCs that can serve as an alternative cell source of primary MSCs. Appropriate culture surfaces may influence their growth and differentiation potentials during iMSC derivation. In the present study, we established the simple and effective derivation method for mouse iMSCs using extracellular component as gelatin.

The iMSCs provide with several biological activities including protecting radiation-exposure cells.

The mouse iMSCs established by this method can be used as a tool for to precisely analyzing anti-inflammatory or immunoregulatory roles of MSCs in a congenic mouse models, in addition to serving as an alternative cell source of primary MSCs and an off-the-shelf product.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 放射線障害 再生医療 相同組み換え

## 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) は多分化能、抗炎症作用、血管新生、組織損傷部位へのホーミング等の生物活性を示すことから、放射線障害をはじめとした様々な病態の細胞治療ソースとして注目を集めてきた。MSC の培養上清でも同様の生物作用が得られることから、その生物作用の大部分は産生分泌因子 (蛋白、miRNA、エクソゾーム等) によると考えられている。また MSC は投与された環境に応じた分泌因子セットを選択的に産生する細胞特性が指摘されている。一方、由来組織 (骨髄、脂肪、臍帯) 培養条件により分泌因子の産生性や選択性が制限されることも知られている。そのため MSC は、緩やかな共通の細胞特性を持った多様な細胞集団と考えられている。これらの理由により、研究者が扱う MSC の培養条件や由来組織が異なるため、反対の結果や、個々の研究の正確な比較を困難にしてきた。また投与された MSC が、期待された効果を示さず反対の作用を示すこともあり、臨床応用上、問題となっていた。そのため、有効かつ安全な MSC 細胞治療を推進するには、今までの漠然とした MSC のもつ細胞特性を期待して投与してから効果を待つのではなく、その多様性や細胞特性を制御する分子機構の解明に基づいた、より正確かつ安全で病態に特化した次世代型の MSC 細胞治療の開発が望まれる。

### 2. 研究の目的

間葉系幹細胞 (MSC) は投与環境下に適応して抗炎症、血管新生等を担う分泌因子を選択的に産生する細胞特性を持つことから様々な病態の修復細胞として注目されている。一方、その由来組織 (骨髄・脂肪) 培養法により生物活性に著しい差があり多様性も指摘されているが、細胞特性、多様性をもたらす分子機構は不明であった。MSC の生物活性は前駆体蛋白として産生させる多くの分泌因子が、9 種類あるプロ蛋白質転換酵素 (PCSK) ファミリーの修飾を受けることで変化する事が知られる。本研究では、MSC の細胞特性、多様性の分子機構を解明すること、iPS 細胞から人為的に MSC を誘導することで、生物活性を自在に制御できる次世代型の間葉系幹細胞の創生を目指す。

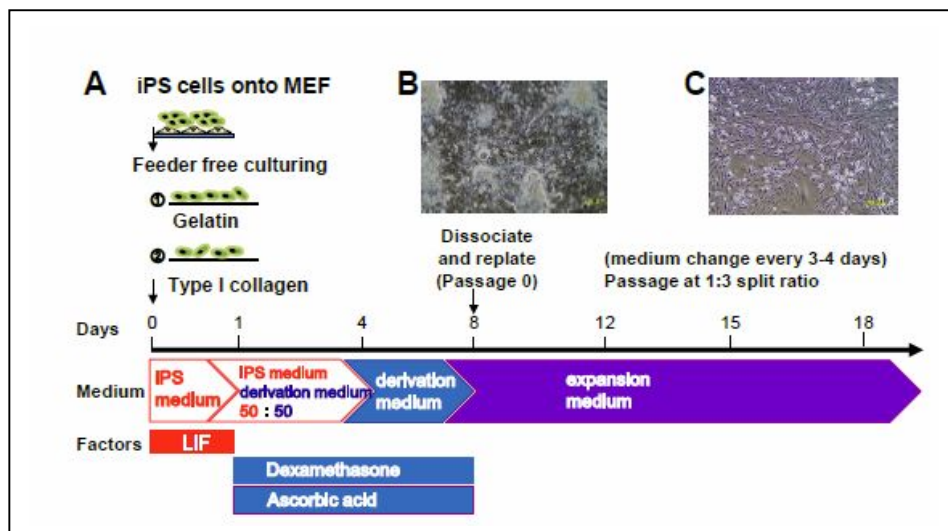
### 3. 研究の方法

(1) ヒト及びマウス iPS 誘導 MSC から MSC を誘導する系を確立する。誘導された MSC の性状をフローサイトメトリー、増殖能、継代数による変化で評価する。

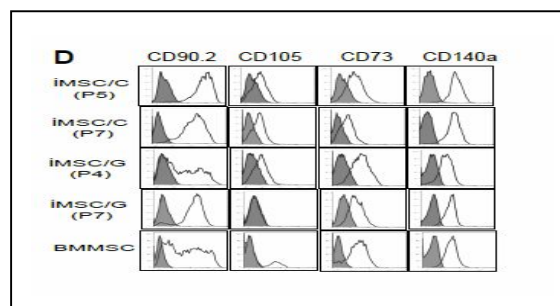
(2) 生物活性は、照射細胞死抑制効果、皮膚及び腸管放射線障害モデルマウスで評価する。

### 4. 研究成果

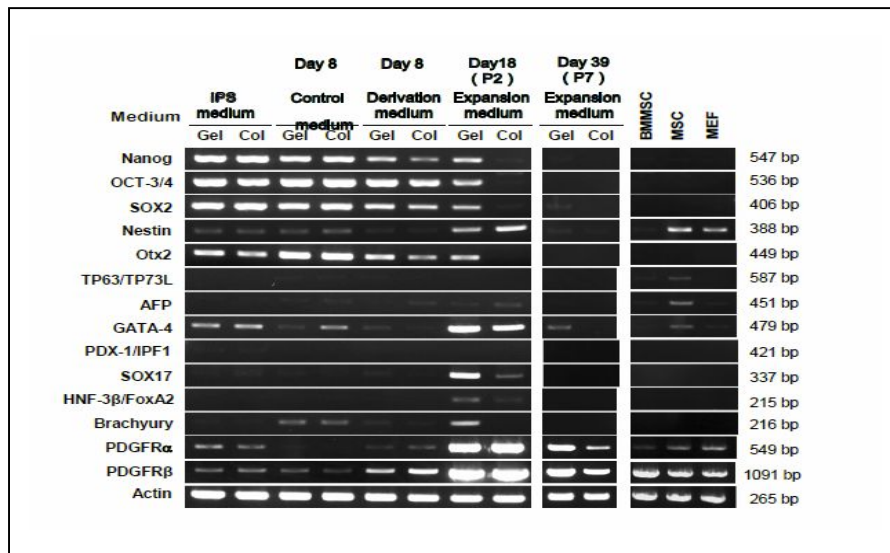
(1) マウス iPS 細胞から均一な MSC (iMSCs) を誘導する系を確立した。(図 1)



(2) iMSCs は骨髄 MSC (BMMSC) と同様の表面マーカーを示した。iMSCs は 7 継代まで、増殖・維持出来た。(図 2)

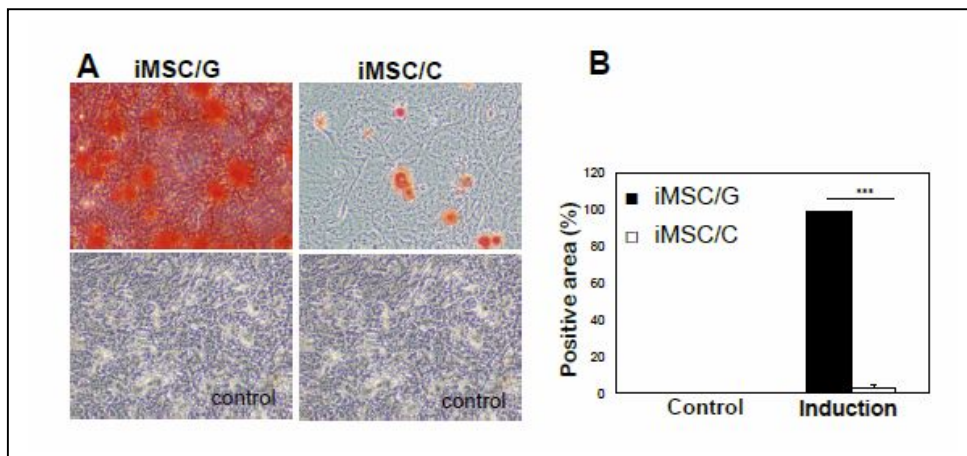


( 3 ) iPS から iMSC に誘導される過程で、*Nanog*, *Oct4*, *Sox2* の遺伝子発現は減少、一方、*Nestin*, *GATA-4* は増加した。中胚葉マーカーの *Brachyury*, *PDGF- $\alpha$* , *PDGF- $\beta$*  の遺伝子発現も増強した。

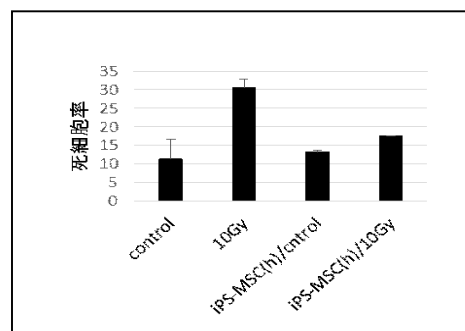


( 4 ) microarray により、iPSCs、BMMSCs、iMSCs の遺伝子発現パターンを比較した。その結果、BMMSC と iMSCs の間葉系幹細胞に発現する遺伝子群に関して、発現パターンは類似していた。

( 5 ) iMSCs は分化誘導培地で骨、軟骨、脂肪に分化した。各系統への分化は collagen と gelatin 上で異なった。Gelatin では骨への分化、collagen では脂肪への分化が促進された。



( 6 ) iMSCs は照射ヒト臍帯血血管内皮細胞の細胞死を液性因子 X により抑制した。iMSCs は BMMSCs 同様の生物活性を示した。( 図 4 )



( 7 ) 放射線障害消化管マウスモデルを確立した。iMSs を腹腔内、静脈に投与することにより、小腸絨毛細胞のアポトーシスを抑制すること、絨毛長を維持すること、これらの効果は iMSC が放出する X によることを明らかにした。同様の効果は、iMSCs 培養上清でも認められた。

( 8 ) 外傷を伴った放射線障害皮膚モデルマウスを作成した。iMSCs 局所注射により、外傷は

早期に改善した。

<引用文献>

Obara C, Takizawa K, Tomiyama K, Hazawa M, Saotome-Nakamura A, Gotoh T, Yasuda T, Tajima K. Differentiation and Molecular Properties of Mesenchymal Stem cells Derived from Murine Induced Pluripotent Stem Cells Derived on Gelatin or Collagen. Stem Cells International 査読有 2016, Article ID 9013089, 10 pages

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Takeshi Yasuda, Wataru Kagawa, Tomoo Ogi, Takamitsu A. Kato, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Kazuya Takizawa, Yuka Nakazawa, Matthew D. Genet, Mika Saotome, Michio Hama, Teruaki Konishi, Nakako Izumi Nakajima, Masaharu Hazawa, Masanori Tomita, Manabu Koike, Katsuko Noshiro, Kenichi Tomiyama, Chizuka Obara, Takaya Gotoh, Ayako Ui, Akira Fujimori, Fumiaki Nakayama, Fumio Hanaoka, Kaoru Sugawara, Ryuichi Okayasu, Penny A. Jeggo, Katsushi Tajima. Novel function of HATs and HDACs in homologous recombination through acetylation of human RAD52 at double-strand break sites. PLoS Genet 14(3): e1007277. 査読有 March 28, 2018.

Takeshi Yasuda and Katsushi Tajima. MultiSite Gateway Technology Is Useful for Donor DNA Plasmid Construction in CRISPR/Cas9-Mediated Knock-In System. IntechOpen DOI: 10.5772/intechopen. 査読有 80775, 2018

Obara C, Takizawa K, Tomiyama K, Hazawa M, Saotome-Nakamura A, Gotoh T, Yasuda T, Tajima K. Differentiation and Molecular Properties of Mesenchymal Stem cells Derived from Murine Induced Pluripotent Stem Cells Derived on Gelatin or Collagen. Stem Cells International 査読有 2016, Article ID 9013089, 10 pages

Hazawa M, Yasuda T, Saotome-Nakamura A, Tomiyama K, Obara C, Goto T, Tajima K. Intra- and extracellular plasminogen activator inhibitor-1 regulate effect of vitronectin against radiation-induced endothelial cell death. Vascular Pharmacology 査読有 87: 150-158. 2016

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

安田 武嗣 (YASUDA takeshi)

国立研究開発法人量子科学技術開発機構・放射線医学総合研究所・放射線障害治療研究部・主任研究員

研究者番号：60332269

小原千寿香 (OBARA chizuka)

国立研究開発法人量子科学技術開発機構・放射線医学総合研究所・放射線障害治療研究部・主任研究員

研究者番号：90415977

滝澤和也 (TAKIZAWA kazuya)

国立研究開発法人量子科学技術開発機構・放射線医学総合研究所・放射線障害治療研究部・研

究員

研究者番号：20739388

富山健一 (TOMIYAMA kenichi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 薬物依存研究部・研究員

研究者番号：20584064

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。