

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19191

研究課題名(和文)新規膜貫通タンパク質Teneurin-4による、間葉系幹細胞の移植効率評価

研究課題名(英文) Evaluation of MSCs transplantation efficacy with Teneurin-4 as a surrogate marker

研究代表者

須藤 絵里子グレース (SUTO, ErikoGrace)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト助教

研究者番号：60748367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、間葉系幹細胞(MSC)の移植効率を反映するサロゲートマーカーを明らかにすることを目的としている。一般的なMSCの分離法は、組織から得られる雑多な細胞集団を接着培養するというものである。しかしこの手法では、長期の細胞培養が必要な上、MSC以外の細胞の混入が避けられない。より有効性の高い細胞を分離するため、組織中の細胞を選択的に分離する「新鮮純化法」を開発した。新鮮純化MSCはTen-4を高発現している。この方法によって骨髄MSCを高効率に純化できるという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

本研究において、ヒト、マウス、ラットの間葉系幹細胞をを高純度に分離するマーカーとしてCD73の同定に成功した。この方法によって分離された間葉系幹細胞のラットへの移植実験により、移植効率が向上することを明らかにした。CD73は間葉系幹細胞のユニバーサルマーカーとなりうる可能性が示唆された。ヒト間葉系幹細胞を用いた移植治療への有用な分離方法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), which reside in the bone marrow (BM) and various other tissues, can self-renew and differentiate into mesenchymal lineages. Many groups have obtained rat MSCs (rMSCs) by maintaining adherent cells on a culture dish for several weeks. However, MSCs gradually differentiate during expansion and exhibit altered proliferation rates, morphological features and functions in vitro. Here, on the basis of CD73 expression, we prospectively isolated a population with a high colony-forming ability and multi-lineage potential from the rBM. Successful engraftment of rMSCs was achieved by using a fluorescence-conjugated anti-CD73 antibody. In humans and mice, MSCs were also purified from BM and fat by CD73 expression, thus suggesting that CD73 may serve as a universal marker for prospective isolation of MSCs. Moreover, Teneurin-4 expression induced proportionally with CD73 expression. Our results may facilitate investigations of MSC properties and function.

研究分野：医化学一般、細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 純化 フローサイトメーター 移植

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は一度損傷すると再生が困難な組織であり、軟骨損傷に伴い様々な疾患が引き起こされる。中でも、変形性ひざ関節症の罹患数は高齢者に多く、根治するには変性軟骨部位を切除する内視鏡手術や人工膝関節置換術などの手術しかない(Dippe et al., 2005)。しかし、人工物を骨に組み込む大掛かりな手術は術後のリハビリテーションに時間を要し、高齢者にとってリスクが大きい。そこで注目されたのが、軟骨細胞に分化する組織幹細胞である間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)の移植である。

MSCsを患者へ移植するには多くの細胞数を必要とするが、生体から得られる細胞数は極めて僅かであるため、必要数を得るには長期間の培養が求められる。しかしながらMSCsはin vitroでの培養を経ることで幹細胞能力を失っていくことが知られている(Kim et al., 2009)。また、細胞老化や軟骨細胞以外の細胞に分化するリスクが上がるるとともに、移植部への生着能が低下する原因となる。

2. 研究の目的

本研究では、Teneurin-4 (Ten-4)がMSCsに及ぼす影響とその機序を分子レベルで解析し、Ten-4発現量の異なるMSCsを軟骨欠損モデルへ移植することによって、Ten-4がMSCsの幹細胞能力を反映するサロゲートマーカーとなる可能性を検討する。モデル動物での基礎研究の成果を臨床へ応用することを目指し、ラットでのマーカー探索ののちにヒトへの応用の可能性を調べた。

3. 研究の方法

本研究での移植時に使用する動物(ラットやマウス)のMSCsがヒトMSCsと同等のものである必要がある。そこで新たな課題として挙げられたのが、動物種共通のMSCs純化マーカーの探索である。以下の内容によって動物種共通のMSCs純化マーカーの探索、サロゲートマーカーとしてのTen-4の可能性を検証した。

- (1)ラットおよびマウスの骨組織をコラゲナーゼ処理することによって、MSCsを含んだ細胞集団を回収した。複数の抗体を用いてフローサイトメーターで細胞分離し、MSCsの純化マーカーを特定した。さらにモデル動物に移植することで、細胞の移植効果を評価した。
- (2)本学附属病院の術中廃棄検体のうち、骨、皮下脂肪、内臓脂肪、胎盤を用いて、ラットやマウスと共通のマーカーで純化MSCsを分離できるか、性状評価を行った。

4. 研究成果

(1)ラットMSCs純化マーカーの探索

まずモデル動物のMSCs純化マーカーを探索するため、複数の抗体を用いて細胞分離に有用なマーカーの候補を調べた。MSCsの特徴の一つであるコロニー系性能から、CD29、CD54、CD73で分離される細胞集団が有用であると考えられた(図1)。これらの細胞集団をより詳細に調べていくと、CD73抗体単独でコロニー形性能を有する細胞集団を高効率で分離できることが明らかとなった(図2a)。さらにこれらの細胞集団は、脂肪、軟骨、骨細胞へ分化可能であり、ラットMSCsを多く含んだ集団であると同等された(図2b)。

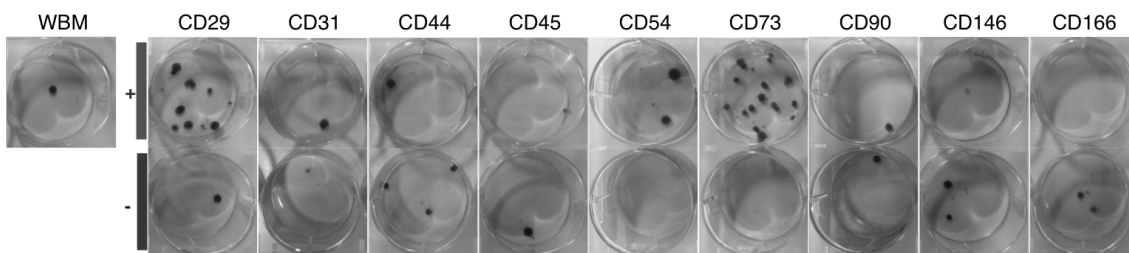


図1 | ラット骨髄細胞のコロニー形性能比較

ラットCD73陽性MSCsと、既存の分離方法によって得られた細胞集団を軟骨分化誘導して移植したところ、CD73陽性MSCsは軟骨分化し、移植部に生着していたのに対し、既存の分離法による細胞は軟骨分化が不良で、レシピエント動物による炎症細胞の浸潤が認められた(図3)。

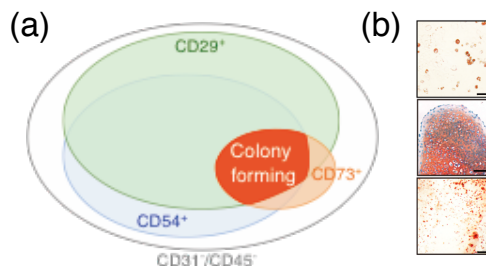


図2 | ラットMSCsのコロニー系性能および分化能

これまで、ラット MSCs を用いた研究は世界でも数多く実施されてきたが、それらの分離法は長期の培養期間を必要とし、さらには MSCs 以外の細胞の混在が懸念されていた。本研究によって、世界で初めてラット MSCs の純化方法を明らかにしたと考えられる。

(2) ラット、マウス、ヒト共通の純化マーカー

本研究では、将来的にモデル動物を用いた基礎研究ののちに純化 MSCs の臨床への応用を目標としている。ラット MSCs を CD73 マーカーで純化する技術をマウスやヒトに転用できるか解析したところ、ヒト、マウスにおいても CD73 マーカーで分離した細胞集団は既報の MSCs マーカーを高発現していることが明らかとなった(図 4)。

複数の抗体を用いずに CD73 抗体単独で MSCs を純化できるというのは、本研究によって新規に発見されたものであり、PCT 国際出願をしている〔産業財産権〕。

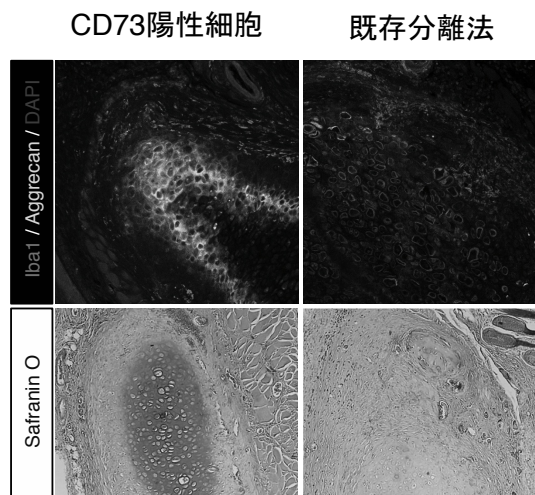


図 3| CD73 陽性細胞と既存分離法による細胞集団の移植効果比較

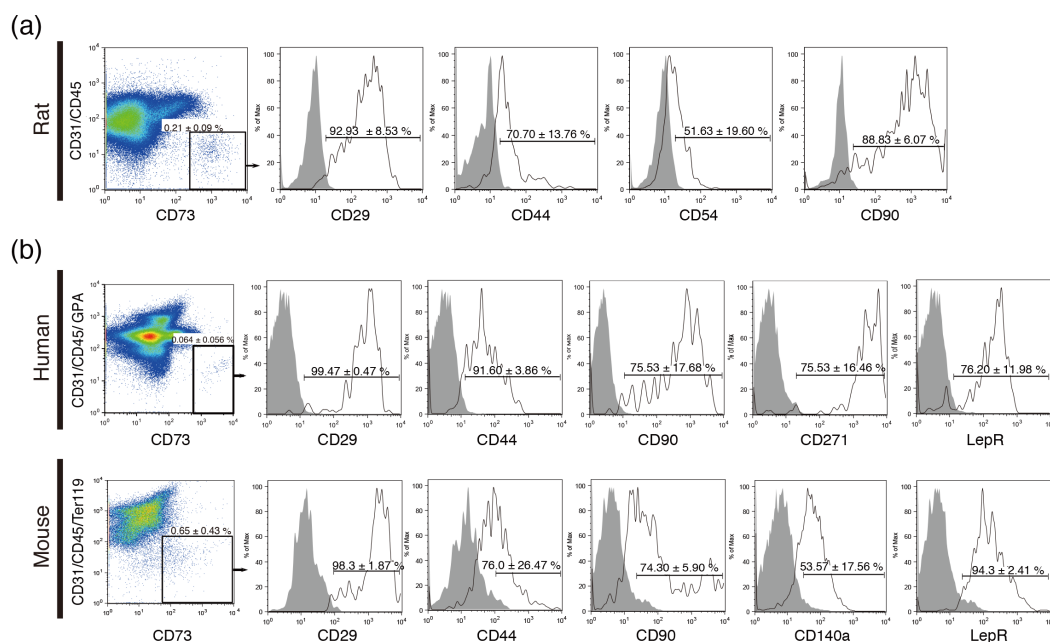


図 4| ラット、ヒト、マウスの CD73 陽性細胞分離と表面抗原解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Prospective isolated mesenchyme stem/stromal cells are enriched in the CD73⁺-population and exhibit efficacy after transplantation.

(Suto EG, Mabuchi Y, Suzuki N, Suzuki K, Ogata Y, Taguchi M, Muneta T, Sekiya I, and Akazawa C.)

〔学会発表〕(計 6 件)

① Eriko Grace Suto, Human and murine mesenchymal stem/stromal cells are enriched in the CD73⁺ population, International Society for Stem Cell Research Annual Meeting, 2018.

② 須藤絵里子グレース、単一抗体によるラット間葉系幹細胞分離、第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年

③ 須藤絵里子グレース、FACS 純化したラット間葉形幹細胞の分化・生着に関する解析、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016

④ Eriko Grace Suto, Integrin b1 and ICAM-1; Enrich Markers for Isolating Rat Mesenchymal

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：移植効率を向上させる間葉系 幹細胞の純化方法

発明者：赤澤智宏、須藤絵里子グレース、馬渕洋

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特願 2017-095216

出願年：2018 年 5 月 11 日

国内外の別： 国内

名称：移植効率を向上させる間葉系 幹細胞の純化方法

発明者：赤澤智宏、須藤絵里子グレース、馬渕洋

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：PCT 国際出願番号：PCT/JP2018/ 18351

出願年：2018 年 5 月 11 日

国内外の別： 国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

・ <http://akazawalab.com/publication/>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：赤澤 智宏

ローマ字氏名：AKAZAWA, Chihiro

研究協力者氏名：馬渕 洋

ローマ字氏名：MABUCHI, Yo

研究協力者氏名：鈴木 喜晴

ローマ字氏名：SUZUKI, Nobuharu

研究協力者氏名：緒方 勇亮

ローマ字氏名：OGATA, Yusuke

※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。