

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05990

研究課題名(和文) イヌ間葉系幹細胞の品質管理に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Basic research for quality management of canine mesenchymal stem cells

研究代表者

新井 克彦 (ARAI, Katsuhiko)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号：60175940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イヌCD73/CD90/CD105に対応する組換え蛋白質を抗原としてマウスへ免疫した。これらのマウスの脾臓細胞とミエロマを融合し、モノクローナル抗体を作製した。その結果、CD73(3クローン)、CD90(3クローン)およびCD105(4クローン)を樹立し、得られたモノクローナル抗体はウェスタンブロットティングによりイヌCD73/CD90/CD105を特異的に認識し、イヌMSCを用いたフローサイトメーター解析により有意な右方シフトを示した。さらに、CD105については血管内皮細胞も認識し、フィブロネクチン上でその発現が上昇することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト再生医療領域においては、国際細胞療法学会(ISCT)により再生医療に用いるための間葉系幹細胞(MSC)の品質を保証する条件の1つとして、「CD73、CD90およびCD105を発現すること」が掲げられている。獣医療においてもイヌにおけるMSCを用いた再生医療が開始されているが、獣医療におけるMSCの品質管理技術は不十分であり、その整備は急を要する。本研究において作製したイヌCD73、CD90並びにCD105に対するモノクローナル抗体は、イヌMSCの同定に有用なツールとなり得る。

研究成果の概要(英文)：To produce monoclonal antibodies against canine CD73, CD90 and CD105, their fusion protein was immunized to mice and spleen cells were fused with myeloma cells. As results, monoclonal antibodies to CD73 (3 clones), CD90 (3 clones) and CD105 (4 clones) were successfully established. These antibodies specifically reacted canine CD73, CD90 and CD105 by western blotting, and were recognized as useful tools for identification of canine mesenchymal stem cells. Furthermore, anti-CD105 antibody reacted with cultured aortic endothelial cells and protein level corresponding to CD105 was upregulated on fibronectin.

研究分野：獣医生化学、再生医学

キーワード：モノクローナル抗体 間葉系幹細胞 CD抗原

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) 移植を基盤とした再生医療では、用いる MSC の品質を管理することが重要であり、ヒト再生医療領域においては、①培養シャーレへの接着性を有する、②骨、軟骨、脂肪への分化能を有するおよび③CD73、CD90、CD105 を発現すること、が必須条件とされている。一方、イヌにおいてはこれら 3 種の CD が MSC の細胞表面マーカーとなるかどうかは明らかになっておらず、また市販抗体の多くはヒトやマウスに対するもので、イヌ CD に対する反応性も明らかにされていない。

2. 研究の目的

イヌ CD73、CD90 および CD105 に反応するモノクローナル抗体 (MAb) を作製し、イヌ脂肪由来 MSC に対する反応性を検索することを目的とした。

3. 研究の方法

イヌ cDNA データベースより得たイヌ CD73/CD90/CD105 に対応する細胞外領域の 5' 末端を、イヌ脳 cDNA を鋳型として RT-PCR により増幅した。以下、使用した PCR プライマーを示す。なお、下線部は pETite N-His SUMO Kan Vector へ導入するためのリンカー配列、波線は転写開始点を示す。

イヌ CD73

Upper Primer: 5' CGCGAACAGATTGGAGGTATGGGGCCCCGAGCCGCC 3'
Lower Primer: 5' GTGGCGCCGCTCTATTAGGCATCGTAGCGCAGGGC 3'

イヌ CD90

Upper Primer: 5' CGCGAACAGATTGGAGGTCTCGGCACCATGAACCCC 3'
Lower Primer: 5' GTGGCGCCGCTCTATTAGGTGATGGGAGGCTGGCC 3'

イヌ CD105

Upper Primer: 5' CGCGAACAGATTGGAGGTATGGACCGCACCGCGCTTCCC 3'
Lower Primer: 5' GTGGCGCCGCTCTATTACGCCAGGCGAGGAGCTGGCT 3'

上記のプライマーにより増幅された各 CD に対応する cDNA を pETite N-His SUMO Kan Vector にクローニングし、大腸菌 BL21 (DE3) にトランスフォームした後に IPTG 存在下で融合タンパク質を誘導した。モノクローナル抗体 (MAb) は His SUMO-tag を SUMO プロテアーゼで切断・除去した組換えタンパク質を抗原としマウスに免疫することで樹立した。

各 CD を認識する MAb を用いたフローサイトメトリーを、培養脂肪由来イヌ MSC に供した。さらに CD105 については培養イヌ血管内皮細胞を用いて詳細な検討を実施した。

4. 研究成果

各 CD に対して得られた MAb は表 1 に示すように、抗イヌ CD73 抗体が 3 クローン、抗イヌ CD90 抗体が 3 クローン、抗イヌ CD105 抗体が 4 クローン樹立できた。

表 1

| | subclone | isotype |
|-------------|----------|--------------------|
| canine CD73 | 1B5 | IgM(κ) |
| | 2B3 | IgG2b(λ) |
| | 3C10 | IgG2b(λ) |

| | subclone | isotype |
|-------------|----------|-------------------|
| canine CD90 | 1B4 | IgG1(κ) |
| | 1F3 | IgG2a(κ) |
| | 2F12 | IgG2a(κ) |

| | subclone | isotype |
|--------------|----------|-------------------|
| canine CD105 | 1G1 | IgG2a(κ) |
| | 2E5 | IgG1(κ) |
| | 3E3 | IgG1(λ) |
| | 3G2 | IgG1(κ) |

各 CD に対する Mab を用いてイヌ MSC についてフローサイトメーター解析を行ったところ、図 1 に示すように CD73 (図 1a)、CD90 (図 1b) および CD105 (図 1c) について、明確な右方変位が見られた。このことから本研究課題で作製したモノクローナル抗体は、イヌ MSC の同定に有用な抗体であることが示された。

図 1a

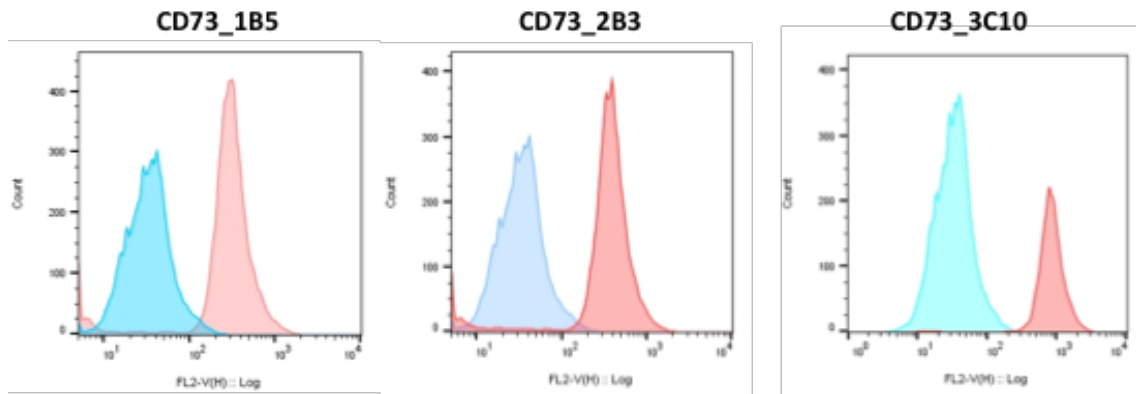


図 1b

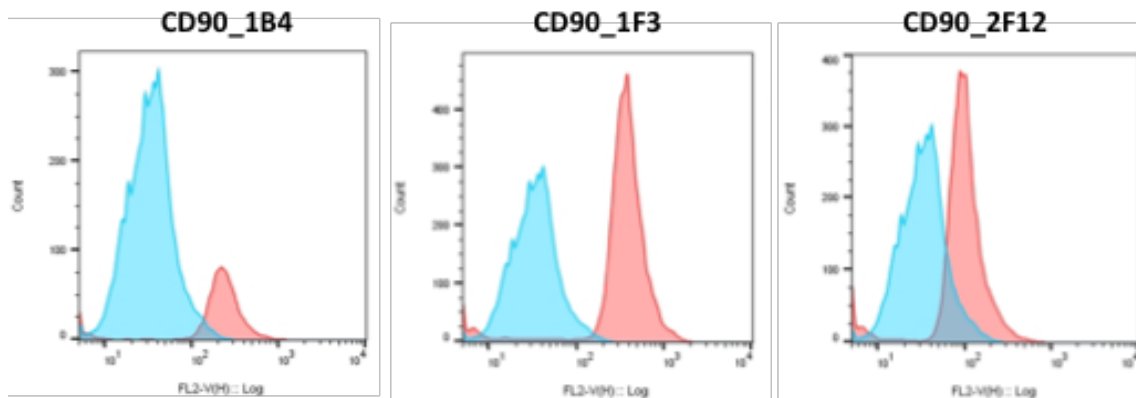
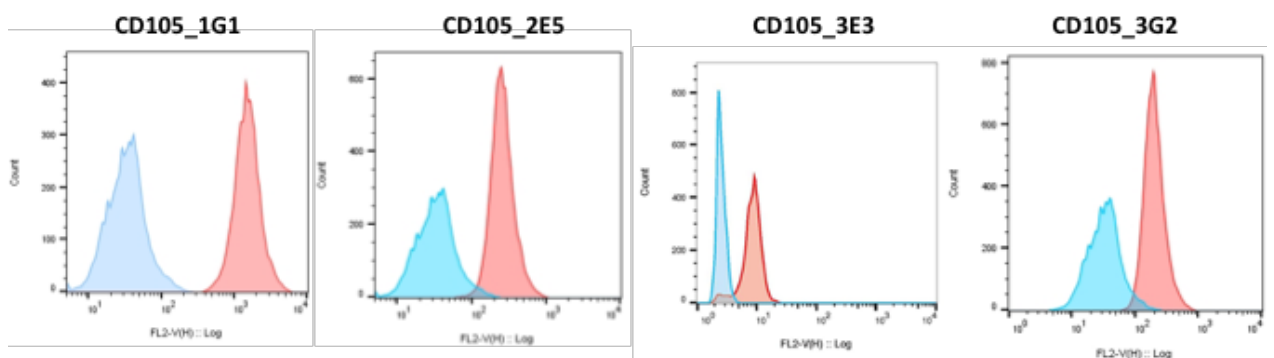
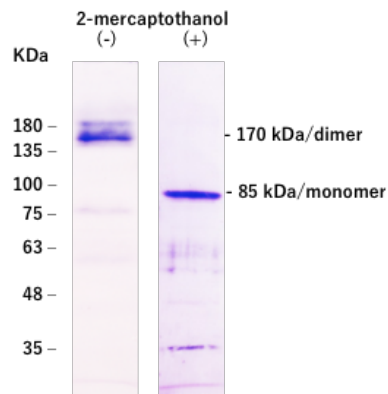


図 1c



また、培養イヌ血管内皮細胞における CD105 の発現をウェスタンブロットにより確認したところ、図 2 に示すように還元前で 170 kDa、還元後で 85 kDa 単一バンドを示したことから、ホモ二量体として存在していることが明らかとなった。

図 2



さらに、培養イヌ血管内皮細胞における CD105 の発現を蛍光抗体法により確認したところ、陽性像が得られ (図 3a)、細胞接着分子の種類によりその発現に変化が見られることが示され、ウェスタンブロッティング (図 3b) ならびにその画像解析 (図 3c) の結果、フィブロネクチン上で CD105 の蛋白質量の増加が見られた。

図 3a

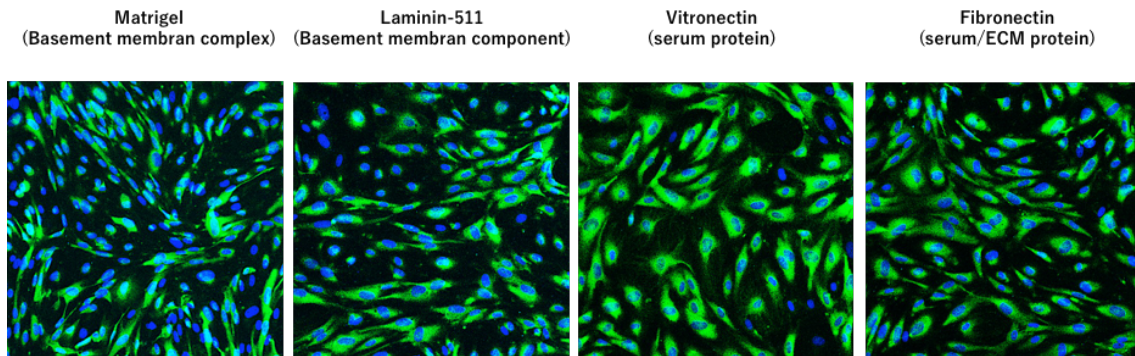


図 3b

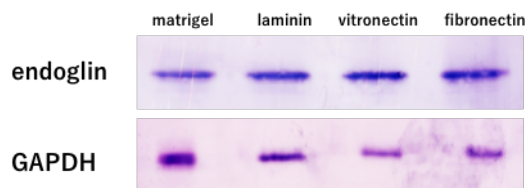
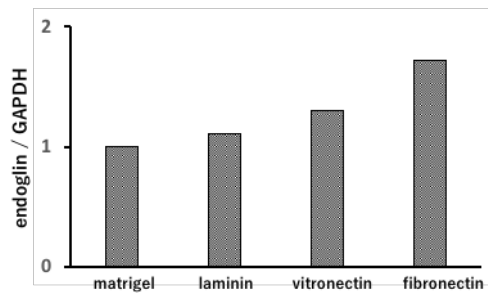


図 3c



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 1. Sekimukai H, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Tani H, Kataoka M, Suzuki T, Hasegawa H, Niikura K, Arai K, Nagata N. | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Microbiol Immunol. | 6. 最初と最後の頁 33-51 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12754. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 2. Nojima Y, Bono H, Yokoyama T, Iwabuchi K, Sato R, Arai K, Tabunoki H. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Superoxide dismutase down-regulation and the oxidative stress is required to initiate pupation in <i>Bombyx mori</i> . | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 14693 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51163-3. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Kobayashi, S, Aokura, N, Fujimoto, R, Mori, Kumazawa, Y, Ando, Y, Matsuda, T, Nitto, H, Arai, K, Watanabe G. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Incubation and water temperatures influence the performances of loggerhead sea turtle hatchlings during the dispersal phase. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 1-8 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-30347-3. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 桂川ゆきの、久保田博己、青木基記、塩瀬友樹、田村周久、笠嶋快周、新井克彦 |
| 2. 発表標題 ウマ・エンドグリン（CD105）のウマ組織における発現分布とサンドイッチELISAによる定量法の確立 |
| 3. 学会等名 日本ウマ科学会第32回学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 久保田博己、桂川ゆきの、田村周久、笠嶋快周、新井克彦 |
| 2. 発表標題 ヒト間葉系幹細胞 (MSC) マーカー-CD73/CD90/CD105はウマMSCの分子マーカーとなり得るか |
| 3. 学会等名 日本ウマ科学会第32回学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤耕太、大戸千帆、須藤加澄、新井克彦、能田健 |
| 2. 発表標題 犬脂肪組織由来間葉系幹細胞における炎症性サイトカインによるインドールアミンジオキシゲナーゼ1発現誘導 |
| 3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 内田 歩, 新井 克彦 |
| 2. 発表標題 クラゲ特異的細胞外マトリックス・メソグレインの特性解析 |
| 3. 学会等名 第51回日本結合組織学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤 耕太、須藤 加澄、新井 克彦、能田 健 |
| 2. 発表標題 犬脂肪組織由来間葉系幹細胞の品質管理：品質マーカーとしてのサイトカイン反応性 |
| 3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|