

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12710

研究課題名（和文）間葉系幹細胞の臨床応用へ向けた品質管理と評価マーカーの探索

研究課題名（英文）Quality Control and Evaluation Markers of Mesenchymal Stem Cells for Clinical Application

研究代表者

岡本 美奈（Okamoto, Mina）

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50457008

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）：本研究では、由来の異なる4種の間葉系幹細胞(MSC)の特性について比較検討を行った。継代による細胞形態の変化や核型に異常を認めた細胞でも、分化能や表面抗原マーカーが維持されており、一般的なMSCの品質確認のみで細胞を評価することは不十分であると考えた。RNAseqで発現遺伝子を調べた結果、臍帯は滑膜や骨髄由来MSCとは特性が異なることが示唆されたことから、各種MSCの特性に応じた疾患を対象に臨床応用できる可能性がある。また、MSCの免疫抑制効果は採取組織やロットで異なる可能性があり、MSCの品質や特性を予め評価することで、臨床に適したロットを選定できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞は、がん化のリスクが低く、組織損傷部位への集積や免疫原性が低いことから、細胞治療の細胞材料として期待されている。本研究の結果から、MSCは由来組織によって特性が異なり、培養方法の違いにより品質が変化することが明らかになった。また、発現遺伝子や免疫抑制効果などの機能に差異があることが示唆されたことから、MSCの臨床応用にあたっては、各種MSCの特性に応じた培養手順の標準化や品質評価が重要であると考えた。細胞材料はドナーにより品質が異なることが予測されるため、予め適応疾患に応じたロットの選定を行うことで、安全で質の高い細胞の確保が可能になると考えた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a comprehensive comparative study of four types of mesenchymal stem cells (MSCs) of different origin. The MSCs retained the typical MSC phenotypes such as the ability of differentiation into osteocyte, adipocyte, and chondrocyte, and cell surface markers even when the cell shape changed and karyotype abnormality was found after several passages, suggesting that checking general MSC definitions are not sufficient for quality control. RNA seq results revealed that umbilical cord-derived MSCs were categorized separately from synovial or bone marrow-derived MSCs and were characterized differently. The immunosuppressive effect of MSCs seemed to differ from type or lot to lot, suggesting that there is possibility of selecting a lot with high effect appropriate for the clinical use.

研究分野：再生医療研究

キーワード：間葉系幹細胞 細胞老化 品質評価 免疫抑制

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

MSCは骨髄、脂肪、滑膜、臍帯、周産期などの間葉系組織から樹立が可能であり、骨・脂肪・軟骨細胞だけでなく、神経細胞や肝細胞など中外内胚葉系細胞へも分化することが知られている。免疫原性が低いことから、HLAを適合させる必要性がないこと、また、損傷部位に集積する特性から、静脈投与などの非侵襲性の投与が可能であり、再生医療の細胞資源として価値が高い。MSCは増殖回数に限度があるため、がん化のリスクが低いとされる一方で、採取組織による特性違いや培養条件の違いにより、その品質は変わることから、他家細胞の迅速な供給には、品質評価が重要な課題となっている、組織から採取後の培養初期の細胞はヘテロな集団であり、その特性については十分な検討がなされていないのが現状であり、施設によって異なる品質のMSCを使用している可能性がある。治療に最適なMSCの特性は分裂により徐々に失われることが推測されることから、一般的に行われているin vitroでの品質確認の結果は、必ずしも個別のMSCの機能を反映しているとは限らない。

ヒト組織由来MSCの特性については未だ不明な点も多く、安全で高品質のMSCを市場に流通させるためには、迅速で的確な品質評価が重要な課題となっている。申請者らは、再生医療研究への実用化に向けてヒト余剰組織由来間葉系幹細胞のバンクを整備している。凍結融解後の細胞を臨床応用へ使用するに際し、品質に与える影響や培養条件の違いによる品質の違いを明確にすることにより、高品質で安全なMSCの選別を可能にしたいと考えた。

2. 研究の目的

現在、MSCは骨髄や脂肪由来のMSCを用いた臨床応用が進んでいるが、MSCの特性は採取部位により異なる特性をもち、最適な対象疾患が異なる可能性がある。特に、侵襲性の低い余剰組織から得られたMSCの有用性を明らかにできれば、再生医療への応用が期待できる。本研究では、4種類の異なる組織由来MSCを用いて、培養条件の違いや継代作業に伴う品質の変化について検討を行った。具体的には、有血清培地および無血清培地を用いて培養早期（P4-P6）から培養後期（P10以降）にかけて培養し、MSCの定義とされる増殖能や分化能、表面抗原マーカーについて網羅的な解析を行った。また、各種MSCの発現遺伝子の解析やMSCの特性である免疫抑制効果の検証を行い、採取組織の違いによるMSCの特性について比較検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 由来組織や培養条件の違いによるMSCの品質確認

4種の組織由来MSCについて、市販の骨髄（BMC）、脂肪（AT）、当施設セルバンクの滑膜（SYN）、臍帯（UC）組織由来間葉系幹細胞を入手し、それぞれ10%FBS添加DMEM有血清培地および市販の無血清培地を用いて培養した。培養初期から培養後期における骨、脂肪への分化能はそれぞれ、Alizarin Red S染色およびOil Red O染色で評価を行い、軟骨の分化はペレットカルチャーにより、Alucian Blue染色で評価した。また、MSCの表面抗原マーカー（CD11b, CD34, CD44, CD45, CD90, HLA-ABC, HLA-DR, CD13, CD29, CD73, CD105）について網羅的に解析し、継代操作に伴う陽性マーカーの発現変化を解析した。安全性の評価については、同一ロットの培養早期と培養後期の各種細胞を用いて、Qバンド核型解析を行った。

(2) RNAシーケンスによる発現遺伝子の解析

由来組織や培養条件の異なるBMC, SYN, UCの各種MSCを有血清培地、無血清培地でそれぞれ培養した培養早期および後期の細胞からRNAを抽出した。RNAシーケンス（RNA seq）を行い、PCA解析で各種MSCの分類を行い、発現遺伝子について比較検討した。

(3) 免疫抑制効果の検討

各種MSCとヒト末梢血単核球（PBMC）を1:10の割合で共培養し、Tリンパ球のcarboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester（CFSE）アッセイを実施した。CFSE標識したPBMCとMSCを抗IL2刺激下で抗CD3抗体と5日間共培養した後、得られたPBMCを回収した。フローサイトメーターでCFSE蛍光強度を測定することでTリンパ球の増殖抑制について調べた。また、ロット間の免疫抑制効果を比較するため、各種2ロットずつのMSCを用いて、検討を行った。

4. 研究成果

(1) 由来組織や培養条件の違いによる各種 MSC の品質確認
分化能の確認

無血清培地下における骨、脂肪、軟骨への分化能を網羅的に調べた結果、培養早期 (P4-P6) および培養後期 (P10 以降) の 4 種全ての MSC で骨・脂肪への分化能が確認されたが、UC 由来 MSC の軟骨への分化能は低かった (図 1)。P11 以降の BMC 由来 MSC は細胞が増殖しなかったためデータが得られなかったが、その他の MSC は顕微鏡下で細胞の形態に変化が認められた P14 以降においても、骨・脂肪への分化能を有することが確認された。

また、無血清培地で培養した場合と比較して、有血清培地で培養した BMC と SYN 由来 MSC における P5 の軟骨分化能は高かった (図 2)。

培養早期(P4-6)

培養後期(P10 以降)

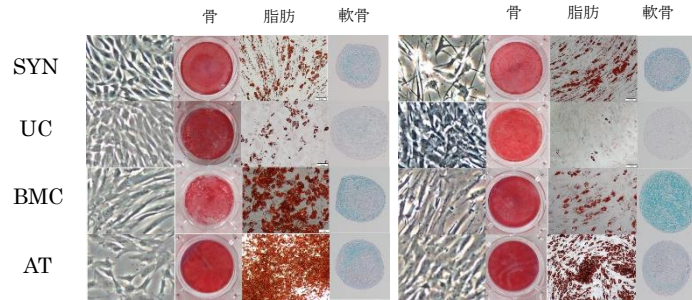


図 1 分化誘導能の確認

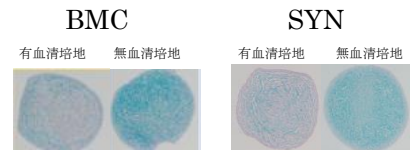


図 2 有血清および無血清培地下での軟骨の分化能

表面抗原マーカーの確認

無血清培地で培養した各種 MSC の表面抗原マーカーを調べたところ、P5 ではいずれの細胞においても陽性マーカーが 80%以上の陽性率であった。特に、SYN および AT 由来 MSC では、P14 以降においても高い陽性率を維持していることを確認した。一方、陽性マーカー CD105 と HLA-ABC については、継代操作の増加に伴って陽性率が低下し (図 3)、また、有血清培地で培養した培養初期の細胞においても、陽性率が低下する傾向が認められた (図 4)。

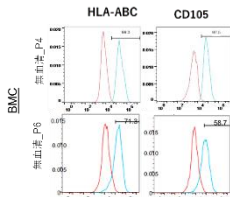


図 3 無血清培地下での MSC 表面抗原マーカー

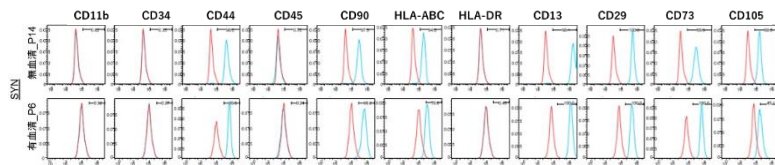


図 4 MSC 表面抗原マーカー

Qバンド核型解析

培養早期 (P4-6) と後期 (P10 以降) の 4 ロット計 8 例の MSC を用いて核型 Q バンド解析を実施した結果、1 例の培養後期 (P11) の細胞で、クローン性の 8 番トリソミーが確認された (図 5)。当ロットの培養早期 (P5) では異常が認められなかったことから、継代作業に伴う核型の変化と考えられた。

以上から、MSC は由来組織だけでなく、血清の有無など培養条件の違いによっても特性が異なることが明らかになった。また、顕微鏡下で細胞の形態が変化し、核型にクローン性の異常が生じているにもかかわらず、MSC の定義とされる表面抗原マーカーの発現や骨・脂肪・軟骨への分化能は有していたことから、MSC の品質評価には、分化能の維持や表面抗原マーカーの確認だけでなく、細胞老化との関連性についても検討を行う必要があると考えた。表面抗原マーカーでは、CD105 および HLA-ABC の発現の確認が細胞老化の指標の一つとなる可能性が示唆された。

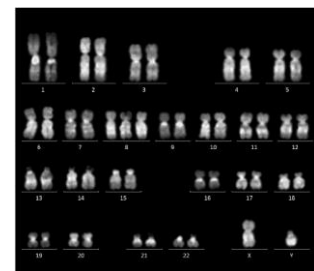


図 5 Qband 解析

(2) RNA seq による発現遺伝子の確認

UC, SYN, BMC 由来 MSC の 3 種について RNA seq による主成分分析 (PCA) を行ったところ、UC は SYN および BMC とは別にカテゴライズされた (図 6)。UC では、SYN や BMC と比較して、IL1A や IL1B など免疫調節に係る遺伝子が高発現していた。また、有血清培地下で培養した SYN や BMC では、軟骨に関連する遺伝子 (ACAN, COMP) が高発現しており、軟骨分化の alcian blue 染色の結果と一致したことから、培養液の血清の有無が軟骨分化に影響を与えると考えた。

PCA 解析から、UC は SYN や BMC 由来 MSC とは異なる特性を有しており、また、培養条件により発現する遺伝子に変化する可能性が示唆された。

(3) 免疫抑制効果の検討

各種 MSC と PBMC の共培養を行い、リンパ球の増殖抑制について検討した。抗 CD3 抗体刺激下で、PBMC が増殖することが確認できたため、BMC, AT, UC, SYN 由来 MSC との共培養を行った。4 種全ての MSC がリンパ球の増殖を抑制することが確認できたが、BMC と比較して、特に AT や SYN 由来 MSC との共培養下でリンパ球の増殖が抑制された。また、ロットによって抑制効果が異なるという結果が得られた (図 7)

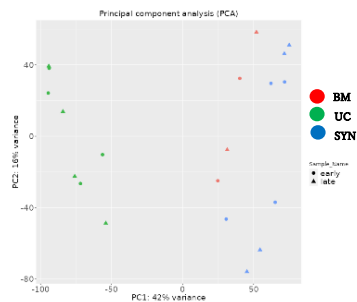


図 6 PCA 解析

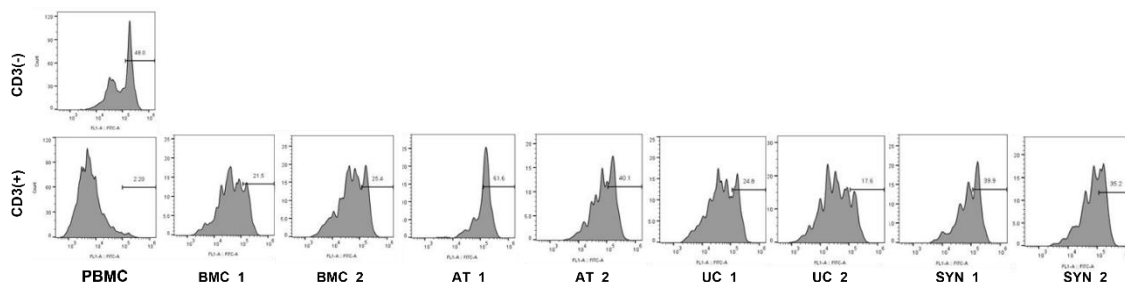


図 7 免疫抑制効果の検討

以上から、MSC は継代操作により細胞の形態が変化し、培養後期に核型解析でクローン性の異常が認められているにもかかわらず、骨・脂肪・軟骨への分化能や、表面抗原マーカーの陽性率が維持されており、一般的に MSC の定義とされる分化能や表面抗原マーカーの確認だけでは機能的な MSC の品質を評価することは不十分であることが示唆された。また、由来組織や培養液により、高い細胞増殖能を維持できる条件が異なることから、各種 MSC の細胞老化のタイミングなど、特性を見極めるの必要性があると考えた。

RNA seq の結果から、UC は SYN や BMC 由来 MSC とは異なる特性を有しており、培養液の違いが発現遺伝子の変化に影響を与える可能性が示唆された。特に、UC 由来 MSC は免疫調節に係る遺伝子が高発現していたことから、対象疾患が広がる可能性もある。また、MSC の臨床における有用性として免疫抑制効果が挙げられるが、本研究により、採取組織やロットによってリンパ球増殖の抑制効果に違いが認められたことから、MSC は由来組織ごとに個別の特性を持つ細胞資源として評価するの必要性があると考えた。あらかじめ抑制効果の高い MSC の種類やロットの選定を行う事で、疾患に応じた有効性の高い細胞ストックが可能となり、臨床への応用が期待できると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本美奈, 辻井 聡, 大堀 智毅, 佐藤 世羅, 神宮司 希和子, 阪上 守人, 大槻 涼子, 江副 幸子, 中村 憲正, 江口 英利, 名井 陽
2. 発表標題 アカデミアにおけるヒト滑膜およびヒト臍帯由来間葉系幹細胞バンクの運用と展望
3. 学会等名 第7回クリニカルバイオバンク学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	名井 陽 (Myoui Akira) (10263261)	大阪大学・医学部附属病院・教授 (14401)	
研究分担者	江副 幸子 (Ezoe Sachiko) (90379173)	大阪大学・医学系研究科・特任教授（常勤） (14401)	
研究分担者	大川 竜麻 (Okawa Ryoma) (40838520)	大阪大学・医学系研究科・特任研究員（常勤） (14401)	
研究分担者	H A G H P A R A S T S E Y E D ・ M O H A M M A D ・ A L I (Haghparast Seyed Mohammad Ali) (60838754)	大阪大学・医学部附属病院・特任研究員（常勤） (14401)	

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
---------	---------