

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08822

研究課題名(和文) 組織再生における間葉系幹細胞の細胞特性・多様性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms in cellular characteristics and diversity of mesenchymal stem cells in tissue regeneration

研究代表者

寒川 延子 (Sougawa, Nagako)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30432579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト組織間葉系幹細胞(MSC)を用いた再生医療では、MSCの多様性のために、臨床的有効性の相違が認められている。そこで、本研究では疾患環境におけるMSCの細胞特性、多様性の分子機構の解明を目指した。実験には、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞(US-MSC)、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(AT-MSC)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)を用い、それぞれの特徴の比較解析を試みた。いずれの細胞もわずかな培養条件、細胞状態の違いにより、反応性に大きなばらつきがあった。RNA-Seqを用いて各細胞の遺伝子発現を比較したところ、BM-MSCが組織修復という点に関してより有用である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSCは由来組織や培養条件により分泌因子の産生性や生物活性に著しい差が認められ、多様性が指摘されている。このような細胞の特性が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る。有効かつ安全なMSC細胞治療を進めるためには、その多様性や細胞特性を制御する分子機構を明らかにし、それに基づいた細胞治療の開発が望まれる。最終的な解明にはいたらなかったが、数種のMSCを直接比較することで、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の特徴は示唆されたと考える。

研究成果の概要(英文)：There are discrepancies in the clinical effectiveness of regenerative medicine using human tissue mesenchymal stem cells (MSCs) because of their diversity. Therefore, in this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of the cellular characteristics and diversity of MSCs in disease environments. We used human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (US-MSCs), human adipose-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs), and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs), and conducted comparative analyses of their characteristics. Any of cells were difficult to maintain in a stable state. In RNA-Seq analysis, BM-MSCs showed production of much angiogenesis factors, extracellular matrix and hypoxic response in hypoxia than other MSCs. BM-MSCs may be more useful in terms of tissue repair.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 間葉系間細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化や食生活の欧米化に伴い、国内でも心疾患が年々増加傾向を示している。近年の内科的・外科的治療法の進歩は、これらの疾患患者の救命・症状緩和に貢献してきたが、既存の治療に抵抗性を示す症例や適応外の症例も多い。このような症例に対する再生医療の必要性が高まっており、幹細胞を用いた組織再生療法の応用が期待されている。再生医療に用いられる幹細胞には様々な種類があるが、その一つであるヒト組織由来間葉系幹細胞 (MSC) は骨髄だけでなく胎盤、臍帯、脂肪から採取でき、安全面・倫理面の問題が少なく、再生医療の重要な細胞ソースとなっている。MSCは免疫原性が低く、組織の修復や恒常性の維持、造血幹細胞の増殖や分化の制御に機能するだけでなく、骨・軟骨、骨格筋、脂肪にくわえ血管内皮や平滑筋、心筋にも分化する能力をもっており、心血管系の細胞治療ソースとして注目されている。また、MSCは投与環境下に適応して抗炎症作用や血管新生作用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。しかし、MSCは由来組織や培養条件により分泌因子の産生性や生物活性に著しい差があり多様性も指摘されており、この特徴が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、問題となっている。有効かつ安全なMSC細胞治療を進めるためには、その多様性や細胞特性を制御する分子機構を明らかにし、それに基づいた、より有効かつ安全で病態に特化した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、その細胞特性から様々な疾患への応用が期待され、再生医療における重要な細胞ソースと考えられているが、これまでの前臨床試験・臨床試験においてはその臨床的有効性に相違が認められており、標準プロトコールの確立には至っていない。その原因の一つとしては、MSCの細胞特性、多様性をもたらす分子機構が不明であることが考えられる。本研究では、疾患に特化したMSCの細胞特性、多様性の分子機構を解明し、臨床応用においてより適したMSCを用いることで、有効かつ安全な間葉系幹細胞治療を推進することを目指す。

まずは、*in vitro*において各種MSCの性状解析と特性解析を行い、MSCの違いを明らかにし、MSCの細胞特性・多様性をもたらすメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。次に疾患モデル動物を用いた*in vivo*での実験によりそれぞれのMSCの作用効果を比較検証することで、より有効で安全なMSCを同定するとともに、MSCによる組織修復作用の分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

実験は市販のヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (UC-MSC)、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (AT-MSC)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) を用いて行った。通常培養条件下 (20% 酸素、通常サプリメント) と、病態を模した *in vitro* の培養系として低酸素条件下 (5% 酸素、1% 酸素) または低栄養条件

下(半量サプリメント、1/10サプリメント)で培養を行い、細胞の形態、増殖能、発現分子、サイトカイン産生等の比較を試みた。細胞の形態については顕微鏡観察による評価を行い、増殖能については、CCK-8を用いて評価を試みた。さらに、RNA-Seqを用いてそれぞれの細胞のそれぞれの培養条件下での分泌因子および細胞外基質などの遺伝子発現を比較解析した。

4. 研究成果

まず初めにヒト臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC)、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(AT-MSC)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)を通常培養条件下と、病態を模した*in vitro*の培養系として低酸素条件下(5%酸素、1%酸素)または低栄養条件下(半量サプリメント、1/10サプリメント)で培養を行い、細胞の形態、増殖能を検討した。1%酸素条件下においては、いずれの細胞もサプリメント濃度に関わらず、増殖率やサイトカインの遺伝子発現にばらつきが認められた。一方、5%酸素条件下、半量サプリメント条件下、1/10サプリメント条件下では安定した細胞増殖傾向が認められた。そのため、病態モデルとして、5%酸素、1/10サプリメント条件(低酸素・低栄養培養条件)を用いることとした。低酸素・低栄養培養条件下でそれぞれの細胞を比較したところ、いずれのMSCにおいても、通常培養条件に比して、2日目までは細胞の形態に大きな違いは認められなかった。しかし、その後は細長く線維芽細胞状の形態が顕著になった。低酸素培養条件下の増殖率は、いずれのMSCにおいても2日目までは有意な差は認められなかったが、2日目から検討を行った5日目において、通常培養条件下に比して有意な低下が認められた。しかし、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC)とヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)では、増殖速度は遅くなったものの細胞数の増加は認められた。一方、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(AT-MSC)では、細胞の増殖速度はさらに遅くなり、2日目から5日目にかけての細胞数の増加は微増にとどまった。発現分子ならびにサイトカイン産生については、まずqPCRでの検討を試みた。いずれの細胞においても、通常培養条件下と低酸素・低栄養培養条件下においては発現量に差は認められたものの、細胞間においては有意な違いは認められなかった。続いて、RNA-Seqを用いてそれぞれの細胞のそれぞれの培養条件における遺伝子発現を比較検討した。中でも、血管新生に関わる因子や細胞外基質に関わる因子の遺伝子発現の変化が顕著であった。また、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(AT-MSC)とヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)では、通常培養条件下と低酸素・低栄養培養条件下を比較したところ、類似した遺伝子発現変化を示した。血管新生に関わる因子や細胞外基質に関わる因子の発現は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(AT-MSC)、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC)の順に高かった。特に、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)では、低酸素・低栄養培養条件下で4日間培養したところ、通常培養条件下と比較して血管新生に関わる因子や細胞外基質に関わる因子の発現が高くなっていた。また、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(AT-MSC)およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)では低酸素応答に関わる遺伝子の発現が増加しており、その増加率はヒト臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC)でより顕著であった。これらの結果より、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)

は他のMSCに比して、低酸素あるいは低栄養等の病的環境下にあっても細胞の増殖性を示し、細胞外基質を産生するとともに血管新生因子の産生が高くなっている可能性があり、組織修復という点に関してより有利である可能性がある。最終的なMSCの細胞特性の解明にはいたらなかったが、数種のMSCを直接比較することで、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)細胞の特徴は示唆されたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------