

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300185

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の多分化能と免疫寛容を有効利用する再生基礎研究

研究課題名(英文) Basic investigation for regeneration using mesenchymal stem cells with multi-potency and immunological tolerance

研究代表者

鳥橋 茂子(Torihashi, Shigeko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90112961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：未分化ES細胞から脂肪細胞への分化誘導過程で出現するCD105陽性細胞が間葉系幹細胞(MSCs)であることを証明し、効果的にこれを利用する研究を行い以下の成果をあげた。

(1) 組織中のMSCsに比べてテロメラーゼ活性、骨格筋への分化能は高いが、免疫寛容性は示さない。(2) 磁気ビーズ法で採集し、レーザー照射により純度を上げた。(3) マウスの前頸骨筋を挫滅損傷後、MSCsを移植すると骨格筋へ分化すると共に、筋の機能回復を促進した。(4) 筋損傷による刺激でMSCsはTSG6を発現し、これにより移植先で細胞接着の場を形成した。(5) 組織中のMSCsからメタボモデルラットのiPS細胞を作成した。

研究成果の概要(英文)：We developed mesenchymal stem cells (MSCs) expressing CD105 from mouse ES cells during induction to adipose cells. We investigated MSCs and obtained valuable results as follows: (1) Our MSCs showed higher telomerase activity than that of tissue MSCs. However, their immunological tolerance was not high enough for transplantation across species. (2) MSCs showed more than 96% of purity and laser irradiation to unlabeled cells improved the purity. (3) MSCs demonstrated high potential for differentiation in to skeletal muscle and their transplantation into injured muscles accelerated functional recovery of damaged muscles. (4) Injured skeletal muscle cells up-regulated the expression of TSG6 in MSCs. It formed the foothold of MSCs after transplantation. (5) We established iPS cells from MSCs in human metabolic syndrome model rats. Adipose cells from the iPS cells showed pathophysiological state similar to human metabolic syndrome.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：間葉系幹細胞 骨格筋 再生 移植 ES細胞 iPS細胞 CD105

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は本研究の開始時点でマウスの ES 細胞から脂肪細胞を分化誘導中に間葉系幹細胞(MSCs)が出現する事を見出していた。そこで本細胞を移植に利用して間葉系細胞(筋肉、骨、軟骨等)の損傷や病態を改善するための移植基礎研究を行うことを計画し、本研究費を申請した。

(2) 研究開始時点で、一般的に MSCs は移植時に組織適合抗原にたいする宿主側の免疫寛容を惹起することが報告されていた。従って研究代表者の作出した MSCs もおそらくその性質を具備し、免疫寛容を利用した他種移植が可能であると想定した。

## 2. 研究の目的

(1) マウス ES 細胞由来 MSCs の免疫寛容性を含めた特性を明らかにする

未分化 ES 細胞を脂肪細胞へと分化誘導する過程で CD105 を指標として分離収集した MSCs の増殖能、分可能、免疫寛容能について解析し、MSCs としての特徴を示すかどうかについて検討する。また本細胞のもつ、特性についても明らかにする。

(2) ES 細胞由来 MSCs の純化と大量収集技術を確立する

脂肪細胞への分化誘導後、最も MSCs が多く出現する時期、採集効率の向上、純度の検定、簡便な大量収集技術を確立する。

(3) 損傷骨格筋モデルの作成と効果的移植法を検討する

損傷筋への移植実験を行うにあたり、移植効率や移植後の効果を判定するための再現性の高い骨格筋損傷モデルを作成し、これを用いた最適な移植法を確立する。

(4) 移植による筋組織の再生検証とこれによる運動学的効果を実証する

移植後の移植細胞の動態、宿主側の筋細胞、神経、血管の再生について、組織学的、分子生物学的な検証を行う。さらに組織の再生が、筋の機能改善、回復をもたらすことを行動学的に解析し、実証する。

(5) 炎症と移植細胞生着の関連を解析する

組織損傷後の炎症が移植細胞に与える作用、効果、必要性について明らかにする。

(6) MSCs の増殖能、分化能を利用して iPS 細胞を効率よく樹立する

樹立が難しく報告の少ない、ラットの iPS 細胞を作成する。病態の解析に使用するため病態モデルラットより iPS 細胞を作成する。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞、および動物

細胞移植の研究にマウス ES 細胞(理研 CDB より供与)、マウス iPS 細胞(京都大学、信州大学より供与)、マウス骨格筋芽細胞株 C2C12 を用いた。動物は移植用にマウス(BULB/C, 免疫不全 SCID)を用いた。また、ラット iPS 細胞の作成に、ヒトメタボリックシンドロームのモデルラットである DahlS.Z-Lepr<sup>fa</sup>/Lepr<sup>fa</sup> (名古屋大学より供与)とそのコントロールラットを用いた。

(2) 形態学的方法

組織を固定し、凍結超薄切片を作成してヘマトキシリンエオジン(H-E 染色)と免疫組織化学(蛍光)染色を行った。細胞の特性を明らかにするために、Oil Red O 染色、アルシアンブルー染色、その他組織化学染色を行った。また、陽性細胞数、陽性面積を計測し、数値化した。

(3) 細胞の選択的収集法

磁気ビーズ法(magnetic cell sorting; MACS)を使用した。また、細胞の純度をフローサイトメーター法(Fluorescence activated cell sorting; FACS)により検証した。

(4) 生化学的方法

細胞や培養上清を収集し、Western blotting 法によりタンパクの発現量を計測した。

(5) 分子生物学的方法

細胞や組織より mRNA を採取し、その発現量を PCR 法および real time PCR 法により解析した。また、遺伝子操作を行い細胞に遺伝子を強制発現させた。DNA マイクロアレイ法により MSCs の遺伝子解析を行った。

(6) 行動学的解析方法

移植による骨格筋の機能回復を調べるためにマウスの自然歩行を歩行解析器「CatWalk」により記録し、フットプリントおよび歩行軌跡を解析し筋機能を分析した。

#### 4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞から作成した MSCs が間葉系幹細胞であることを確認し、またその特性を以下のとおり明らかにした。

① DNA マイクロアレーによる遺伝子解析で、未分化能維持に働く遺伝子や神経系細胞への分化に必要な遺伝子の発現は ES 細胞より、低く、間葉系の細胞への分化に作用する遺伝子の発現は高かった。また、脂肪細胞、骨、骨格筋、軟骨への分化誘導が可能であった。さらに MSCs の核型は正常であった。これらにより MSCs がマウスの間葉系幹細胞であることが証明された。

② MSCs のテロメラーゼ活性が高く、細胞分裂による増殖能が高く維持されていた。従って、長期間にわたり増殖能を保った状態で培養が可能であることがわかった。

③ 組織由来 MSCs は骨格筋への分化能は低いという報告が多い中で、本細胞は骨格筋への分化能が高く筋細胞への分化誘導が比較的容易であることがわかった。一方、免疫寛容に関しては特に高いわけではないことが示された。種が異なるマウスへの移植は免疫拒絶により排除された。従って移植には免疫不全(SCID)マウスを使用する事にした。

#### (2) MSCs の効率的な収集方法の確立

① ES 細胞を脂肪細胞へ誘導後 8~10 日で CD105 陽性の MSCs が急増し、その後脂肪細胞に分化が進行すると発現が減弱することがわかった。そこで、下図のような培養と収集のタイムテーブルを作成し実行した。

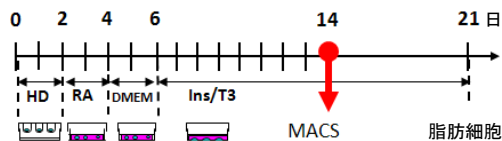


図 1 培養と収集の時間テーブル

② MACS 法で収集した細胞の純度を FACS 法で検定したところ、その 96% が陽性細胞であることが確認された。また、ごくわずかに混入している陰性細胞を除去するには、レーザーマイクロディセクション顕微鏡によるレーザー照射が有効であることがわかった。これにより、ほぼ純度 100% の MSCs を移植に用いることができるようになった。また、収集した MSCs は移植前に培養することでさらに細胞数を増やすことができた。

#### (3) 骨格筋損傷モデルマウスの作成と効率的移植法の確立

① 骨格筋損傷モデルマウスの作成に、再現性の高い損傷方法と損傷部位を検討した。その結果、一定の圧力と時間でマウスの前頸骨筋を鉗子で挟み、挫滅損傷させる方法をとった。前頸骨筋の損傷は生命維持には問題ないが、ごくわずかな運動障害も解析できた。また、表面の皮膚切開だけで露出でき、安定して損傷できる点で最適であった。本モデルによると細胞移植は行わなくても損傷後約 5 週間で自然治癒することがわかったが、細胞移植による骨格筋の治癒効果を運動機能面から初めて詳細に検証することができた。

② 最適な移植法を検討し、細胞数が少なくても確実に傷害部位で再生を検証できる傷害部への直接移植法を確立した。移植に最適な時期も検討したところ、炎症反応が惹起される損傷後 24 時間が最適であった。このことから、移植にはホスト側の炎症反応が重要な要素であることも示唆された。

#### (4) 移植による骨格筋の再生

① 移植後、継時的に移植細胞の変化をたどったところ、下図のように移植した MSCs (マーカーとして EGFP を発現している) が、筋芽細胞、筋細胞へと分化し、Myosin heavy chain (MHC) の免疫活性を示すようになると共にホスト側の再生筋にも細胞融合して、筋束を太くしていく様子も観察された。

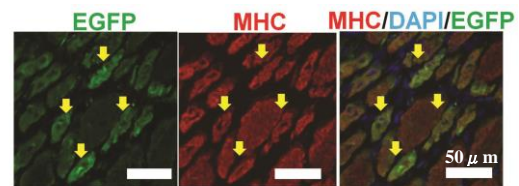


図 2 移植後の MSCs の骨格筋分化

移植された MSCs の約 80% が骨格筋に分化すると共に血管の細胞に分化したことも確認された。MSCs の移植により末梢神経の再生も促進した。下図のように MSCs は移植後 4 週間で前頸骨筋を組織学的に再生した。

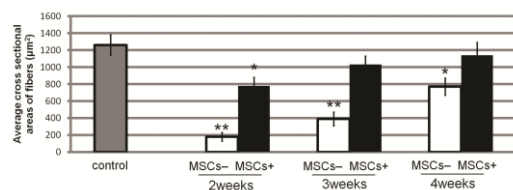


図 3 正常な前頸骨筋の横断面積

② 骨格筋の組織学的再生が促進されたこ

とで、筋の機能が実際に向上したか否かについて CatWalk の解析により検証した。その結果、下図のように、前頸骨筋の運動機能は移植しなかったマウスに比べて約 1 週間回復が早まったことが確認された。すなわち移植により機能回復が促進された。

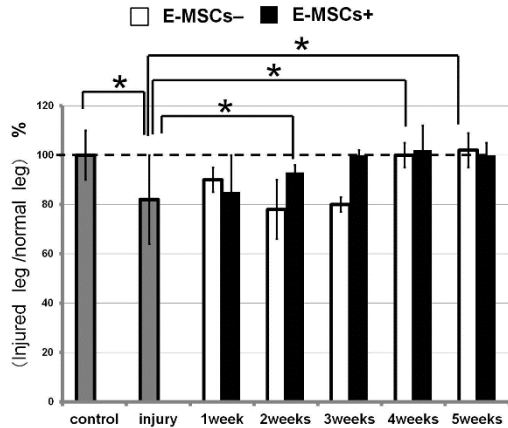


図4 損傷後の前頸骨筋の機能変化

このように移植により筋の機能回復が詳細に計測、報告されたのは初めてである。本モデルは自然治癒することがわかっているが、今後筋ジストロフィーなど、治癒が難しいケースでは MSCs の細胞移植が病態を改善することが期待された。

(5) 前述のように炎症が移植細胞の生着に深く関係することが示唆されたが、本研究では移植細胞の足場形成に移植先の組織の炎症を含めた微小環境が深くかかわることを明らかにした。

骨格筋への分化能が高い MSCs ではあるが、損傷していない、正常な筋へ移植すると筋分化はおろか、生着することができない。そこで、損傷筋と正常筋で初期に大きく異なる細胞マトリクス(ECM)を詳細に検討したところ、筋損傷後急激に上昇するいくつかの ECM が認められた。これらが、細胞の足場形成に関与するものと推測し、その機構を解析した。筋芽細胞株 C2C12 を骨格筋へと分化誘導後、細胞を破碎し上清を得た。この上清には筋が損傷時に分泌する物質が含まれると考えて正常前頸骨筋へ MSCs と共に注入(移植)すると MSCs が生着した。この時、移植した筋組織中で MSCs が転移酵素 TNF- $\alpha$  stimulated gene products (TSG6)を一過性に発現し分泌していた。この転移酵素 TSG6 の働きにより損傷や炎症時に組織中に漏出する血清由来のタンパク Inter- $\alpha$  trypsin inhibitor (I $\alpha$ I)の重鎖を組織中のヒアルロン酸に転移

し、serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP-HA)を形成し、これが強力な細胞接着の足場となることを生体外、生体内実験で明らかにした。下図のように通常状態の MSCs は TSG6(赤)をごく少量発現している(A)。しかし、C2C12 の破碎液上清で処理すると、細胞質全体に強い TSG6 の発現が見られるようになる(B)。

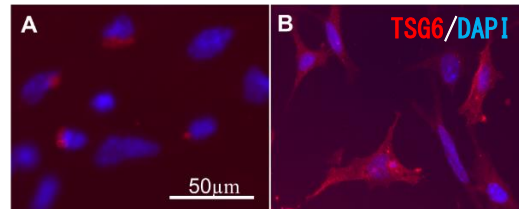


図5 培養 MSCs の TSG6 発現

MSCs が TSG6 を産生するという報告はこれまでも見られたが、これが移植細胞の接着、足場形成に関わるという本研究の結果はこれまでにない新しい知見である。この成果は損傷や病態が顕著ではない廃用筋への移植に道を開くものである。また、炎症と MSCs 移植との密接な関係を提示している。

(6) MSCs からラット iPS 細胞を作成した。

MSCs の増殖能と分化能を考慮すると、線維芽細胞から iPS 細胞を作成するよりも、MSCs から iPS 細胞を作成するほうが容易であると考え、これまで難しいといわれてきたラット iPS 細胞の作成を試みた。ヒトのメタボリックシンドロームのモデルとして解析が進んでいるラット *DahlS.Z-Lepr<sup>fa</sup>/Lepr<sup>fa</sup>* (DS/obese) とそのコントロール (*DS/lean*) の皮下脂肪組織から MACs を採取し、これに未分化細胞で必須とされる山中の 3 因子 (*Sox2*, *Oct4*, *Klf4*)を強制発現させることで下図のように EGFP を発現する iPS 細胞を樹立した。

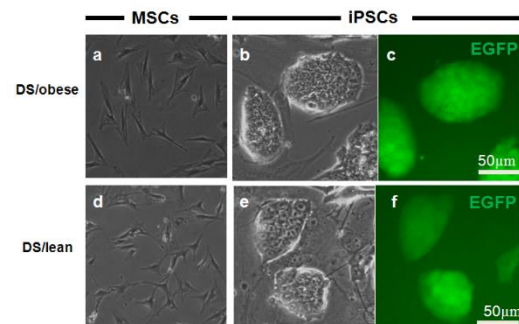


図6 ラット iPS 細胞のコロニー

これらの iPS 細胞は多分化能を持ち、しかも、DS/obese iPS 細胞より分化誘導された脂肪細胞は基本的にメタボリックシンドロームと

しての特徴を示していた。従って、本 iPS 細胞は今後メタボリックシンドロームを細胞レベルで研究する上で強力なツールとなる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Nana Takenaka-Ninagawa, Eri Isobe, Yuri Hirayama, Rumi Murakami, Kasumi Komatsu, Masataka Nagai, Mami Kobayashi, Yuka Kawabata, Shigeko Torihashi: Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Derived from ES Cells Promotes Muscle Regeneration and Accelerates Functional Recovery of Injured Skeletal Muscle BioResearch Open Access 査読あり、2 巻、4 号 2013 pp295-306 DOI: 10.1089/biores.2013.0012

② Nana Ninagawa, Rumi Murakami, Eri Isobe, Yusuke Tanaka, Hiroki Nakagawa, Shigeko Torihashi: Mesenchymal stem cells originating from ES cells show high telomerase activity and therapeutic benefits Differentiation 査読あり Vol.82, No.3, 2011 pp153-164 DOI: 10.1016/j.diff.2011.07.001.

③ 蜷川菜々、村上留美、田中優介、中川寛紀、鳥橋茂子：マウス ES 細胞由来間葉系幹細胞の作成とその特異的分化能 (Differentiation potential of mesenchymal stem cells originating from mouse ES cells, in vitro) 組織培養研究 (Tissue Culture Research Communication) 査読あり、29 巻 2 号 2010 年 pp155-165

[学会発表] (5 件)

① Nana Takenaka, Mami Kobayashi, Yuka Kawabata, Kohzo Nagata, Shigeko Torihashi : Generation of Induced Pluripotent Stem Cells using Rat Mesenchymal Stromal Cells Originated from a New Model of Metabolic Syndrome, 11<sup>th</sup> ISSCR (国際幹細胞学会) 2013

② Nana Ninagawa, Eri Isobe, Yuri Hirayama, Mami Kobayashi, Yuka Kawabata, Shigeko Torihashi: Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Derived from ES Cells Promotes Muscle Regeneration; Re-innervation and Thereby Accelerates Functional Recovery of Injured Skeletal Muscle, 10th ISSCR (国際幹細胞学会) 2012

③ Nana Ninagawa, Eri Isobe, Rumi Murakami,

Mami Kobayashi, Shigeko Torihashi : Transplantation of Mesenchymal Stem Cells from Mouse ES Cells after Muscle Injuries Promotes Skeletal Muscle Regeneration and Improves Functional Recovery, 9th ISSCR(国際幹細胞学会) 2011

④ Nana Ninagawa, Mami Kobayashi, Eri Isobe, Yuri Hirayama, Yuka Kawabata, Shigeko Torihashi: Transplantation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from Mouse ES Cells Promote Skeletal Muscle Regeneration and Improve Functional Recovery, 第 34 回日本分子生物学会年会 2011

⑤ Shigeko Torihashi, Nana Ninagawa : CD105 Positive Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells from Mouse ES Cells, 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologist Jointly Sponsored by the Asia-Pacofoc Developmental Biology Network 2010

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 1 件)

名称: メタボリックシンドロームモデルラット誘導多能性幹細胞及び製造方法

発明者: 鳥橋茂子、永田 浩三、竹中 菜々、川端 佑果

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-100645

出願年月日: 平成 25 年 5 月 13 日

国内外の別: 国内

○ 取得状況 (計 2 件)

① 名称: 間葉系幹細胞およびその産生方法

発明者: 鳥橋茂子、蜷川 菜々

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特許第 5429755 号

取得年月日: 平成 25 年 12 月 13 日

国内外の別: 国内

② 名称: Mesenchymal stem cell and method for production thereof

発明者: 鳥橋茂子、蜷川 菜々

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: US.8,470,595B2

取得年月日: 平成 25 年 6 月 25 日

国内外の別：国外（米国）

[その他]

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~st-home/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鳥橋 茂子(TORIHASHI,Shigeko)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90112961

### (2)研究分担者

平田 仁(HIRATA Hitoshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号・80173243

川部 勤(KAWABE Tsutomu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号・20378219

石田 和人(ISHIDA Kazuto)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号・10303653