

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590203

研究課題名(和文)細胞治療薬としての間葉系幹細胞の特性解析指標の探索とバリデーション

研究課題名(英文) Investigation of index of therapeutic modes as cell drugs in human mesenchymal stem cells and their validation

研究代表者

佐藤 光利 (SATO, Mitsutoshi)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：60231346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞(hMSC)のサイトカイン分泌プロファイリングおよび複数ロットのサイトカイン分泌能の差を検討し、虚血後のサイトカイン分泌能予測因子を明らかにした。虚血後におけるhMSCでは、血管内皮細胞成長因子(VEGF)の遺伝子発現に有意な上昇が見られた。虚血前の遺伝子発現量と虚血後のVEGF応答性から、17種類の遺伝子が見出された。このうちVSR6およびVSR7の2遺伝子は、RNAiによる阻害後に虚血後のVEGF分泌量および分泌変化率が双方とも抑制されることが明らかになり、これらの遺伝子は、hMSCの虚血組織保護効果予測因子として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the candidate genes which can become a marker to predict vascular endothelium growth factor (VEGF) secretional level of human mesenchymal stem cells (hMSCs) under ischemia. hMSCs were cultured under normal condition or ischemic condition. Cell supernatant was collected after 24hr and VEGF were measured with ELISA. We analyzed the correlation between gene expression before ischemia (Affymetrix HG-U133Plus2.0) and VEGF secretion after ischemia in hMSCs among six lots. 17 genes showed positive correlation in all combination of pre-ischemic gene expression and post-ischemic VEGF level (the change of amount or rate). Furthermore, RNAi against 2 of the 17 genes reduced VEGF secretion in response to ischemia. In this study, 17 genes were identified as candidate genes which could assess quality and efficacy of hMSCs after ischemia. In addition, it is suggested that 2 genes, the knockdown of which decrease the VEGF response, contribute to enhance VEGF secretion under ischemia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療 ヒト間葉系幹細胞 虚血 サイトカイン 細胞医薬品 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

様々な疾病に起因した組織や器官の機能不全に対して、組織再生または機能回復を目指した「再生医療」が現在注目されており、細胞治療のツールとして、体性幹細胞、胚性幹細胞、人工多能性幹(iPS)細胞などの研究が活発に行なわれている。

心筋細胞はほとんど分裂・増殖をしないため、自己再生能力に乏しいとされており、虚血性心疾患などで障害を受け、正常心筋細胞が著しく失われた場合には、重症心不全へと進行する。慢性心不全に対する内科的治療成績は、 $\beta$ -アドレナリン受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)により飛躍的に向上し、さらに植込み型除細動器やペースメーカーなどの非薬物的治療により生命予後は改善している。一方、内科的治療では改善しない不可逆的な重症心不全に対しては、心臓移植や補助人工心臓などの置換型治療が必要となる。しかし、心臓移植後の免疫拒絶やデバイスのトラブルなどといった治療特異的な欠点があるほか、慢性的なドナー不足を含め社会的な問題点も依然として存在しており、これらを解決する新たな治療法として、心筋再生療法が期待されている。

ヒト体性幹細胞の中でも、骨髄に含まれる間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell: MSC)は、筋肉、血管、骨、軟骨、脂肪などへの分化が可能な細胞として広く知られており、心筋梗塞などの虚血性心疾患に対しても修復効果を示すことから、心筋再生療法における有力なツールの一つであると考えられている。その作用機序については、損傷部位に移動したMSCが組織へと組み込まれ、心筋細胞や血管細胞などの組織細胞へと分化するためであると考えられてきた。しかし近年、1) 移植後のMSCの分化割合が低い、2) MSCの培養上清やサイトカインの直接投与によっても同様の効果が得られるなどの報告から、局所あるいは遠くに存在する目標部位に対してサイトカインを放出することで治療効果に貢献していることも示唆されている。MSCからのサイトカイン分泌の役割が注目されており、中でも、修復効果の一つとして知られる治療的血管新生については、サイトカインの関与が大きいと考えられている。しかし、MSCによる虚血性組織の修復についての実態はまだ明らかになっておらず、虚血性疾患に対するその有効性を理解するためには、投与された細胞が置かれるストレスの多い環境下での細胞の挙動を理解することが重要である。

## 2. 研究の目的

### (1) ヒト間葉系幹細胞プロファイリング

本研究は、*in vitro*で擬似的に再現した虚血条件下においてヒト間葉系幹細胞(human Mesenchymal Stem Cell: hMSC)を培養し、同時に通常条件で培養したものと比較を行

うことで、虚血ストレスに対するhMSCの応答性を検討した。中でも血管新生関連因子に着目し、虚血条件下において特異的に分泌増加する血管新生関連サイトカインを探索した。遺伝子発現量が有意に増加したサイトカインをELISA法によって、実際の分泌量を測定して、虚血ストレス下におけるhMSCの血管新生関連サイトカインに対する分泌プロファイリングを試みた。

### (2) ヒト間葉系幹細胞のロット差の検討

MSCを虚血性疾患治療用の細胞・組織利用医薬品と考えた場合には、ドナーの差やロット差によって製品の力価、あるいは力価に反映され得る生理活性物質の分泌能に大きな差が生じることが品質管理上の課題となり得る。加齢によりMSCの染色体上に変化が生じることが報告されており、この変化が細胞の生理的機能に影響を与え、潜在的にMSCによる細胞治療の効果を制限することも懸念される。成長因子や薬剤の併用、遺伝子導入などにより、MSCの機能を高める試みも数多く行われているが、いずれにしても移植後に十分な治療効果を得るためには、使用されるMSCがどの程度の修復能力を持つかを予め知ることが重要であり、MSCによる効果を予測するためには、目的に則した幹細胞の特性解析指標が必要であると考えられる。

本研究では、血管新生関連サイトカイン分泌能を予測するための指標を同定する目的で、まず、複数ロットのhMSCを同一条件下において培養し、ロット間におけるサイトカイン分泌能の差に対する検討を試みた。次に、ロット間におけるサイトカイン分泌能の差は、hMSCの虚血前における何らかの遺伝子発現量の差に関連するという仮説を立て、虚血前における遺伝子発現量と虚血条件下のサイトカイン分泌との相関関係を統計学的に解析し、hMSCの虚血環境における血管新生関連サイトカイン分泌能と相関する遺伝子を探索・同定した。さらにRNAiを用いて、これらの遺伝子の機能を阻害することによって、各遺伝子とhMSCのサイトカイン分泌能との因果関係を評価した。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用細胞および細胞培養条件

骨髄由来hMSCは、Lonza社より入手した。各ロットの年齢・性別・人種に関する情報は以下の通りである虚血条件下におけるhMSCの血管新生関連遺伝子発現変化を検討する目的で、hMSC(継代数9(PS#9))を $1 \times 10^4$  cells/wellとなるよう96穴細胞培養プレート上に撒き、MSCBM [Lonza]にMSCGM SingleQuots [Lonza]を加えて調整した基本培地中で37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下で80%コンフルエントになるまで培養した。その後、培養した上記の96穴細胞培養プレートを、コントロール群および虚血群に分け、次に示す通常条件または擬似的虚血条件下においてさら

に 24 時間培養し、Total RNA を抽出した。6 つのロット (A, B, C, F, G, H) について、同様の実験を行った。

・通常条件 (コントロール群)

インキュベーション: 通常酸素濃度 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>; MCO-175 [SANYO])

培地: 無血清、グルコース(+) 4.5g/dL DMEM [GIBCO, Invitrogen] + 100 unit/mL ペニシリン G + 100 μg/mL 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

・擬似的虚血条件 (虚血群)

インキュベーション: 酸素濃度 = 1.0% (37 °C, N<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> = 94.0%:1.0%:5.0%; MCO-175M [SANYO])

培地: 無血清、グルコース(-) DMEM [GIBCO, Invitrogen] + 100 unit/mL ペニシリン G + 100 μg/mL 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

(2) 培養細胞からの Total RNA の抽出

培養細胞からの Total RNA の抽出は、MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit [QIAGEN], BioRobot M48 Workstation [QIAGEN] を使用し、QIAGEN 社のマニュアルに従って行った。RNA サンプル濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し、260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比が 1.6 以上であることを指標に純度を確認した。吸光度測定は NanoDrop ND-1000 [Thermo] を用いて行った。抽出した RNA サンプルは -80 °C にて冷凍保存した。

(3) 虚血後における血管新生関連遺伝子発現量の測定

血管新生関連遺伝子発現量を網羅的に解析するために、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors [SA Biosciences, cat# PAHS-072] を用いた。

各ロットについて RNeasy Mini Kit [QIAGEN] を用いてサンプルを濃縮し、Total RNA が 1 μg/10 μL となるよう調整した後、SA Biosciences 社のマニュアルに従い、各 RNA サンプルから cDNA を合成した。

次いで、合成した cDNA を用いて同マニュアルに従い溶液を調整後、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System [Applied Biosystems] にて RT-PCR を行い、各サイクルについてリアルタイムでモニターした。

検出された PCR シグナルからベースラインを設定し、これをもとに PCR 産物の増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Threshold Cycle : Ct) を算出し、Ct 値 > 35 の遺伝子については発現がないものとみなした。各遺伝子の mRNA 発現量を補正するための内部標準として  $\beta$ -actin, 2-microglobulin、Hypoxanthine phospho-

ribosyltransferase-1、Ribosomal protein L13a の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 虚血条件下における hMSC のサイトカイン分泌プロファイリング

RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array により 84 種類の遺伝子発現量を検討したところ、虚血後における hMSC では、アンジオゲニン、レプチン、胎盤成長因子 (PIGF)、1 型形質転換成長因子 (TGF- $\beta$ 1)、血管内皮細胞成長因子 (VEGF) の遺伝子発現に有意な上昇が見られた ( $p < 0.01$ )。これら 5 種類のサイトカインについて ELISA 法によって測定したところ、VEGF については生理的レベルに相当する分泌量および虚血時における有意な分泌上昇が認められた (図 1)。このことから、虚血条件下で発現が増加するサイトカインの中で、VEGF は主要なものであることが示唆された。

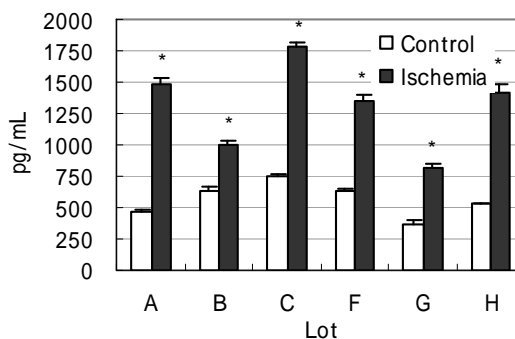


図1 虚血後のVEGF分泌量変化 (n=5)

\* $p < 0.05$  vs. Control group of each lot ( $p(\text{Lot}) < 0.05$ )

一方、虚血条件下における hMSC の VEGF 分泌については有意なロット差が認められた。ロット間における分泌能の差は、hMSC 移植後に生じる血管新生の程度、ひいては治療効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。十分な治療効果を確保するためには、投与される細胞の修復能力を予め把握することが重要であり、そのための特性解析指標が必要と考えられた。

(2) 虚血後における hMSC の VEGF 分泌能予測因子の探索および因果関係の評価

54,613 種類の cDNA 配列 (Probe Set) について、虚血前の遺伝子発現量と虚血後の VEGF 応答の相関を検討した結果、全ての組み合わせで正の相関 ( $p < 0.01$ ) を示した VSR 遺伝子は 17 種類であった。さらに、VSR6 および VSR7 の 2 遺伝子については、RNAi による阻害後に虚血後の VEGF 分泌量および分泌変化率が双方とも抑制されることが明らかとなった (図 2, 3)。

ここで同定された 17 種類の遺伝子は、継代数に関わらず虚血後の VEGF 分泌と虚血前の遺伝子発現量が相関することから、hMSC の

VEGF 分泌能予測因子となる可能性があると考えられる。RNAi により VEGF 分泌の減少が確認された 2 遺伝子は、虚血後における

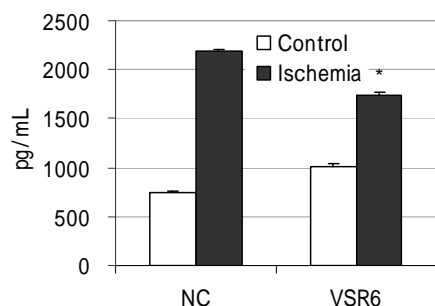


図2 VSR6阻害後のVEGF分泌量変化 (n=5)

\* $p < 0.05$  vs. NC-Ischemia

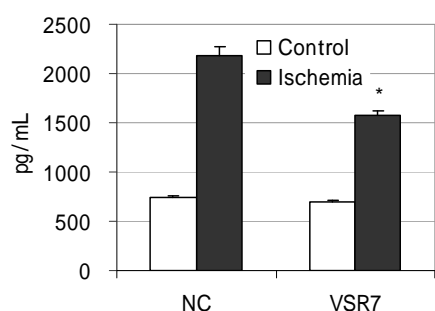


図3 VSR7阻害後のVEGF分泌量変化 (n=5)

\* $p < 0.05$  vs. NC-Ischemia

VEGF の分泌において機能的に寄与していることが示唆され、VEGF 分泌能予測因子の有効な候補であると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

H. Doi, R. Sakakibara, M. Satoh, S. Hirai, T. Masaka, M. Kishi, Y. Tsuyusaki, A. Tateno, F. Tateno, O. Takahashi and T. Ogata: Dietary herb extract Rikkunshi-to ameliorates gastroparesis in Parkinson's disease: A pilot study. *Eur. Neurol.*, 71, 193-195 (2014), 査読有  
DOI : 10.1159/000355608

H. Doi, R. Sakakibara, M. Kishi, Y. Tsuyusaki, F. Tateno, S. Hirai, T. Masaka and M. Satoh: Gastric emptying and colonic transit in patients with Parkinson's disease. Effects of Rikkunshi-to on gastrointestinal dysfunction. *Autonomic Nervous System*, 50, 300-305 (2013), 査読無

H. Doi, R. Sakakibara, M. Satoh, S. Hirai, T. Masaka, M. Kishi, Y. Tsuyusaki, A. Tateno, F. Tateno, O. Takahashi and T.

Ogata: Nizatidine ameliorates gastroparesis in Parkinson's disease: A pilot study. *Movement Disorder*, 1-4 (2013), 査読有

DOI : 10.1002/mds.25777

M. Satoh, A. Kogure, J. Hagino, H. Doi, T. Masaka and R. Sakakibara: Usefulness of monitoring blood L-dopa and L-dopa metabolite concentrations in patients with advanced Parkinson's disease receiving COMT inhibitor entacapone combination therapy. *Pharmacometrics*, 85, 15-24 (2013), 査読有

M. Satoh, Y. Tsuruoka, A. Kuzuu, H. Doi, T. Masaka and R. Sakakibara: Monitoring of blood L-DOPA and L-DOPA metabolite concentrations and adverse events in patients with advanced Parkinson's disease receiving L-DOPA and MAO inhibitor selegiline ((-)-deprenyl) combination therapy: A clinical study. *Pharmacometrics*, 84, 9-16 (2013), 査読有

H. Tanaka, M. Arai, Y. Tomoda, T. Wada, K. Yago and M. Satoh: Evaluation of renal adverse effects of combination anti-retroviral therapy including tenofovir in HIV-infected Patients. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 16, 405-413 (2013), 査読有

<http://ejournals.library.ualberta.ca/index.php/JPPS/article/view/18802>

H. Doi, R. Sakakibara, M. Satoh, T. Masaka, M. Kishi, A. Tateno, F. Tateno, Y. Tsuyusaki, O. Takahashi: Plasma levodopa peak delay and impaired gastric emptying in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.*, 319, 86-88 (2012), 査読有  
DOI : 10.1016/j.jns.2012.05.010

M. Satoh, A. Machida, N. Shinozaki, R. Inagawa and C. Yanagawa: Effects of oral charcoal adsorbents in model rats with chronic renal failure and potential usefulness of plasma indoxylsulfate concentration as an indicator of renal function. *Pharmacometrics*, 83, 51-58 (2012), 査読有

M. Shinada, F. Narumi, Y. Osada, K. Matsumoto, T. Yoshida, K. Higuchi, T. Kawasaki, H. Tanaka and M. Satoh: Synthesis of phenserine analogues and evaluation of their cholinesterase inhibitory activities. *Bioorganic & Medicinal Chem.*, 20, 4901-4914 (2012), 査読有

DOI : 10.1016/j.bmc.2012.06.048

M. Satoh, Y. Takiyo, H. Doi, T. Masaka and Y. Suzuki: The blood concentration and therapeutic efficacy of azathioprine in patients receiving infliximab

combination therapy for refractory Crohn's disease: A clinical study. *Pharmacometrics*, 82, 9-16 (2012), 査読有

M. Satoh, M. Tsuchiya, Y. Takiyo, H. Doi, T. Masaka and Y. Suzuki: Assessment of combined therapy with purine derivatives and infliximab in patients with refractory Crohn's disease. *Pharmacometrics*, 82, 1-8 (2012), 査読有  
S. Yasuda, T. Hasegawa, T. Hosono, M. Satoh, K. Watanabe, K. Ono, S. Shimizu, T. Hayakawa, T. Yamaguchi, K. Suzuki and Y. Sato: AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells. *Biochem. J.*, 437, 345-355, (2011), 査読有  
DOI: 10.1042/BJ20110520

S. Muto, Y. Kouyama, Y. Yokoyama, H. Okuno, T. Ishii, T. Masaka, Y. Matsuzawa, T. Kawashima, K. Shirai: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay system to determine the presence of antibodies specific for taxane structures. *Biol. Pharm. Bull.*, 34(4), 562-566, (2011), 査読有  
DOI:10.1248/bpb.34.562

M. Satoh, M. Yamazaki, H. Doi, T. Masaka and Y. Suzuki: Correlation between cyclosporin A concentration and lipid concentration in patients with ulcerative colitis. *Pharmacometrics*, 80, 53-58 (2011), 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

M. Satoh, T. Ohki, T. Kubo, Y. Sato and S. Muto: Study of immunomodulatory effects in human mesenchymal stem cells. 第 87 回日本薬理学会年会(ポスター: 一般演題), 仙台, 2014.3.21

M. Satoh, M. Nakajima, T. Kuramochi, S. Yasuda and Y. Sato: Modes of action of genes facilitating ischemia-induced VEGF secretion in human adipose-derived mesenchymal stem cells. 第 86 回日本薬理学会年会(ポスター: 一般演題), 福岡, 2013.3.21

佐藤光利: ヒト脂肪由来幹細胞における虚血応答性制御因子探索研究. 第 9 回東邦大学 4 学部合同学術集会(ポスター: 一般演題), 東京, 2013.3.9

T. Kuramochi, M. Satoh, H. Atsuki, S. Yasuda, T. Hayakawa, K. Suzuki and Y. Sato: Modes of action of genes facilitating ischemia-induced VEGF secretion in human mesenchymal stem cells. 第 85 回日本薬理学会年会(ポスター: 一般演題), 京都, 2012.3.14

〔図書〕(計 2 件)

安生紗枝子、上野芳男、小野俊介、佐藤光利、寺田勝英、渡辺宰男、共立出版、新薬創製への招待 - 創薬から市販後の監視まで - 改訂新版、2013、253

松尾和廣、佐藤光利、西澤健司、医薬ジャーナル社、抗菌薬の適正使用による薬剤耐性菌制御 ~ シプロフロキサシン注射薬の投与法に関する検討 ~、2013、102-107

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 未分化細胞の心筋分化活性検出用マーカー、核酸分子、プライマーペア、キット、心筋分化抑制剤、未分化細胞の心筋分化活性検出方法、心筋分化活性を有する細胞の単離方法、未分化細胞の心筋分化活性のモニタリング方法、および未分化細胞の心筋分化の抑制方法

発明者: 佐藤陽治、長谷川哲也、山口照英、細野哲司、佐藤光利

権利者: 佐藤陽治、長谷川哲也、山口照英、細野哲司、佐藤光利

種類: 公開公報

番号: 特願 2012-209759

出願年月日: 2012 年 09 月 24 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 光利 (SATOH, Mitsutoshi)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号: 6 0 2 3 1 3 4 6

(2) 研究分担者

佐藤 陽治 (SATO, Yoji)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・部長

研究者番号: 4 0 3 1 2 2 8 5

武藤 里志 (MUTO, Satoshi)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号: 5 0 1 2 0 3 1 6