

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791446

研究課題名（和文） 単一間葉系幹細胞の分裂機能制御と老化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of division control and aging mechanism in single mesenchymal stem cell.

研究代表者

馬渕 洋 (MABUCHI YO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：50424172

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞は、骨髄をプラスチック上で培養し、接着した雑多な細胞を間葉系幹細胞として使用されることが多いため、間葉系幹細胞の正確な能力を解析することが困難になっている。我々は、単一分離した間葉系幹細胞を用いて分裂機構と老化のメカニズムの解析を行った。LNGFR と Thy-1 マーカーを用いて分離した細胞クローンのうち、非常に増殖能力が高いクローンは、多分化能が高く、老化細胞の割合も低いことが分かった。増殖能力が低いクローンは老化した細胞が多く含まれおり、ゲノムエラーの割合も高かった。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells (MSCs), conventionally isolated based on their adherence to plastic are heterogeneous and have poor growth and differentiation, limiting the ability to investigate their intrinsic characteristics. We elucidate the division control and aging mechanism in single mesenchymal stem cell. We improved prospective clonal isolation technique and reveal that the combination of three cell surface markers, LNGFR and Thy-1, selects highly enriched clonogenic cells. The clonal characterization of LNGFR⁺Thy-1⁺ cells demonstrated cellular heterogeneity among each clone. The rapidly expanding clone (REC) exhibited robust multilineage differentiation and self-renewal potency, while the others tended to acquire cellular senescence via p16INK4a and exhibited frequent genomic errors.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療生物学・間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

体細胞は生物を構成する細胞のうち生殖細胞以外の細胞を示すが、限られた回数しか分裂できず、限界まで分裂した細胞は“細胞老化”と呼ばれる状態になることが知られている。細胞老化は不可逆的に細胞増殖が抑制された状態であり、種々の細胞増殖因子を用

いても増殖を引き起こすことは不可能である。一方幹細胞は、各組織あるいは細胞の源となる細胞であり、多系統の細胞に分化する「多分化能」と、幹細胞を再びつくる「自己複製能」をもつ細胞と定義される細胞である。未分化性を維持した状態で体中の組織に局

在し、環境因子からの制御を受けながら細胞老化を引き起こすことなく、生涯にわたり細胞の供給に貢献する。近年、組織幹細胞の細胞老化制御の破綻による、幹細胞の自己複製能の喪失が、様々な病気を引き起こす原因になることが明らかになってきている (Mohrin *et al*, 2010)。

骨髄に存在する造血幹細胞は、自己複製能と血液細胞への分化能を有し、これらの幹細胞能力とその生死によって造血系を厳密に制御している。最近の研究から、造血幹細胞を老化させるシグナルとして p19 や p16 を介して p53 による造血幹細胞の老化をもたらすことが示された (Oguro *et al*, 2007)。老化により造血幹細胞の増殖が低下すると、造血が減り貧血をはじめとした血液疾患の原因となる。健康状態ではこうした老化促進と防御機構のバランスが保たれ正常な造血能が維持されているが、活性酸素の生成または DNA 障害によりバランスが崩れた場合に、造血幹細胞の老化や細胞死が起こると考えられる。細胞の腫瘍化に関連する遺伝子はいくつか知られているが、その中には細胞老化に関連する遺伝子も多く存在する。申請者は、Ink4a/Arf ノックアウトマウスの骨髄細胞を用いて、Oncogene である c-Myc を発現させることにより、骨肉腫が形成されることを報告した (Shimizu *et al*, 2010)。腫瘍抑制遺伝子として知られる Ink4a は、細胞周期チェックポイントの G1 期チェックポイントにおいて細胞周期を停止させる遺伝子であり、細胞の異常な増殖を停止させる機能が知られているが、一方で細胞の老化に関連することが報告されている (Kim *et al*, 2007)。また、放射線照射による p53 遺伝子の発現遅延がリンパ球の増殖制御に関わっていること、さらに、実際に老化したヒト線維芽細胞において p53 の活性化がみられることや、p53 の機能

が欠損したヒト線維芽細胞が DNA 障害や細胞老化の phenotype を示さないことが報告されており、特に p53 は細胞老化において中心的な役割を果たしていると考えられている。これらの知見から、Ink4a や p53 が DNA 障害などの種々のストレスにより活性化され、細胞分裂の停止・DNA 損傷の修復あるいは細胞死の誘導を惹起することなどから、腫瘍抑制遺伝子と老化現象は密接に関わっていることが考えられる。

しかしながら、間葉系幹細胞において、p53 に着目した細胞周期や細胞老化を解析した研究は、あまり進んでいないのが現状である。その理由として、間葉系幹細胞では造血幹細胞研究で長く行われてきたような細胞表面抗原解析が進んでおらず、特異的な抗原マーカーが知られていないことがあげられる。骨髄細胞を培養皿上で数週間培養後、附着増殖した細胞をもって間葉系幹細胞とされており、この方法で得られた細胞集団は、間葉系幹細胞・前駆細胞・血液細胞等の雑多な集団にすぎず、このような細胞集団を用いての性状解析で得られた結果を間葉系幹細胞そのものの性状とはみなすことが困難である。申請者らはこれまでにフローサイトメトリーによる細胞分離技術を活用した組織幹細胞分離に関する研究を精力的に行ってきたおり、近年マウスおよびヒト骨髄細胞より特異抗原を指標にフローサイトメトリーを用いて間葉系幹細胞を直接分離する技術を確立した (Morikawa, Mabuchi *et al*, 2009, Mabuchi *et al*, 2009, 産業財産権：特願 2007-231298)。特にヒト間葉系幹細胞は LNGFR・Thy-1 共陽性細胞中に高頻度に含まれており、単一細胞分取によって 96 穴 1 プレートあたり約 20 個という高頻度で間葉系幹細胞の特徴的性質とされる CFU-F (線維芽細胞様コロニー形成能)、長期増殖能および多

分化能を持つことが示された。この高頻度で培養増幅可能であるが故に、単一細胞由来の間葉系幹細胞クローンを得ることが非常に容易になり、単一細胞を用いた間葉系幹細胞の詳細な解析が可能となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、単一間葉系幹細胞を用いて、自己複製に伴う老化現象の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞能力に関わる老化の役割

これまでの研究成果から、フローサイトメーターを用いてヒト骨髄細胞より特異抗原 (LNGFR・Thy-1) を指標に、間葉系幹細胞を直接分離する技術を確立している。更にこれまでの解析より、単一細胞培養後の LNGFR・Thy-1 共陽性細胞は、増殖能力を低下すること無く増え続け、1ヶ月後には約 4×10^6 個まで増殖することを確認している。また、それらの細胞は、骨・軟骨・脂肪などの間葉系細胞への分化能を持つことが分かっている。まず始めに、間葉系幹細胞の能力と老化の関係について調べる。

(2) p53 遺伝子欠損間葉系幹細胞の細胞周期と分裂様式についての観察

幹細胞の細胞分裂様式をより詳細に調べるため、タイムラプスビデオイメージングによって自己複製モデルを調べる。細胞をタイムラプスイメージング用のガラスディッシュに播種し、インキュベータ内で写真撮影する。ビデオイメージングを用いて単一細胞の細胞分裂を詳細に調べる。p53 遺伝子を欠損させた間葉系幹細胞の分裂様式 (対称分裂・非対称分裂) について変化があるかどうかの観察をする。さらに、分裂画像が正確に撮影できるよう、PKH を用いて間葉系幹細胞をマーキングや培養液をメチルセルロースな

どの粘性の高いものにする工夫も行う。幹細胞自己増殖の際の細胞分裂と細胞周期の2つの重要な現象を調べることにより、幹細胞がどのような増え方をするのか、また p53 遺伝子が細胞分裂にどのように関わっているのかを細胞分裂・細胞周期を可視化することにより明らかにする。

(3) 放射線照射による自己複製能・多分化能への影響

細胞は DNA 障害により、細胞死や老化が促進されることが知られている。本実験では、間葉系幹細胞に放射線照射を行い、DNA 損傷を引き起こした際に間葉系幹細胞能力にどのような変化が起こるかを調べる。放射線照射の線量の調節だけでなく、酸化ストレスなど間葉系幹細胞へのダメージの与え方を変え、自己複製能・分化能への影響を調べる。

4. 研究成果

本研究では、申請者らが開発した単一間葉系幹細胞分離方法を用いて、自己複製に伴う老化現象の解明を行った。フローサイトメーターを用いてヒト骨髄細胞より特異抗原 (LNGFR・Thy-1) を指標に single cell sorting を行い、単一細胞培養にてヒト間葉系幹細胞のクローンを得た。増殖の速い MSC クローンを REC (Rapidly- Expanding Clone) と名づけ、増殖の速度にしたがって MEC (Moderately-)、SEC (Slowly-) と区分けした。これらグループの分化能力を比較したところ、骨分化能力において変化はなかったが、脂肪分化能力が REC で高く、SEC では低いことが確認された。REC、MEC、SEC 細胞の違いを、分化能力だけでなく細胞周期や老化の観点でも調べた。SA-b-GAL 染色を行ったところ、SEC では 70% 以上陽性だったのに対して、REC では、数%のみ陽性であるこ

とがわかった。細胞周期に関係している p16,p19,p21 の発現を定量 PCR で調べてみたところ、p19 や p21 の違いはほとんど無かったが、p16 に大きな違いがあり、SEC で p16 の発現が上昇していることが確認され、p16 を経た老化が進んだ状態にあることが示唆された。REC、MEC、SEC 細胞の1ヶ月培養後、ゲノミックエラーを確認したところ、REC はほとんど確認できなかったが、MEC や SEC では一部確認されたクローンがあった。また、p53 遺伝子欠損間葉系幹細胞は、増殖能力が高く、同時に *in vitro* での分化能が非常に高いことを確認した。単一レベルの間葉系幹細胞について老化現象を解析することで、間葉系幹細胞の自己複製能や分化能に密接に関わっていることが示唆された。

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8件)

(1) Kabashima-Niibe A, Higuchi H, Takaishi H, Masugi Y, Matsuzaki Y, Mabuchi Y, Funakoshi S, Adachi M, Hamamoto Y, Kawachi S, Aiura K, Kitagawa Y, Sakamono M, Hibi T. Mesenchymal Stem Cells Regulate Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Tumor Progression of Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Sci*. 2013 Feb 104(2):157-164. doi: 10.1111/cas.12059. (査読あり)

(2) Araki D, Kawamura Y, Niibe K, Suzuki S, Morikawa S, Mabuchi Y, Nakagawa T, Okano H and Matsuzaki Y. Primary evaluation of induced pluripotent stem cells using flow cytometry. *Inflammation and Regeneration*. 2013 Jan 33(1):3-12. (査

読あり)

(3) Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H, Matsuzaki Y. (These authors contributed equally to this work.) Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nat Protoc*. 2012 Dec 7(12):2103-2111. doi: 10.1038/nprot.2012.125. (査読あり)

(4) Mabuchi Y, Houlihan DD, Okano H, Matsuzaki Y. Discovering the true identity and function of mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration*. 2012 Sep 32(4):146-151. (査読あり)

(5) Mishima K, Inoue H, Nishiyama T, Mabuchi Y, Amano Y, Ide F, Matsui M, Yamada H, Yamamoto G, Tanaka J, Yasuhara R, Sakurai T, Lee MC, Chiba K, Sumimoto H, Kawakami Y, Matsuzaki Y, Tsubota K, Saito I. Transplantation of Side Population Cells Restores the Function of Damaged Exocrine Glands Through Clusterin. *Stem Cells*. 2012 Sep 30(9):1925-1937 doi: 10.1002/stem.1173. (査読あり)

(6) Muto J, Imai T, Ogawa D, Nishimoto Y, Okada Y, Mabuchi Y, Kawase T, Iwanami A, Mischel PS, Saya H, Yoshida K, Matsuzaki Y, Okano H. RNA-Binding Protein Musashi1 Modulates Glioma Cell Growth through the Post-Transcriptional Regulation of Notch and PI(3) Kinase/Akt Signaling Pathways. *PLoS One*. 2012 Mar 7(3):e33431.

doi: 10.1371/journal.pone.0033431. (査読あり)

(7) Renault-Mihara F, Katoh H, Ikegami T, Iwanami A, Mukaino M, Yasuda A, Nori S, Mabuchi Y, Tada H, Shibata S, Saito K, Matsushita M, Kaibuchi K, Okada S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Beneficial compaction of spinal cord lesion by migrating astrocytes through glycogen synthase kinase-3 inhibition. *EMBO Mol Med*. 2011 Nov 3(11):682-696.

doi: 10.1002/emmm.201100179. (査読あり)

(8) Niibe K, Kawamura Y, Araki D, Morikawa S, Miura K, Suzuki S, Shimmura S, Sunabori T, Mabuchi Y, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Purified mesenchymal stem cells are an efficient source for iPS cell induction. *PLoS One*. 2011 Mar 11;6(3):e17610.

doi: 10.1371/journal.pone.0017610. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

(1) Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Francois R. M., Diarmaid D. H, Akazawa C, Okano H & Matsuzaki Y. [Identification of selective markers for highly purified human mesenchymal stem/stromal cells.] G-COE Final Symposium, 2012 年 12 月 4 日・東京

(2) Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Francois R. M., Diarmaid D. H, Okano H & Matsuzaki Y. [Identification of selective markers for highly purified human mesenchymal stem/stromal cells.]

第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日・福岡

(3) 馬淵洋、岡野栄之、松崎有未、「ヒト間葉系幹細胞の予期的分離と機能的解析」第 33 回日本炎症・再生医学会、2012 年 7 月 5 日、福岡

(4) Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Sato Y, Francois R. M., Diarmaid D. H, Okano H & Matsuzaki Y. [LNGFR and THY-1 based prospective isolation of human mesenchymal stem cells reveals functionally distinct subpopulations.] International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 10th Annual Meeting June 13-16, 2012, Yokohama

(5) Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Okano H, Matsuzaki Y. [Single cell isolation elucidates heterogeneity within the multi-potent stem cell compartment.] International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 9th Annual Meeting June 15-18, 2011, Canada

[その他]

ホームページ等

<http://www.okano-lab.com/publication>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬淵 洋 (MABUCHI YO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：50424172