

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25505002

研究課題名(和文) 多能性幹細胞由来間葉系幹細胞を使った再生医療研究

研究課題名(英文) Study for mesenchymal stem cell derived from human iPS cell

研究代表者

江良 択実 (Era, Takumi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：00273706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)は、多分化能をもち、試験管内にて増殖可能かつ腫瘍原性の低い幹細胞である。すでに臨床に応用されているが、高齢者からの分離効率の低さなど、解決すべきいくつかの問題点が存在する。それらの問題点を克服するために、本研究では1) MSCをiPS細胞より誘導する方法の確立、2) 誘導したMSCの疾患モデルでの効果の検討、を目的とする。本研究では、1) 誘導したMSCは脂肪、軟骨、骨細胞への分化能を持つこと、2) 皮膚潰瘍や肝障害線維症モデルに治療効果をもっていることを、明らかにした。これらの結果は、ヒトiPS細胞由来MSCが、将来の治療ツールの候補として有用であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) were initially isolated from bone marrow and have multipotency, a proliferative activity in vitro and low-risk for tumorigenesis. Although MSC is applying for the regenerative medicine, there are some limitation such as a low isolation activity in elder patients to expand the application to many proper diseases. To overcome this problem, we aim to establish the method in which MSC is induced from human iPS cells and apply it for the therapies of disease-model mice. The MSC isolated from the human iPS cell differentiation express the MSC-specific markers and can give rise to three principle descendants including adipocyte, chondrocyte and osteocyte. The treatment with MSC is effective on disease-models such skin ulcer and liver fibrosis. These results suggests that iPS cell-derived MSC is a useful candidates for therapeutic tools in the future.

研究分野：幹細胞医学

キーワード：人工多能性幹細胞 間葉系幹細胞 分化誘導 疾患モデルマウス 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞の1つである血液幹細胞を用いての骨髄移植や末梢血液幹細胞移植は、血液悪性疾患の治療法としてすでに確立しており、これらの疾患の予後を飛躍的に改善させた。治療の根幹をなす戦略は、悪性細胞を化学療法にて可能なかぎり減少させ、同時に、失われた正常細胞の代わりに幹細胞を後に供給することで患者の生命を救おうということである。この例をみればわかるように、幹細胞や前駆細胞の移植は欠損した組織の補充としてあるいは治療に伴う消費・消失の補填療法としてその効果が期待できる治療法である。したがって、血液以外の組織での幹細胞の臨床応用に期待が高まっている。

血液幹細胞に次いで間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) は臨床応用が進みつつある幹細胞である。間葉系幹細胞は成体の骨髄や脂肪組織に広く分布し、比較的容易に分離することができる。線維芽細胞状の形態をもち、試験管内では、適切な条件下で増殖を維持することが可能である。この細胞は、3つの主要な間葉系細胞系列、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞に分化できる能力を有し、それ以外にも、筋肉細胞や腱細胞など様々な間葉系細胞へ分化する能力をもち持っている。間葉系幹細胞はその分化能を利用して軟骨が損傷した関節内への投与や骨損傷での損傷修復効果を期待しての投与がすでに試みられている。また間葉系幹細胞は免疫学的な修飾細胞として働く。試験管内では、同種の細胞に反応したTリンパ球の増殖を抑制することが判明している。そこでこの特徴を利用して、骨髄移植時に投与することで移植後に起こるGVHDへの予防治療が試みられている。さらに、最近では様々な炎症時に起こる細胞反応を抑制することが疾患モデル動物を使った研究から明らかにされ、炎症を伴う疾患、たとえば関節リウマチ、慢性肝炎、炎症性腸疾患、急性腎炎の治療応用が期待さ

れている。

すでに臨床的利用が徐々に始まっている幹細胞であるが、間葉系幹細胞を広く臨床に応用するには以下のような、いくつかの医学的な、あるいは、医療上の問題点が存在する。

- 1) 骨髄、脂肪組織から分離できるとはいつても高齢者からの分離と間葉系幹細胞の増幅は難しい場合が少なくない。
- 2) 分離と増殖に1か月以上も必要のために必要時に自由に使えない。
- 3) 患者から分離する場合、間葉系幹細胞を得るために骨髄や脂肪サンプルを採取後に培養が必要なために、それらの設備を有する大学病院クラスの医療機関でないと治療が簡単ではない。すなわちこのままでは、広く一般診療として広がりにくい。
- 4) 必要時に患者から作製する方法では医療費が高額になりやすく、多くの疾患へ適応するのが難しい現実がある。
- 5) 臨床研究での治療効果の判定において、個々の個人由来の間葉系幹細胞のもつ特異的な効果との鑑別が難しく、どうしても画一的な細胞を使った臨床研究が要求される局面がある。

このように間葉系幹細胞が血液幹細胞につぐ第2の幹細胞治療として期待されながらも、この治療を一般化させるには多くの解決すべき問題点がなお存在している。

ヒトの胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)は様々な細胞へ分化できるという多能性を有しかつこの能力を維持したまま試験管内で無限に増殖させることが可能な幹細胞である。この多能性幹細胞から誘導した間葉系幹細胞の臨床応用は臨床的な治療効果さえ確立されれば、他の組織細胞、たとえば赤血球などの血液細胞や肝細胞などの臓器細胞に比べて、少量の細胞数でその効果が期待でき(プレート数枚といったスケールでOK)、現実的な再生医療と言える。規格が統一された間葉系幹細胞を1度に大量

に準備可能であることからいつでも使用することができ、総合病院クラスの医療機関にて治療投与が可能である。また1度に大量に作製することから作製の費用も各個人から樹立する場合に比べて抑えることができる。このような利点に加えて、前述のこの幹細胞の持つ問題点を解決することもでき、飛躍的に間葉系幹細胞を使った治療を発展させることが可能と考える。以上の状況をもとに、多能性幹細胞であるヒトの胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)由来の間葉系幹細胞を使つての疾患モデルの治療効果を解析する研究を提案する。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞は、すでに臨床的利用が始まっている幹細胞であるが、高齢者から分離しにくい、あるいは、必要時にすぐ使えない等の問題点が存在する。ヒトの人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの多能性幹細胞は様々な細胞へ分化できるので、多能性幹細胞から誘導した間葉系幹細胞が使用できればこれらの問題点を解決できる。本研究では、ヒト iPS 細胞由来の間葉系幹細胞の臨床応用を目指し、実験動物(マウス)での疾患モデルを使つて、iPS 細胞由来間葉系幹細胞の投与による治療効果を解析、判定する。治療効果があることが判明すれば、少ない細胞数で治療ができることから、誘導した細胞の安全性を様々な検査にて確保したうえで臨床応用の道が開かれる。そうなれば、間葉系幹細胞を使った治療を飛躍的に発展させる効果がある。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞から間葉系幹細胞 (MSC) の分化誘導

ヒト iPS 細胞を Mouse embryonic fibroblast (MEF) 上にて培養する。培地は iPS 細胞培地として 1% non-essential amino acids、2mM L-glutamine、100nM 2-mercaptoethanol (2ME)、100units/ml penicillin、100mg/ml streptomycin、

20% Knockout serum replacement、5ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium Nutrient mixture F-12 Ham を使用する。

その後、10% fetal bovine serum (FBS)、100nM 2ME を含む α -Minimum Essential Medium Eagle (MEM) に BMP4、bFGF、Activin A を加えた培地にて播種し、中胚葉を誘導する。

次に中胚葉細胞系細胞の出現は、その表面マーカーである platelet derived growth factor receptor-alpha α (以下 PDGFR α)、Vascular endothelial growth factor receptor 2 (以下 VEGFR2) にて確認する。

また、神経上皮由来の MSC では、10%FBS、100nM 2ME を含む α -MEM の培地にて誘導し、Retinoic acid (RA) も添加し、培養を行う。

(2) 疾患モデルマウスの作成

皮膚潰瘍モデルマウスの作製

マウス背部に 8mm パンチにて皮膚欠損を作製する。潰瘍周囲に MSC を局注し、2週間その創傷治癒過程を評価する。

肝線維症のモデルマウスの作製

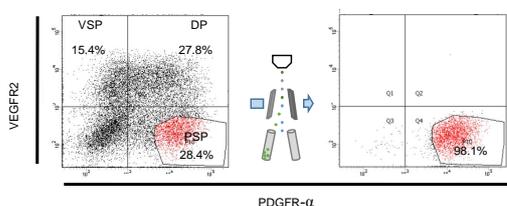
四塩化炭素を正常マウスに投与すると肝障害を起こした後、肝の線維化を引き起こす。四塩化炭素を週 2 回投与し、投与後 4 週目に PBS 又はヒト iPS 細胞由来 MSC を投与、その後も四塩化炭素の投与を継続しつつ、8 週目に組織を回収し、評価する。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞より MSC への誘導方法の確立

誘導後に中胚葉細胞の表面マーカーである PDGFR α 、VEGFR2 の発現パターンは、PDGFR α 陽性、VEGFR2 陽性の分画 (double positive cells : DP)、PDGFR α 陽性、VEGFR2 陰性の分画 (PDGFR α single positive cells: PSP)、PDGFR α 陰性、VEGFR2 陽性の分画 (VEGFR2 single positive cells: VSP)

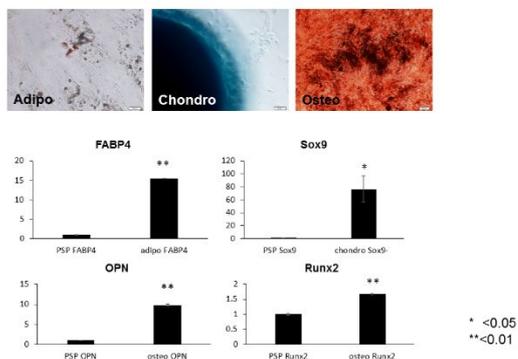
PDGFR α 陰性、VEGFR2 陰性の分画(Double negative cells: DN) の4つに分けられる (図 1)。遺伝子発現のパターンや分化能の検討から PSP 分画が筋肉細胞・骨細胞や軟骨細胞、脂肪細胞へと分化する沿軸中胚葉であり、VSP 分画が血液細胞と血管内皮細胞へと分化する側板中胚葉細胞であることが判明している。すなわち、PSP より MSC が誘導されると考えられる。中胚葉を誘導後、FACS にて PSP を分離し、MSC を誘導した (図 1)。図 1 中胚葉誘導での PDGFR α 、VEGFR2 の発現と FACS と使った PSP の分離



誘導した MSC は、脂肪、軟骨及び骨への分化能の有無の確認を試験管内にて行い、qPCR にて遺伝子発現も確認した (図 2)。

図 2 誘導した MSC の脂肪、軟骨、骨への分化能の評価

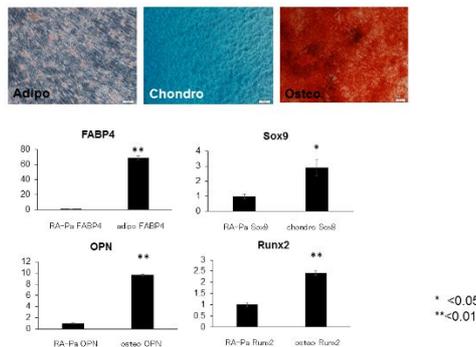
脂肪細胞 (Adipo) 軟骨細胞 (Chondro) 骨細胞 (Osteo) への分化 (特殊染色、上図) それぞれの特異的マーカーの発現 (qPCR、下図)



次に、神経上皮系細胞より誘導した MSC の分化能について検討した (図 3)。

図 3 神経上皮系細胞より誘導した MSC の脂肪、軟骨、骨への分化能の評価

脂肪細胞 (Adipo) 軟骨細胞 (Chondro) 骨細胞 (Osteo) への分化 (特殊染色、上図) それぞれの特異的マーカーの発現 (qPCR、下図)

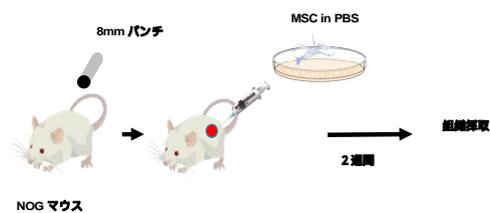


(2) マウス疾患モデルでの iPS 細胞由来 MSC の治療効果

ヒト iPS 細胞から誘導した MSC が実際に in vivo にて効果を示すかどうかを確認するため、疾患モデルマウスを作製し、MSC の投与実験を行った。

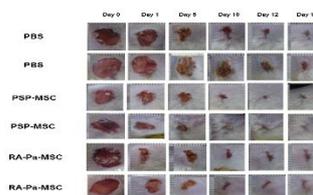
マウス背部に 8mm パンチにて皮膚欠損を作製し、潰瘍周囲に MSC を局注し、2 週間その創傷治癒過程を評価した (図 4)。

図 4 皮膚潰瘍モデルマウスを作製と MSC の投与



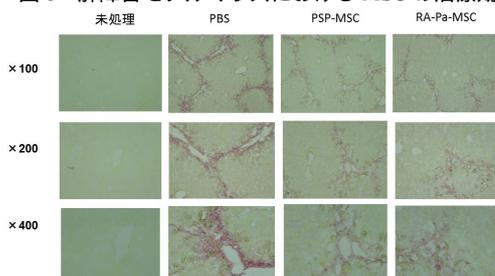
コントロールとして PBS のみ、ヒト iPS 細胞由来 MSC (中胚葉経由 : PSP、神経上皮経由 : RA-Pa) を使用した。図 5 のように創傷治癒過程を観察したところ、ヒト iPS 細胞由来 MSC の創傷治癒が PBS 投与マウスより早くなっていることがわかった。

図 5 皮膚潰瘍モデルマウスの治癒過程



次に全身疾患のモデルマウスとして四塩化炭素投与後の肝障害モデルマウスを複製し、MSC を投与、その効果を評価した。肝臓の線維組織をシリウスレッドで染めた肝臓の組織では、PBS 投与マウスに比較して MSC 投与群の染色性が低くなっていることが分かり、その効果が示された（図 6）。

図 6 肝障害モデルマウスにおける MSC の治療効果



以上より、疾患モデルマウスにおいてヒト iPS 細胞由来 MSC の効果が確認できた。今後は、安全性についての検討へと進み、最終的にはヒトへの臨床応用をめざす予定である。

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 8 件)

Miwa H and Era T. Mesoderm Differentiation from hiPS Cells. *Methods Mol Biol.* 1357: 403-13, 2016.

Motoyama K, Hirai Y, Nishiyama R, Maeda Y, Higashi T, Ishitsuka Y, Kondo Y, Irie T, Era T and Arima H. Cholesterol lowering effects of mono-lactose-appended β -cyclodextrin in Niemann-Pick type C disease-like HepG2 cells. *J Org Chem.* 11: 2079-2086, 2015.

Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T, Shimada Y, Era T, Kimura S, Eto Y, Ida H and Ohashi T. Disease modeling and lentiviral gene transfer in patient-specific induced pluripotent stem cells from late-onset Pompe disease patient. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2: 15023, 2015.

Yonehara A, Tanaka Y, Kulkeaw K, Era T, Nakanishi Y and Sugiyama D. Aloe vera Extract

Suppresses Proliferation of Neuroblastoma Cells In Vitro. *Anticancer Res.* 35: 4479-4485, 2015.

Miwa H and Era T. Generation and characterization of PDGFR α -GFPCreERT2 knock-In mouse line. *Genesis.* 53: 329-336, 2015.

Maeda Y, Motoyama K, Higashi T, Horikoshi Y, Takeo T, Nakagata N, Kurauchi Y, Katsuki H, Ishitsuka Y, Kondo Y, Irie T, Furuya H, Era T and Arima H. Effects of cyclodextrins on GM1-gangliosides in fibroblasts from GM1-gangliosidosis patients. *J Pharm Pharmacol.* 67:1133-1142, 2015.

Soga M, Ishitsuka Y, Hamasaki M, Yoneda K, Furuya H, Matsuo M, Ihn H, Fusaki N, Nakamura K, Nakagata N, Endo F, Irie T and Era T HPGCD outperforms HPBCD as a potential treatment for Niemann-Pick disease type C during disease modeling with iPS cells. *Stem Cells.* 33: 1075-1088, 2015.

曾我 美南、江良 択実 代謝性疾患由来 iPS 細胞による創薬研究 実験医学 34: 529-534, 2016.

〔学会発表〕(計 8 件)

A newly effective drug candidate was found using iPS cell derived from Niemann-Pick disease type C. 口頭、Soga M, Ishitsuka Y, Hamasaki M, Yoneda K, Furuya H, Matsuo M, Ihn H, Fusaki N, Nakamura K, Nakagata N, Endo F, Irie T, Era T. 第 13 回幹細胞シンポジウム、2015/5/30、東京

Sendai Virus Vector Provides Transgene-Free iPS Cells Derived from Chimpanzee Blood. 口頭、Hamasaki M, Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H, Era T. 第 13 回幹細胞シンポジウム、2015/5/30、東京

Model of iPS cells derived from Niemann-Pick disease type C reveals newly effective drug

candidate HPGCD. ポスター、Soga M, Ishitsuka Y, Hamasaki M, Yoneda K, Furuya H, Matsuo M, Ihn H, Fusaki N, Nakamura K, Nakagata N, Endo F, Irie T, Era T. 第13回国際幹細胞学会 (ISSCR) 2015/6/26、ストックホルム、スウェーデン

New Type of Sendai Virus Vector Provides Transgene-Free iPS Cells Derived from Chimpanzee Blood. ポスター、Hamasaki M, Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H, Era T. 第13回国際幹細胞学会 (ISSCR)、2015/6/25、ストックホルム、スウェーデン

New Type of Sendai Virus Vector Provides Transgene-Free iPS Cells Derived from Chimpanzee Blood. ポスター、Hamasaki M, Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H, Era T. 第77回日本血液学会総会、2015/10/17、金沢

小児難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立とバンク化 口頭、江良 択実 第42回日本小児薬理学会学術集会 2015/11/15、熊本

難治性疾患由来 iPS 細胞を使った創薬研究 口頭、江良 択実 理研シンポジウム 第3回創薬ワークショップ アカデミア発創薬の到達点と課題 2016/3/4 鶴見

難治性疾患由来 iPS 細胞を使った疾患研究 口頭、江良 択実 第49回創制癌剤適応研究会 2016/3/25 会津若松

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織
(1) 研究代表者

江良 択実 (ERA Takumi)
熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号：00273706

(2) 研究分担者

特になし。

(3) 連携研究者

特になし。