

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462989

研究課題名(和文) マウス歯髄由来Sca-1陽性微小細胞の幹細胞性の検証

研究課題名(英文) Evaluation of stem cell characteristics of adult mouse small cells

研究代表者

中塚 隆介 (NAKATSUKA, Ryusuke)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90454561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨質および歯髄からVSEL様の小型細胞(微小細胞)を効率良く分離し、この微小細胞がVSELのような幹細胞性を持っているか検証した。微小細胞は骨質、歯髄共に存在が確認されたが、歯髄由来の微小細胞は得られる数が少ないことから、本研究では主に骨質由来微小細胞の検討を中心に行った。微小細胞はVSELと同様の形態等を示したが、VSELとは相違する点も多く、既報の幹細胞とは異なると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Previously, unique somatic stem cells named very small embryonic-like (VSEL) stem cells were reported. However, it is controversial whether pluripotent stem cells (PSCs) exist in adult mammals. In this study, we evaluated stem cell characteristics of VSEL-resembling small cells (SCs) isolated by highly efficient method that we developed. The present data demonstrated that the SCs isolated from bone- and dental pulp-derived nucleated cells were small and possessed a relatively large nucleus surrounded by a narrow rim of cytoplasm. However, the SCs did not show stem cell characteristics like VSELs, while SCs resemble VSELs. Cell transplantation analysis suggested that the injected SCs may proliferate, fuse and/or trans-differentiate into hepatocytes in damaged liver tissue. However, it is still uncertain to refer plasticity of SCs and it also remains unknown the existence of PSCs in postnatal adult life at the present time.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：VSEL 微小細胞

1. 研究開始当初の背景

生体組織中に、三胚葉系に分化可能な多能性組織幹細胞が存在するという報告があるが、これらの多能性組織幹細胞については、再現性に乏しいなどの問題も多く、存在を疑問視する意見も多い。未分化性を保ちながら生体内に存在している組織幹細胞のうち、三胚葉系への分化能を有する小型(10 μ m未満)の組織幹細胞(Very Small Embryonic-Like stem cell, VSEL)が Ratajczak らにより報告された(Kucia M, et al. *Leukemia*, 2006)。VSELはマウス骨髄、ヒト臍帯血などでその存在が報告されており、マウスでは血球系 Lineage 陰性、Sca-1 陽性細胞として単離可能とされている。さらに、VSELを用いた肺上皮細胞の再生(Kassmer SH, et al. *Stem Cells*, 2013)や骨の再生(Havens AM, et al. *Stem Cells Dev*, 2013)といった再生医療に関連する報告もみられ、海外ではVSELを用いた臨床研究が検討されている。それに対し、VSELの存在に異を唱える報告もなされている。Alt らはヒト臍帯血中のVSEL様の細胞が分化能を持たない異常な核型を持つ細胞であると報告しており(Danova-Alt R, et al. *PLoS One*, 2012)、Weissman らはマウス骨髄内に Ratajczak らが述べるようなVSELは存在しないと発表している(Masanori M, et al. *Stem Cell Reports*, 2013)。このように、VSELの存在、または幹細胞性については現在のところ諸説あり、一定の結論が得られていない。VSELは骨髄のみならず生体内の様々な組織中に存在するとされており、全身に分布していると考えられている。予備的検討によっても、VSEL様の小型の細胞が骨髄だけでなく骨組織にも存在することを見出した。また、歯においても歯髄幹細胞とは異なる未分化細胞が歯髄中に存在すると報告された(Atari M, et al. *J Cell Sci*, 2012)。この細胞は歯髄幹細胞よりも小型(8~12 μ m)で、三胚葉系に分化するとされる。この報告からVSEL様の細胞が歯髄にも存在する可能性が示唆された。本研究では、骨由来微小細胞の幹細胞特性を明らかにするとともに、歯髄由来微小細胞の存在についても解析し、これらの組織中の微小細胞が真に医療応用可能な幹細胞ソースとなり得るか検証する目的で研究を行った。

2. 研究の目的

Ratajczak らが見出したVSELの幹細胞性、存在に関しての論争は、*Nature* や *Cell Stem Cell* などの誌上にも取り上げられ論争となった背景もあり、その存在や分化能を検討することは非常に重要であると考えられる。硬組織由来のVSEL様の微小細胞は、組織片をCollagenaseやDispaseなどの酵素を用いることで分散した細胞から得る。分散した細胞からセルソーターを用いることで、血球系 Lineage 陰性、Sca-1 陽性のVSEL様の微小細胞を予期的に分離することができる。骨髄

中に存在するVSELはその存在量が非常に少なく、十分な解析を行うことが困難であると考えられた。より詳細な解析を行うためには効率良く微小細胞が回収出来る可能性のある組織での微小細胞の分取が求められたため、硬組織から得られる微小細胞に着目し解析を行った。既知の組織幹細胞で見られる表面抗原や遺伝子発現や分化能は、多能性組織幹細胞に否定的な報告ではほとんど見られないと報告されている。本研究では、得られた微小細胞がいわゆるVSELの様な多能性組織幹細胞であるか検証し、VSELとの関連性を明らかにする目的で、微小細胞が幹細胞としての機能を有するか解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 骨、歯髄由来微小細胞の予期的分離と形態分析

骨あるいは歯髄の組織片をCollagenaseやDispaseなどの酵素を用いることで細胞を分散すると微小細胞や間葉系間質細胞(MSC)を含む雑多な細胞がえられる。分散した細胞からフローサイトメーター(FCM)あるいはセルソーター(FACS)により、微小細胞を分離、解析した。細胞の形態についてはソーティング後細胞を顕微鏡下で観察するほか、イメージングサイトメーターを用いた解析も行った。

(2) 微小細胞の組織幹細胞マーカー発現の解析

微小細胞の細胞表面マーカー発現、核内のOct3/4、Nanog発現をFCMにより解析した。微小細胞、造血幹細胞(HSC)、MSC、ES細胞のmRNA発現をリアルタイムRT-PCRにより調べ、微小幹細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した。

(3) 微小幹細胞のin vitro培養

既報のVSELでは、共培養などin vitroでの培養条件下で多分化能が観察される。微小幹細胞での多分化能をC2C12細胞との共培養や、HSC、MSC、ES細胞培地によるin vitro培養系で評価した。

(4) 微小細胞のin vivo増殖能の評価

微小細胞のin vivoでの細胞増殖を調べるため、BrdUをマウスに短期的、あるいは長期的に投与し、微小細胞の増殖活性をFCMにより解析した。また、四塩化炭素投与による急性肝障害モデルにおいて骨、骨髄、末梢中の微小細胞の量的変動を解析した。

(5) 四塩化炭素投与による急性肝障害モデルマウスへの微小細胞の移植

VSELは障害組織に遊走し、損傷組織の再生に関与していると考えられている。本研究では、マウスに四塩化炭素を一過性に

投与することで急性肝障害を惹起したマウスに GFP マウスから分離した骨由来微小細胞を尾静脈から移植し、肝臓への生着が見られるか肝組織の免疫組織化学による解析を行った。

4. 研究成果

マウス骨髄、骨組織、歯髄における微小細胞の FCM 解析を行った。サイズマーカービーズにより小型の細胞が存在する分画より、血球系 Lineage 陰性、CD45 陰性かつ Sca-1 陽性細胞を微小細胞とした。骨髄と骨における微小細胞は、骨由来の微小細胞が骨髄に比べて多く存在していた (図 1)。歯髄において、微小細胞の存在が認められたが、その数は非常に少なかった (図 2)。

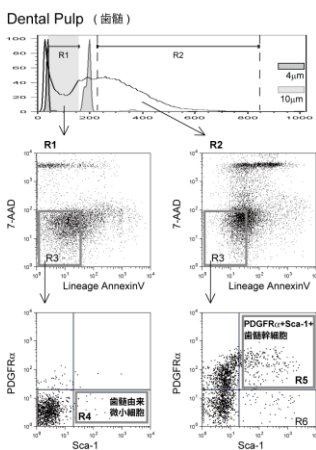
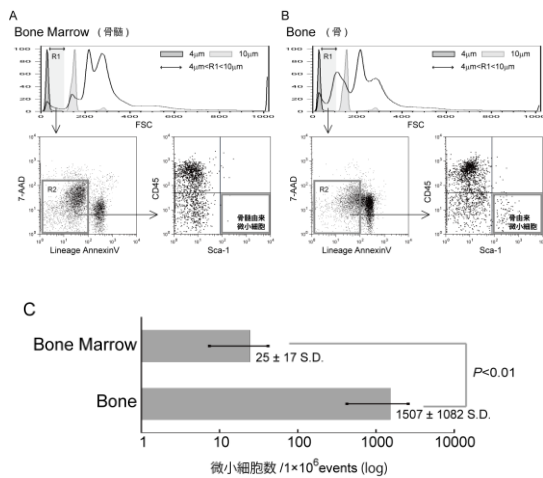


図 1 マウス骨髄、骨からの微小細胞回収法と収量の比較 マウス長管骨の骨髄 (A) 及び骨 (B) から得られた細胞を抗体染色し、FACS 解析を行った。骨由来微小細胞の頻度は、骨髄由来微小細胞に比べ 60 倍程度であった (C)。

図 2 マウス切歯歯髄由来の微小細胞と歯髄幹細胞 マウス下顎切歯歯髄から得られた細胞を抗体染色し、FACS 解析を行った。

骨由来微小細胞の Oct3/4、Nanog 発現を FCM により解析した。どちらの ES 細胞マーカーも微小細胞で発現は認められなかった (図 3)。

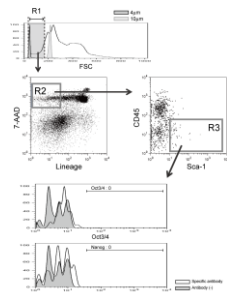


図 3 微小細胞の ES 細胞マーカー発現 骨由来微小細胞を FCM で解析した。R3 領域に存在する微小細胞の核内 Oct3/4、Nanog を解析したが、いずれも発現していなかった。

微小細胞、MSC、HSC、ES 細胞における mRNA 発現の比較。各細胞のマーカー遺伝子の発現をプロットし比較した。微小細胞は他の組織幹細胞、多能性幹細胞とも異なる遺伝子発現プロファイルを示した (図 4)。



図 4 リアルタイム PCR を用いたマウス骨由来微小細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞の遺伝子発現比較 骨由来微小細胞は他の 2 つの細胞と比べ、ユニークな遺伝子発現パターンを示している。

骨由来微小細胞と C2C12 細胞と共培養し、微小細胞の増殖、分化能を解析した。微小細胞は共培養により増殖能や分化能を示さなかった。一方、微小細胞を HSC 培養に用いられる培地で培養したところ、微小細胞由来の血球様細胞の増殖を認めた (図 5)。

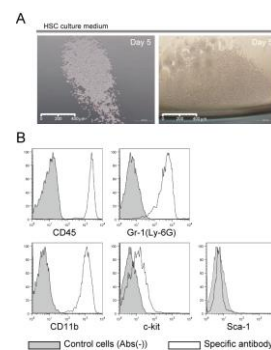


図 5 微小細胞の培養 ソーティングにより得られた微小細胞を HSC 培養系で培養した。培養後 5 日目の細胞。増殖した細胞が見られた。(A) 増殖した細胞の FCM 解析。増殖した細胞は血球マーカーを発現する一方、Sca-1 の発現が消失した。(B)

BrdU を長期投与し、骨由来微小細胞の増殖活性を評価した。微小細胞数は BrdU の投与期間に応じて増えている傾向にあり、25% 程度の微小細胞が長期にわたって継続して増殖していることが示唆された (図 6)。

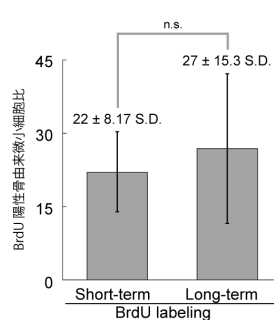


図 6 微小細胞の増殖 マウスに BrdU を短期 (Short) および長期 (Long) に投与し、骨由来微小細胞を解析した。どちらの条件下でも微小細胞はおよそ 25% 程度が増殖しており、微小細胞は生体内で増殖していることが示唆された。

急性肝障害モデルマウスにおいて、骨中の微小細胞数は、障害がピークとなる 2 日目に有意に増加しており、さらに骨髄中、末梢中でも増加する傾向が認められた。このため、微小細胞は肝障害に反応して末梢中に遊走し、障害肝に対して何らかの働きをしている可能性が示唆された (図 7)。

〔学会発表〕(計 4 件)

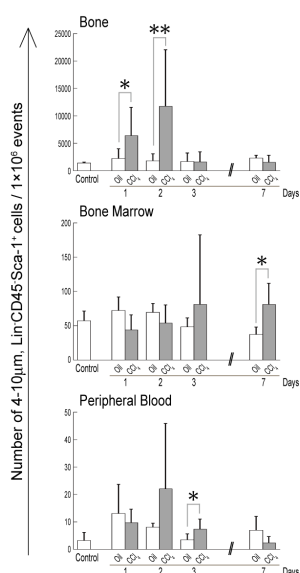


図 7 四塩化炭素投与による急性肝障害モデルにおける微小細胞の動態 腹腔内への一過性の四塩化炭素投与により、2 日程度で肝臓に障害が起こり、7 日後にはほぼ正常に回復する。骨中の微小細胞数は、障害がピークとなる 2 日に有意に増加しており、さらに骨髄中、末梢中でも増加する傾向が認められた。このため、骨由来微小細胞は肝障害に反応して末梢中に遊走し、障害肝に対して何らかの働きをしている可能性が示唆された。

急性肝障害モデルマウスに GFP マウス由来の微小細胞を移植し、3 週間後の肝臓における GFP 陽性細胞の存在を免疫組織化学により解析した。肝臓内でわずかながら GFP 陽性の細胞が見られ、障害肝臓内で細胞融合や、分化転換を起こしている可能性が示唆された(図 8)。

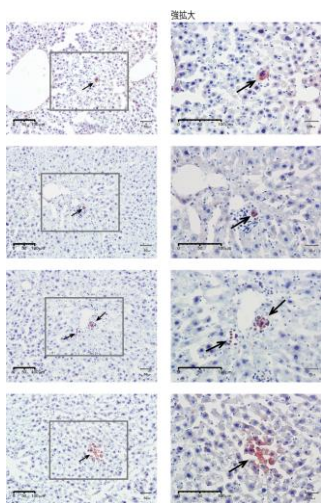


図 8 四塩化炭素投与による急性肝障害モデルへの微小細胞の移植 肝障害を起こしたマウスに GFP マウス由来の微小細胞を尾静脈より移植し、3 週間後解析した。肝臓内での GFP 陽性の細胞は多核の巨大な細胞の形態や、小型の細胞のクラスター形態、肝実質細胞の形態など様々な形態をとっていた。この結果から、急性肝障害モデルへの移植細胞はフュージョンあるいは分化転換により生着する可能性が考えられた。

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 1 件)

- ① Nakatsuka R, Iwaki R, Matsuoka Y, Sumide K, Kawamura H, Fujioka T, Sasaki Y, Uemura Y, Asano H, Kwon AH, Sonoda Y. Identification and Characterization of Lineage⁻CD45⁻Sca-1⁺ VSEL Phenotypic Cells Residing in Adult Mouse Bone Tissue. *Stem cells and development*, 25(1):27-42. 2016. 査読有

- ① Ryusuke Nakatsuka, 他、Evaluation of stem cell characteristics of adult mouse bone-derived small cells. 44th Annual Scientific Meeting of the ISEH. 2015 年 9 月 17 日、Kyoto International Conference Center
- ② 中塚隆介, 他、マウス骨質由来微小細胞の幹細胞性の検証、第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 5 月 21 日、パシフィコ横浜
- ③ 中塚隆介, 他、マウス骨髄由来微小細胞の幹細胞性の検証と VSEL との比較検討、第 24 回日本サイトメトリー学会学術集会、2014 年 6 月 28 日、関西医科大学
- ④ Ryusuke Nakatsuka, 他、Evaluation of stem cell characteristics of murine bone-derived small cells. The 12th Stem Cell Research Symposium. 2014 年 5 月 30 日～31 日、九州大学 百年講堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中塚隆介 (NAKATSUKA, Ryusuke)
関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90454561