

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21659069

研究課題名（和文）臍帯血 VSEL 細胞の分離同定と臍帯由来間葉系幹細胞との共培養による再生療法開発

研究課題名（英文）Detection of VSEL cells in umbilical cord blood and development of co-culture system with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

研究代表者：長村(井上) 登紀子 (NAGAMURA-INOUE, TOKIKO)

所属研究機関名・部局名及び職：東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：70240736

研究成果の概要（和文）：

臍帯血中に、組織幹細胞のソースとなる ES 様細胞（VSEL）があるのではとの推察から、臍帯血中の ES 様細胞マーカーの検討を行った。確かに SSEA3 陽性の RBC 大の N/C 比の高い芽球様小細胞を認めたが、数が非常に少なく更なる解析には至らなかった。一方、共培養のフィーダーと考えていた臍帯由来間葉系幹細胞に、SSEA3/4 陽性細胞や遺伝子レベルで ES 特異的なマーカーの発現を認め、単独にても再生医療のソースとして期待された。

研究成果の概要（英文）：This study is aimed to find the source cells for regenerative medicine, such as Very Small ES like (VSEL) cells in umbilical cord blood (UCB). We found the SSEA3⁺ very small N/C high-ratio cells, but too low incidence to do further analysis. On the other hand, in umbilical cord (UC)-derived mesenchymal stem cells (MSCs), we found the SSEA3/4⁺ cells with ES-specific gene markers. Not only UCB, but also UC-MSCs may be good candidate source for the regenerative medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：(1) 再生医療 (2) 臍帯 (3) 組織幹細胞 (4) ES 細胞

(5) CD34 陽性細胞 (6) 間葉系幹細胞 (7) VSEL (8) 臍帯血

1. 研究開始当初の背景

再生医療において間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells:MSCs) はその代表的組織ソースとして注目されている。臍帯血は、2000年以降急速な勢いで実施され、血液疾患のみならず、代謝性疾患や神経系の疾患にも応用され、効果を認めている。また、臍帯血からも同様に MSCs の存在が確認されているが幹細胞の樹立頻度は低いことが報告されている。一方、近年、臍帯血中に very small embryonic-like (VSEL) 細胞の存在が報告された (Leukemia, 21:297, 2007)。VSEL 細胞は血液幹細胞や赤血球よりも小さく血小板よりも大きい 3-5 μ m 程度の細胞であり、CXCR4⁺AC133⁺ CD34⁺Lin⁻CD45⁻の表面形質を有し、OCT4、Nanog、SSEA-4 等の ES 細胞に認められる分子が陽性と報告されている。我々は、非血液疾患にても臍帯血移植が有効な理由は、こうした VSEL 細胞が、臍帯血中に存在し、組織幹細胞として機能するのではないかと仮定から、臍帯血中の VSEL 細胞の検出、分離を計画した。これまでの報告から、VSEL 細胞は通常の単核球分離では得られない分画であり、分離方法は溶血後の FACS sorting 以外は未確立であり、増幅培養の系も報告はない。

一方、我々はこれまで、臍帯を構成する動・静脈および周囲を取り囲む Wharton's jelly をソースとする MSCs の分離方法を確立し、その増殖能や軟骨・骨・脂肪細胞への分化能ならびに免疫抑制能について報告してきた。また臍帯 MSCs について、単独で組織幹細胞ソースとして機能的と期待できることから臍帯 MSCs 中の同様の ES 様性質をもった細胞について検討することとした。

さらに、元来 MSCs には造血細胞等の支持能が報告されており、この同一ドナーの臍帯由来 MSCs は VSEL 細胞との共培養により VSEL

細胞の維持増幅を支持する可能性がある。

臍帯血、臍帯はどちらも提供者のリスクがなく、倫理的なハードルが低く入手が容易なことからヒト組織幹細胞研究における優れたソースとなりうるため今回この研究を推進するに至った。

2. 研究の目的

臍帯血から Ratajczak らの方法 (溶血、FACS ソーティング) を参考に VSEL 細胞と考えられる細胞を、ES 特異的表面マーカーや遺伝子発現等により同定し、この分画の存在を証明することを、本研究の目的とする。さらに分離に成功した場合には、臍帯由来 MSCs との共培養を行い、臍帯由来 MSCs の増殖支持能についても検討する。

臍帯の3組織、すなわち動・静脈および周囲を取り囲む Wharton's jelly からの MSCs の樹立方法は既に確立している。今回我々は酵素処理等にて臍帯を分離し、臍帯血と同様に VSEL 細胞または同様の ES 様細胞の存在の有無を検討する。

3. 研究の方法

(1) 臍帯血由来、ES 様細胞の検出

臍帯血および臍帯は臍帯血を直接溶血または HES 法やフィコール法にて赤血球部分を除き、さらに CD4⁺細胞を除いてフローサイトメトリーにて SSEA3/CD45/Oct4/ SSEA4 染色を行った。一部 FACS ARIA にてソーティングし、形態を観察した。

(2) 臍帯由来 MSCs の分離と ES 様細胞の検出

臍帯は臍帯血採取後、清潔に採取され、ワルトンジェリーと動脈、静脈を剥離し、各々5mm 以下に細切して explant 法または酵素処理の後、組織培養プレートにて培養を開始。

Confluent になった段階でトリプシン処理後、

細胞を回収、一旦凍結を行った。

SSEA4+CD73+細胞のソーティング等を行い、その長期増殖能、表現型の違いをFCMおよびRT-PCRにて比較した。

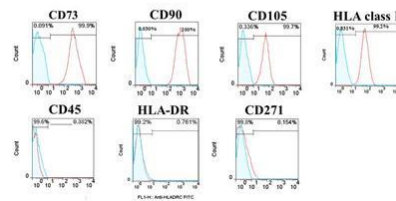
4. 研究成果

1) 臍帯血中のVSEL細胞：臍帯血を全血または単核球に分離後、さらにCD4⁺リンパ球を除き、SSEA-3⁺またはSSEA-4⁺およびかつCD45⁻細胞を指標に検討した。全血溶血では、バックグラウンドの細胞やRBCの残骸が多く、検出が困難であった。なお、これまでのRatajczakらの報告からVSEL細胞は、CD34⁺細胞中存在することであったが、CD45⁻細胞中ではCD34⁺SSEA3⁺double positive細胞は認めず、CD45^{du11}分画にCD34⁺(=造血幹細胞)、SSEA3⁺細胞を認めた。しかし、これらはお互いに各別集団であった。確かにSSEA3⁺CD45^{du11}細胞はSSC/FSC展開で、単核球分画よりもRBC大の小細胞集団に多く存在し、ソーティングした結果、円形の比較的N/C比の高い芽球細胞が認められた。なお、SSEA3⁺CD45⁻細胞は単核球分画よりは小細胞集団の方が多い傾向(P=0.05)にあったが、0.003%程度しかなく、OP9細胞または同一の臍帯由来MSCs上で共培養系では、それ以上の増殖は認めず、遺伝子発現の検討までには至らなかった。

(2) 臍帯由来MSCsとES様細胞

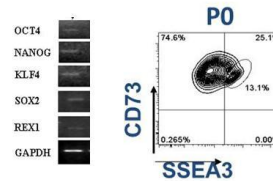
①臍帯由来MSCはex plant法にて培養して回収した。臍帯由来MSCも骨髄由来MSC同様にCD73、CD105、CD90およびHLA-Class I陽性、HLAclass II、CD45陰性であった(図1)。

図1. 臍帯由来MSCの表現型



またP0細胞中にSSEA4⁺CD73⁺細胞は平均±SD 41.7±23.8%、SSEA4⁺CD73⁻1.4±0.5%を認め(n=5)、CD73⁺SSEA4⁺率は、6週まで比較的長期に存在しその後減少した。またRT-PCRの結果では、SSEA4の発現いかんにかかわらず、Oct4/Nanog/SOX2/Klf4//REX1の発現を長期に認めた(図2)。一方、SSEA3⁺CD73⁺細胞はSSEA4⁺細胞中に存在し、その逆にSSEA4⁻細胞中にはSSEA3⁺細胞は殆ど認めなかった。またSSEA3⁺CD73⁺細胞はP0にて全体の8.48±7.66%と高く、その後急速に減少した。

図2. 臍帯由来MSCにおけるES様細胞の特徴



②SSEA4⁺細胞とSSEA4⁻細胞の比較

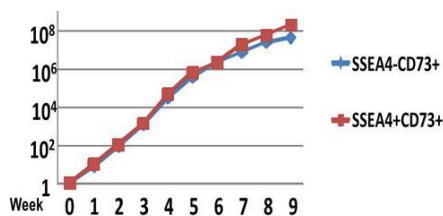
我々は臍帯由来MSCsがSSEA4⁺と⁻細胞に大きく2分されること、骨髄由来MSCsではSSEA4⁺細胞が増殖および分化能において優位であるとの報告(Blood, 2007, 109, 1743-1751)から、SSEA4の発現による増殖能および分化能を検討した。

この分画をソーティングし、長期培養を行った。骨髄での報告と異なり、臍帯由来MSC SSEA4⁺とSSEA4⁻間では増殖率に差は認めなかった(図3)。また骨・脂肪細胞への分化も特に差は認めなかった。但し、骨への分化能は、非常に悪く、BMP2存在下でようやく認める程度であった。この理由として、Hsieh Yらは臍帯由来MSCと骨髄由来MSCsとの網

羅的遺伝子発現解析の結果、臍帯由来 MSCs は骨髄由来 MSCs より、ES 細胞に近い遺伝発現があり、骨髄由来 MSC は既にある程度骨分化マーカーの発現があるとのことであった

(STEM CELLS AND DEVELOPMENT, 19, 1895, 2010)。なお、長期培養細胞 (day 91) では、脂肪、骨細胞への分化が初期培養細胞 (P1) に比べて劣っており、長期培養細胞においても $CD73^+CD105^+ CD90^+$ を示すが、分化能の低下が示唆された。現在、SSEA4+/-における肝細胞への分化能の比較検討を行っている。

図 3. SSEA4+/-における増殖 (n=3)



これまでの検討から、臍帯血中にも、非常に頻度は少ないながら、SSEA3+CD45-が存在した。一方で、共培養のためのフィーダー細胞の利用を考えていた臍帯由来 MSCs から ES 様細胞マーカーを有す細胞 $SSEA3/4^+CD73^+/CD105^+$ がより多く容易に認められることから、これらの細胞を用いた再生療法への応用が期待された。近年報告された MUSE 細胞 ($SSEA3^+CD105^+$) に似ていることから性状を比較しながら、多分化能、特に肝細胞への分化についての検討をしているところである。

臍帯血は採取量により、臨床用のプロセスの可否が左右されるが、臍帯は大小径あるも 100%採取可能であり、かつ MSCs への誘導増幅も確実にできる点が利点である。特に、未分化マーカーを多く発現している。造血幹細胞や免疫系の細胞が豊富な臍帯血と再生医療を目指す臍帯由来 MSCs とを、目的に

よって使い分け、または同時移植によりさらに有効な細胞療法が開発されることが期待される。

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 5 件)

1. Miki Yuzawa, Nagamura-Inoue T, Ikuo Ishige, Kazuo Ogami, Tomoki Tamura, Atsuko Takahashi, Hideki Kodo, Satoru Yamaguchi, and Arinobu Tojo, Time from cord blood collection to processing and temperature influence the quality of mononuclear cell products isolated using a density-gradient protocol., The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy. (日本輸血・細胞治療学会誌), 57, 139-145, 2011.

<http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Journal/BackNumber.aspx>

2. Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J, Nagatoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato S; for the Japan Cord Blood Bank Network. Cord Blood Transplantation from Unrelated Donors for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan: The Impact of Methotrexate on Clinical Outcomes. Biol Blood Marrow Transplant. 17, 1814-21 2011. doi:10.1016/j.bbmt.2011.05.013

3. Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S; Japanese Cord Blood Bank Network. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. Br J Haematol. 154, 363-72, 2011. doi: 10.1111/j
4. Atsuta Y., Suzuki R., Nagamura-Inoue T., Taniguchi S., Takahashi S., Kai S., Sakamaki H., Kouzai Y., Kasai M., Fukuda T., Azuma H., Takanashi M., Okamoto S., Tsuchida M., Kawa K., Morishima Y., Kodera Y., and Kato S., for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network; Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplant compared with unrelated bone marrow transplant in adult patients with acute leukemia. Blood, 113,1631-8, 2009. DOI 10.1182/blood-2008-03-147041.
5. Ishige I., Nagamura-Inoue T., Honda J. M., Harnprasopwat R., Kido M., Sugimoto M., Nakauchi H, Tojo A. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord, Int. J of Hematology, 90,261-9, 2009. DOI 10.1007/s12185-009-0377-3

[学会発表] (計2件)

1. 長村 (井上) 登紀子, 小林誠一郎, 尾上和夫, 東條有伸、臍帯血からの制御性T細胞の誘導増幅による免疫抑療法の開発 第73回日本血液学会総会 OS-3-36, 2011年10月16日
2. 何海萍、長村 (井上) 登紀子、田村友樹、湯沢美紀、東條有伸、未分化マーカーSSEA4を発現する臍帯由来MSCsの解析 Characterization of human umbilical cord-derived primitive mesenchymal stem cells expressing SSEA4, 第73回日本血液学会総会, 京都, 2011年10月14日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長村 (井上) 登紀子 (Nagamura-Inoue, Tokiko)

東京大学・医科学研究所 講師

研究者番号: 70240736

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石下 郁夫 (Ishige, Ikuo)

東京大学・医科学研究所 特任研究員

研究者番号: 30396957

小林 誠一郎 (Kobayashi, Seiichiro)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 70376622

長村 文孝 (Nagamura, Fumitaka)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 90282491

大井 淳 (Ooi, Jun)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 20302606