

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 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659076

研究課題名（和文） 由来臓器ごとのヒト間葉系幹細胞プロファイリングと培養条件最適化と標準化

研究課題名（英文） Optimization and standardization of cultivation for human mesenchymal stem cells derived from differential tissues

研究代表者 肥田直子 (Hida Naoko)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：70360112

研究成果の概要（和文）：

ヒト間葉系幹細胞は再生医療の体性幹細胞リソースとして注目されている。間葉系幹細胞はあらゆる臓器に存在し、由来臓器ごとに特性が全く異なる。本研究では、由来臓器ごとの間葉系幹細胞の特性を同定し、再生医療の目的（主に心臓）に合わせた最適の由来臓器を同定を目的とした。本研究によって、ヒト間葉系幹細胞の細胞培養方法の最適化と標準化がおこなわれる。それにより、再生医療における最大の問題である、臓器再生効率の改善と、世界中の研究者がデータ共有を通して、研究の促進を促す事が出来る。

研究成果の概要（英文）：

It has been noted that human mesenchymal stem cells are one of the most suitable cell sources. Mesenchymal stem cells exist in many tissues and differ in their property. In this study, we optimized the cultivation system for clinical purpose. We will improve efficacies of the cell products through information sharing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	0	600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	600,000	3,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ES細胞、遺伝子解析、再生医療、細胞移植

1. 研究開始当初の背景

再生医療の実現は人類の夢である。近年人工多能性幹細胞(iPS細胞)が注目されているが、臨床応用させるためには解決すべき点が多い。我々は今まで、再生医療の細胞リソースとして、臨床での治療実績のあるヒト間葉系幹細胞の研究を

行って来た(Takeda, J Gene Med, 2004/ Okamoto, Exp Cell Res, 2007/ Nishiyama, Stem Cells, 2007/ Hida, Stem Cells, 2008/ Tsuji, Circulation, 2008)。間葉系幹細胞はあらゆる臓器に存在し、他臓器への分化能を有する体性幹細胞である。また免疫学的反応を抑制するとの報告もあり(Rasmusson, Exp Cell Res, 2006)、免疫学者

にも注目されている。高い接着能と分裂能をもち、表面マーカー CD29/CD58/CD105 等の発現で特定され、細胞形態は由来臓器に関わらず不変である。これまでの研究で、分化能・増殖能に焦点を当てると、由来臓器ごとに全く別種の細胞である事は判明し始めた。私は、これらの研究結果を受け、「再生対象臓器に合わせた、最適な間葉系幹細胞の由来臓器が存在するはず」と考え、さらに探査・研究をすすめてきた。また、培養方法が間葉系幹細胞の分化能を全く変えてしまう。培養方法について詳細に議論・記述される事がないことから、世界中の研究者間での細胞の標準化がなされておらず、細胞の規格設定に混乱が生じているという現状があった。

2. 研究の目的

培養方法・細胞株樹立方法・臓器分化能を一貫して評価し、分化能を直接指標として細胞培養の最適化を行う。従来までの体性幹細胞研究は、細胞株樹立と分裂能に関する研究に焦点が当てられるものか、臓器への分化能に関する研究に焦点が当てられる研究が多く、『培養方法・細胞株樹立方法・臓器分化能を一貫して評価し、分化能を直接指標として細胞培養の最適化を行う研究』は皆無であった。また分化能の評価に、細胞機能評価に重点をおいている点も他の研究に類を見ない。本研究によって、ヒト間葉系幹細胞の細胞培養方法の最適化と標準化がおこなわれる。それにより、再生医療における最大の問題である、臓器再生効率の改善と、世界中の研究者がデータ共有を通して、研究の促進を促す。

3. 研究の方法

各種臓器由来のヒト間葉系幹細胞の細胞樹立・培養方法の確立を行い、由来臓器ごとの特性を細胞分裂能・生物学的特性・臓器分化能（主に心筋分化）を効果判定として比較評価した。さらに、細胞樹立方法と培養方法の最適化を、臓器分化能・細胞分裂能を指標に行った。現在未調査となっている臓器由来の間葉系幹細胞の樹立及び培養を試みた。

4. 研究成果

①ヒト間葉系幹細胞樹立法の最適化

臓器から間葉系幹細胞の細胞樹立は重要である。細胞の性質を決定するのは培養条件であり、樹立時に問題になるのは回収率である。細胞樹立方法は、対象とする臓器によって大きく異なる。骨髄や月経血の様な液体であれば、そのまま、培養皿にゼラチン等のコートを行わず散布培養すれば、接着性の高い間葉系幹細胞のみが分裂増殖してゆき、初代培養が作られた。しかしながら大量の血球や脂肪滴が混入していると、第一世代の回収細胞数が格段に減少した。そのため Filter カラムを用いた血球系細胞の除去や、遠心分離による脂肪滴の除去で第一世代の細胞数の上昇と、増殖スピードが改善する事を明らかにした。

一方で、固形臓器の場合（羊膜・胎盤・脂肪等）、臓器を 5mm 程度の大きさに切断し、そのまま培養液に浸けておく事で、細胞を回収する方法(Explant 法)と酵素反応によって単離後、液体臓器と同様の方法で（酵素法）、接着性の高い細胞のみを回収した。回収方法としては、酵素法の方が、第一世代回収細胞数が増加した。臓器分化能を評価し、最適な細胞樹立方法の選定を行った。

②ヒト間葉系幹細胞培養法の最適化

細胞の培養条件は重要である。当研究室では培養液中に 10%の血清を標準的に投与しているが、例えば血清を牛血清とした場合と、健常ヒト血清とした場合で、細胞分裂回数に大きな変化はないものに、心筋誘導効率は大きく異なる事が判明してきた。このように臓器分化能は、細胞形態や分裂能に大きな影響を及ぼさなくとも、臓器分化能を大きく変動させる可能性がある。私はこの他に、培養温度(33 度-37 度-39 度)/酸素濃度(20%-2%)/培養組成（心筋代謝に必要な脂肪酸代謝を増強）/無血清培地(Ikegami, *Artificial Organ*, 2009)/ PDGF-EGF-FGF-IGF 等の細胞増殖剤投与下で培養をおこない、細胞分裂能と・臓器分化能を評価した。

③ヒト間葉系幹細胞の評価

分裂能:樹立直後から細胞が何回分裂するかを評価した。細胞分裂数は培養条件によって劇的に変化した。現在我々が得ている標準的な細胞分裂回数は、骨髄 10 回・羊膜 23 回・臍帯血 35 回・胎盤 10 回・月経

血 30 回程度であった。

形態:主に位相差顕微鏡で観察した細胞の形態を評価した

細胞表面マーカー: 由来臓器事に細胞表面抗原は微妙に異なっている。FACS を行い定量的に比較評価した。

マイクロアレイ:マイクロアレイを用いた網羅的データ比較を行った。細胞培養法を変更した際に、臓器誘導効率が改善すれば、その培養法で変動した遺伝子が臓器誘導に重要な働きを示している事となる。これらを、独自に作製したインターフェールキットを用いて、より直感的・巨視的に観察しやすくして検証した。

生物学的特性:細胞内シグナル伝達系や心筋特異的遺伝子の発現量を定量 RT-PCR を用いて比較観察する臓器分化能:誘導刺激後の分化効率について検討した。主に心筋への誘導効率を観察した。心筋誘導にはマウス培養心筋細胞との共培養を行った。共培養はマウス心筋細胞との細胞融合と心筋への分化を区別するため、マウス細胞とヒト細胞を 50 μ m の高密度アテロコラーゲン膜(分子量 5,000 以上を通過しない)で区別して心筋誘導を観察する事で、細胞融合を否定した。あらかじめヒト細胞を EGFP でマーキングした後に共培養を行い免疫染色にて EGFP 陽性細胞中の心筋 Troponin-I陽性細胞数を心筋誘導効率と定義した。

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)

Numasawa Y, Kimura T, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic trans differentiation and improved cardiac function via angiogenesis. Stem Cells. 29(9):1405-14, 2011.

Shinmura D, Togashi I, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K, Tsukada Y, Ogawa S, Umezawa A. Pretreatment of human mesenchymal stem cells with pioglitazone improved efficiency of cardiomyogenic trans differentiation and cardiac function. Stem Cells. 29(2):357-66, 2011.

[雑誌論文] (計 2 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

肥田直子 (Hida Naoko)
独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・研究員
研究者番号: 70360112

(2) 研究分担者

梅澤明弘 (Umezawa Akihiro)
独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・部長
(再生医療センター長)
研究者番号: 70213486

豊田雅士 (Toyoda Masashi)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・研究所老年病研究チーム・血管医学研究・研究副部長
研究者番号: 50392486