

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06853

研究課題名(和文)電気物性を指標とした組織幹細胞の単一解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of single cell analysis technology of tissue stem cells using electrical property

研究代表者

馬淵 洋 (MABUCHI, Yo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50424172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生命システムの根幹である細胞は、組織・臓器によって固有の特徴を示しており、組織幹細胞は組織の恒常性を維持するため、複雑な生命システムに基づいて幹細胞性を維持していると考えられる。本研究では、蛍光色素などの標識なしで細胞の性質を分析する技術を開発することを目的とし、生体・細胞・タンパク質などが本来持つ物質としての電気的性質「電気物性」を指標にして、幹細胞としての性質を規定する技術の確立を行った。電気物性解析の結果、組織幹細胞特異的な電気物性が存在することが示唆された。また、幹細胞性に伴い、電気物性も変化することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

物質の電気的性質は、誘電率[Cm] (電気のためやすさ)と導電率[K] (電気の流れやすさ)、細胞径[d]という3つのパラメーターで表される。一般的な細胞の細胞膜はほぼ絶縁体とみなすことができ、電極を通して測定される電気物性は、細胞の形状・性質に依存する。特定の細胞集団を蛍光色素などの標識なしで同定が可能であれば、細胞種・生物種を超えた普遍的な指標としてユニバーサルに利用できると考えられる。この技術を応用し、幹細胞性やがん化などの細胞異常をラベルフリーでモニターすることが可能となれば、研究ならびに医療現場において、細胞診断や幹細胞治療に大きな貢献をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a technology to analyze cell properties without labeling such as fluorescent dyes. We established the technology to define the stem cell properties using the electrical properties as the indicator. Electrical property analysis suggested that tissue stem cells have specific electrical properties. Furthermore, the electrical properties were correlated with stemness. This technology is considered to contribute a diagnosis and stem cell therapy in research and medical field.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 細胞分離 細胞マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

生命システムの根幹である細胞は、組織・臓器によって固有の特徴を示しており、組織幹細胞は組織の恒常性を維持するため、複雑な生命システムに基づいて幹細胞性を維持していると考えられる。細胞の性質を解析するため、様々な組織から細胞が分離され、その性状解析がなされている。細胞分離技術の主力として利用されているフローサイトメーターは、細胞表面抗原を指標として、高い精度と特異性をもって細胞の分離を行うことができる。申請者はこれまでに、マウス及びヒト間葉系幹細胞に関して、フローサイトメーターを用いた分離・同定技術の開発を精力的に行ってきた（Stem Cell Rep. 2013: Nature Protocols. 2012: I&R 2009: JEM 2009）。それらの研究を通して、幹細胞の性質を反映する「幹細胞マーカー」が必ずしも一つとは限らず、組織ごとまたは研究者ごとに、統一した解析方法が確立されにくいという問題点が得られた。細胞の表現型を明らかにするためには、遺伝子やタンパク質の発現解析が一般的であるが、それらの情報のみで生命システムを解明するには莫大な時間と費用がかかり、統合的な幹細胞システムの解明に至らないのが現状である。そこで、既存の概念を超えた新しい細胞解析技術が必要であると申請者は考えた。本研究では、細胞が本来持つ「電気物性」に着目して、それを指標に細胞を区別する手法を開発する。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光色素などの標識なしで細胞の性質を分析する技術を開発することを目的とする。近年、再生医療分野を支える幹細胞を中心とした研究が飛躍的に進んでいるが、幹細胞を同定するために細胞表面マーカーや遺伝子発現などのさまざまな要素が絡んでおり、多くの時間や費用が費やされている。そこで、生体・細胞・タンパク質などが本来持つ物質としての電気的性質「電気物性」を指標にして、「幹細胞としての性質を規定する技術」の確立を行う。またこの技術を応用し、がん化などの細胞異常をラベルフリーで調べることが可能となれば、研究ならびに医療現場において、細胞診断や幹細胞治療に大きな貢献をもたらすと考えられる。

3. 研究の方法

物質の電気的性質は、誘電率[Cm]（電気のためやすさ）と導電率[K]（電気の流れやすさ）、細胞径[d]という3つのパラメーターで表される（図1）。一般的な細胞の細胞膜はほぼ絶縁体とみなすことができ、電極を通して測定される電気物性は、細胞の形状・性質に依存する（Asami, 1996）。つまり、誘電率と導電率を測定することで、細胞構成物質の性質を調べることが可能となる。

幹細胞性を電気物性という新たな指標で区別出来るかどうかを調べるため、フローサイトメーターで分離したヒト間葉系幹細胞の電気物性を調べる。また、造血幹細胞やその他の組織幹細胞においても解析を行う（ヒト、マウス）。培養前の間葉系幹細胞と培養後の分化間葉系幹細胞の電気物性の違いを調べることで、幹細胞性と電気物性の値の相関を解析する。

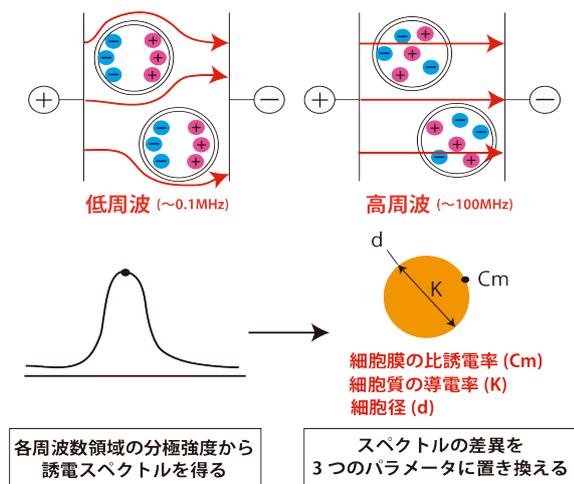


図1: 電気物性の解析原理

4. 研究成果

特定の細胞集団を蛍光色素などの標識なしで同定が可能であれば、細胞種・生物種を超えた普遍的な指標としてユニバーサルに利用できると考えられる。本研究では、生体、細胞、タンパク質などが本来持つ物質としての電気的性質（電気物性）を指標にして、幹細胞としての性質を規定する技術の確立を行う。

(1) 組織幹細胞特異的な電気物性の同定

幹細胞性を電気物性という新たな指標で区別出来るかどうかを調べるため、フローサイトメーターを用いて分離した間葉系幹細胞の電気物性を調べることにした。まず、ヒト骨髄より分離した間葉系幹細胞（LNGFR+THY-1+細胞）を、PBS に懸濁し、誘電サイトメーターにて電気物性を解析した。対照群として、血球細胞（CD45+ 細胞）や赤血球細胞（Glycophorin A+ 細胞）、間葉系前駆細胞（LNGFR+THY-1-細胞）も同時に分離・解析を行った。得られた測定値から、細胞膜の比誘電率(Cm)・細胞質導電率(K)・細胞径(d)を算出(逆解析)し、情報をプロットすることで電気物性結果を得ることができた。

得られた結果によると、ヒト間葉系幹細胞については、電気物性を指標に幹細胞と分化細胞をおおまかに区別できる事が可能となった(図2)。特に、比誘電率において大きな違いがあることが分かった。解析における必要細胞数としては 1×10^5 cells/45ul 量あれば十分に解析可能であることがわかった。

同様に、マウスの間葉系幹細胞 (Sca-1+PDGFRa+ 細胞) についても実験を行い、幹細胞特異的な電気物性が種を超えた共通の性状であるかを解析した。マウス間葉系幹細胞については、血球細胞・神経細胞・内皮細胞とは異なる電気物性を持っていることが確認された。以上の実験により、組織幹細胞特異的な電気物性が存在することが示唆された。

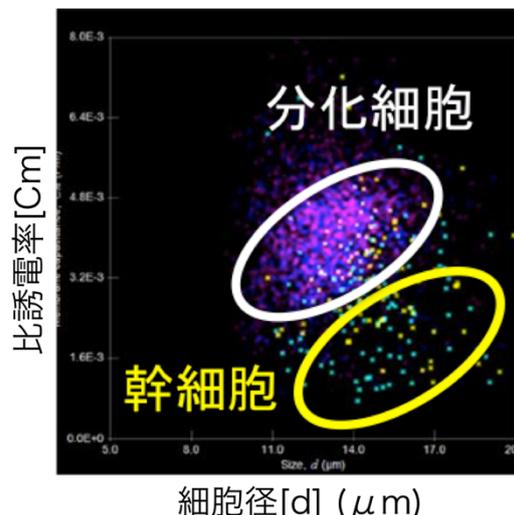


図2：骨髄間葉系幹細胞の電気物性測定

ヒト間葉系幹細胞・マウス間葉系幹細胞について、誘電サイトメーターを用いた実験を進め、電気物性を指標に幹細胞と分化細胞を区別できる事を確認した。(Y軸：比誘電率、X軸：細胞径)

(2) In vitro 培養後の電気物性変化

組織幹細胞に特異的な電気物性の解析結果を踏まえ、培養後に電気物性も変化するかどうかの解析を行うことにした。間葉系幹細胞を in vitro で培養することで、幹細胞は徐々に分化することが知られており、培養前後の間葉系幹細胞の電気物性を調べることで、幹細胞性と電気物性の関係性を調べることが可能になる。培養前後の解析の結果、培養により電気物性は大きく異なることがわかった。特に、培養することで細胞径(d)の値が大きくなり、その結果細胞膜の比誘電率(Cm)や細胞質の導電率(K)に影響を与えるのではないかと考えられた。しかし、細胞径が異なることや培養による接着性が高くなってしまふことから、最適な解析チップの再検討が必要であると考えられた。その他、造血幹細胞や歯髄間葉系間幹細胞、iPS細胞由来の間葉系幹細胞を用いた解析に向け、細胞分離法や誘導技術の確立を行った。ヒト歯髄間葉系間幹細胞の分離及びヒト iPS 細胞の間葉系への誘導法について学術論文に報告した(業績参照)。

(3) 幹細胞性に伴った電気物性変化の解析

組織幹細胞に特異的な電気物性を解析する上で、幹細胞能力が変化した場合に電気物性も変化するかどうかの解析を行う。間葉系幹細胞を in vitro で培養することで、幹細胞は徐々に分化することが知られているが、培養による細胞変化の影響を避けるため、培養を介さずに解析する必要がある。そこで神経堤細胞由来の細胞集団をマーキングできる Sox10 レポーターマウスを用いた電気物性解析を進めた(図3・左)。幹細胞能力が高い細胞集団 (Sox10-low 細胞) と分化したシュワン細胞集団 (Sox10-high 細胞) について venus の蛍光強度により分けることが可能である。これらの2集団を解析した結果、2群間で導電率(K)の値に違いがあり、分化度合いに伴い導電率が高くなるというデータを得た(図3・右)。以上の結果から、幹細胞性に伴い、電気物性も変化する可能性があることが示唆された。Sox10 レポーターマウスを用いた研究成果は、第38回炎症再生医学会にて「発表優秀演題賞」(2017年7月)、日本サイトメトリー学会では優秀ポスター賞(2018年5月)を受賞し表彰された。

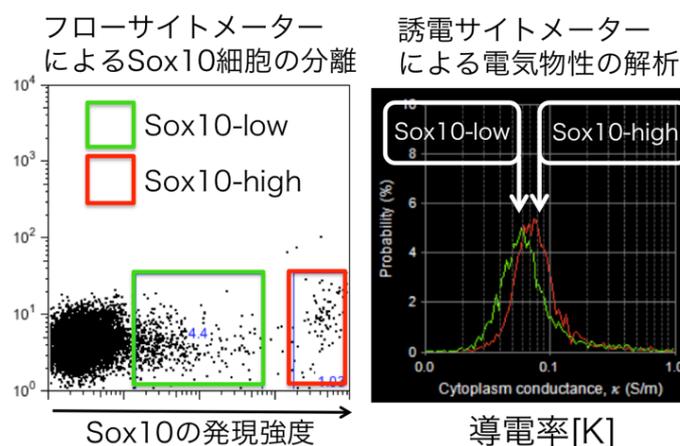


図3：導電率を指標とした物性評価

謝辞：誘電スペクトロサイトメーターの測定・解析については、ソニー株式会社 メディカル事業ユニット R&D の勝本様、鶴巻様、高橋様のご指導を賜りました。深く感謝を申し上げます。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 25 件)

- 1, Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y, Mabuchi Y, Hata K, Nakamura S, Yasuhara R, Irie T, Fukada T, Sakai T, Inoue T, Nishimura R, Ohara O, Saito I, Ohba S, Tsuji T, and Mishima K. Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. **Nat Commun**. 2018 Oct 11;9(1):4216. doi: 10.1038/s41467-018-06469-7.
- 2, Yamamoto K, Tanimura K, Watanabe M, Sano H, Uwamori H, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Chung S, Kamm R, Tanishita K, Sudo R. Construction of continuous capillary networks stabilized by pericyte-like perivascular cells. **Tissue Eng Part A**. 2018 Sep 20.
- 3, Mizuno M, Katano H, Mabuchi Y, Ogata Y, Ichinose S, Fujii S, Otabe K, Komori K, Ozeki N, Koga H, Tsuji K, Akazawa C, Muneta T, Sekiya I. Specific markers and properties of synovial mesenchymal stem cells in the surface, stromal, and perivascular regions. **Stem Cell Res Ther**. 2018 May 2;9(1):123.
- 4, Hashimoto K, Ochi H, Sunamura S, Kosaka N, Mabuchi Y, Fukuda T, Yao K, Kanda H, Ae K, Okawa A, Akazawa C, Ochiya T, Futakuchi M, Takeda S, Sato S. Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2018 Feb 27;115(9):2204-2209. doi: 10.1073/pnas.1717363115.
- 5, Ogata Y, Mabuchi Y, Shinoda K, Horiike Y, Mizuno M, Otabe K, Suto EG, Suzuki N, Sekiya I, Akazawa C. Anterior cruciate ligament-derived mesenchymal stromal cells have a propensity to differentiate into the ligament lineage **Regenerative Therapy**. 2018 vol.8 20-28
- 6, Ishii K, Sakurai H, Suzuki N, Mabuchi Y, Sekiya I, Sekiguchi K, Akazawa C. Recapitulation of Extracellular LAMININ Environment Maintains Stemness of Satellite Cells In Vitro. **Stem Cell Reports**. 2018 Feb 13;10(2):568-582. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.12.013.
- 7, Suzuki N, Sekimoto K, Hayashi C, Mabuchi Y, Nakamura T, Akazawa C. Differentiation of Oligodendrocyte Precursor Cells from Sox10-Venus Mice to Oligodendrocytes and Astrocytes. **Sci Rep**. 2017 Oct 26;7(1):14133. doi: 10.1038/s41598-017-14207-0.
- 8, Suto EG*, Mabuchi Y*, Suzuki N, Suzuki K, Ogata Y, Taguchi M, Muneta T, Sekiya I & Akazawa C. Prospectively isolated mesenchymal stem/stromal cells are enriched in the CD73 population and exhibit efficacy after transplantation. **Sci Rep**. 2017 Jul 6;7(1):4838.
- 9, Ishii K, Suzuki N, Mabuchi Y, Sekiya I, Akazawa C. Technical advantage of recombinant collagenase for isolation of muscle stem cells. **Regenerative Therapy**. 2017 vol.7 1-7; 95(2):206-14
- 10, Yasui T, Mabuchi Y, Morikawa S, Onizawa K, Akazawa C, Nakagawa T, Okano H and Matsuzaki Y. Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. **Inflammation and Regeneration**. 2017 Apr;;37:8
- 11, Veraitch O, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Sasaki T, Okuno H, Tsukashima A, Amagai M, Okano H, Ohyama M. Induction of hair follicle dermal papilla cell properties in human induced pluripotent stem cell-derived multipotent LNGFR(+)THY-1(+) mesenchymal cells. **Sci Rep**. 2017 Feb 21;7:42777.
- 12, Sato Y*, Mabuchi Y*, Miyamoto K, Araki D, Niibe K, Houlihan DD, Morikawa S, Taneaki N, Nakajima T, Akazawa C, Hori S, Okano H, and Matsuzaki Y. Notch2 signaling regulates the proliferation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells via c-Myc expression. **Plos One**. 2016 Nov 17;11(11):e0165946
(*These authors contributed equally to this work.)
- 13, Hisamatsu D, Ohno-Oishi M, Nakamura S, Mabuchi Y, Naka-Kaneda H. Growth differentiation factor 6 derived from mesenchymal stem/stromal cells reduces age-related functional deterioration in multiple tissues. **Aging (Albany NY)**. 2016 Jun;8(6):1259-75. doi: 10.18632/aging.100982.

14, Ogawa Y, Morikawa S, Okano H, Mabuchi Y, Suzuki S, Yaguchi T, Sato Y, Mukai S, Yaguchi S, Inaba T, Okamoto S, Kawakami Y, Tsubota K, Matsuzaki Y, Shimmura S. MHC-compatible bone marrow stromal/stem cells trigger fibrosis by activating host T cells in a scleroderma mouse model. **elife**. 2016 Jan 26;5:e09394. doi: 10.7554/eLife.09394.

15, Ozeki N, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, Mabuchi Y, Akazawa C, Kobayashi E, Matsumoto K, Futamura K, Saito T, Sekiya I. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. **Osteoarthritis Cartilage**. 2016 Jun;24(6):1061-70. doi: 10.1016/j.joca.2015.12.018.

16, Mabuchi Y, Matsuzaki Y. Prospective isolation of resident adult human mesenchymal stem cell population from multiple organs. **Int J Hematol**. 2016 Feb;103(2):138-44. doi: 10.1007/s12185-015-1921-y.

17, Itaba N, Sakabe T, Kanki K, Azumi J, Shimizu H, Kono Y, Matsumi Y, Abe K, Tono T, Oka H, Sakurai T, Saimoto H, Morimoto M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Shiota G. Identification of the small molecule compound which induces hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Regenerative Therapy**. 2015 Dec 1 2: 32-41

18, Yasui T*, Mabuchi Y*, Toriumi H, Ebine T, Niibe K, Houlihan DD, Morikawa S, Onizawa K, Kawana H, Akazawa C, Suzuki N, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration. **J Dent Res**. 2016 Feb;95(2):206-14. doi: 10.1177/0022034515610748.

(*These authors contributed equally to this work.)

19, Yoshioka K, Oda A, Notsu C, Ohtsuka T, Kawai Y, Suzuki S, Nakamura T, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Goitsuka R. Loss of the Homeodomain Transcription Factor Prepl Perturbs Adult Hematopoiesis in the Bone Marrow. **PLoS One**. 2015 Aug 18;10(8):e0136107. doi: 10.1371/journal.pone.0136107.

20, Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Uchida S, Ota K, Nagashima T, Masuda H, Miyazaki K, Asada H, Hida N, Mabuchi Y, Morikawa S, Ito M, Bulun SE, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y, Maruyama T. CD34 and CD49f Double-Positive and Lineage Marker-Negative Cells Isolated from Human Myometrium Exhibit Stem Cell-Like Properties Involved in Pregnancy-Induced Uterine Remodeling. **Biol Reprod**. 2015 Aug;93(2):37. doi: 10.1095/biolreprod.114.127126.

21, Ogata Y*, Mabuchi Y*, Yoshida M, Suto EG, Suzuki N, Muneta T, Sekiya I, Akazawa C. Purified Human Synovium Mesenchymal Stem Cells as a Good Resource for Cartilage Regeneration. **PLoS One**. 2015 Jun 8;10(6):e0129096. doi: 10.1371/journal.pone.0129096. (*These authors contributed equally to this work.)

22, Ishii K, Suzuki N, Mabuchi Y, Ito N, Kikura N, Fukada SI, Okano H, Takeda S, Akazawa C. Muscle Satellite Cell Protein Teneurin-4 Regulates Differentiation During Muscle Regeneration. **Stem Cells**. 2015 Oct;33(10):3017-27. doi: 10.1002/stem.2058.

23, Ozeki N, Muneta T, Matsuta S, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, Mabuchi Y, Akazawa C, Kobayashi E, Saito T, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration augmented by an autologous achilles tendon graft in a rat partial meniscus defect model. **Stem Cells**. 2015 Jun;33(6):1927-38. doi: 10.1002/stem.2030.

24, Mabuchi Y, Okano H. Human somatic stem cell-based therapy for cartilage regeneration. **Ann Transl Med**. 2015 May;3(Suppl 1):S17. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.02.35.

25, Suto GE*, Mabuchi Y*, Suzuki N, Koyanagi A, Kawabata Y, Ogata Y, Ozeki N, Nakagawa Y, Muneta T, Sekiya I and Akazawa C. High capacity of purified mesenchymal stem cells for cartilage regeneration. **Inflammation and Regeneration**. 2015 Mar 35(2):78-85. (*These authors contributed equally to this work.)

〔学会発表〕（計 3 件）

1, Yo Mabuchi, Yuta Horiike, Eriko Suto Grace, Yusuke Ogata, Nobuharu Suzuki, Hayato Kaneda, Ryuji Okazaki, and Chihiro Akazawa
P53 GENE REGULATES THE CELLULAR SENESCENCE OF MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS
ISSCR 2018 annual meeting (国際幹細胞学会)
20-23 June, 2018 (Melbourne, Australia)

2, 馬淵洋、小柳明日香、緒方勇亮、須藤絵里子グレース、鈴木喜晴、赤澤智宏
組織間葉系幹細胞の発生に関する細胞集団の解析
第16回日本再生医療学会総会
2017年03月07日～2017年03月09日
仙台国際センター（宮城県・仙台市）

3, Yo Mabuchi, Chihiro Akazawa
Comparative analysis of mesenchymal stem/stromal cells in multiple organs.
先端モデル動物支援 若手技術講習会
2016年09月14日～2016年09月17日
蓼科グランドホテル（長野県・茅野市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://akazawalab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：赤澤 智宏

ローマ字氏名：AKAZAWA Chihiro

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：80291160

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。