

平成 30 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：2015～2017

課題番号：15K10464

研究課題名(和文) 関節組織の再生に用いられる間葉系幹細胞の増殖と可塑性を定義する因子の同定と解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells

研究代表者

古賀 英之 (KOGA, Hideyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：30594080

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)：膝滑膜由来の間葉系幹細胞を用いた関節軟骨、半月板の再生医療の有効性、安定性を保証する為には、移植に用いる細胞の量(細胞数)と共に質(可塑性、多分化能)を制御する手技及び評価法の確立が不可欠である。本研究では、その為の学術的基盤を構築することを目標とする。本研究では、主に結晶板由来増殖因子(PDGF)による間葉系幹細胞の増殖分化の細胞内シグナル伝達に関する解析を行い、PDGFによりリン酸化されるPI3Kの活性が、増殖と分化の両方に重要な機能を有していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Platelet-derived growth factors (PDGFs) have been reported to enhance proliferation of synovial mesenchymal stem cells (MSCs) without reducing their multipotency. This study was aimed to elucidate the intracellular molecular pathways activated by PDGFs. Synovial MSCs were isolated from patients who underwent total knee arthroplasty. Cell proliferation and differentiation assays were performed in the presence of inhibitors specific for intracellular kinases. Both PDGF-AA and -BB enhanced cell proliferation in medium containing reduced serum. These effects were significantly reduced by a PI3K inhibitor, LY290042. During in vitro chondrogenesis, LY290042 significantly reduced the size of spheroids enhanced by PDGF-AA. LY290042 also significantly inhibited in vitro chondrogenic and osteoblastic differentiation. Our data indicated that activation of the PI3K-PKB/Akt pathway by PDGFs plays an important role in both proliferation and differentiation of synovial MSCs.

研究分野：間葉系幹細胞生物学

キーワード：MSC synovium Proliferation Differentiation PI3K PDGF chondrogenesis surface antigen

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、造血幹細胞と同様に成体が有する組織幹細胞で、*in vitro*において限定された増殖能と骨、軟骨、脂肪細胞への分化能を有するため、生体支持組織の再生医療に有用な細胞集団である。私たちは、*in vitro*で培養した膝滑膜由来の間葉系幹細胞の関節内移植により、関節軟骨及び損傷半月板の再生が促進されることを種々の動物モデルを用いて検証してきた。現在はそれらの結果に基づいて、臨床治験を開始している。ヒトの治験において、より効率的かつ安定的な関節軟骨、半月板の再生治療法を実現していくためには、移植する幹細胞の量(数)と共に質の制御が不可欠であると考え、未だその指針は確立していない。そこで本研究では、*in vitro*における安定的な、間葉系幹細胞増殖の分子メカニズムと幹細胞機能(可塑性)の維持の分子メカニズムを分子生物学的、細胞生物学的に解析し、その結果をより安定的な間葉系幹細胞移植治療に還元することを最終的な目標とする。

私たちは、滑膜由来の間葉系幹細胞の増殖に血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)のシグナルが関与していることを明らかとしている。すなわち、*in vitro*において、自己血清で培養を行ったヒト膝滑膜由来細胞は、PDGFRを発現しており、培地中にPDGFの中和抗体を添加することで、増殖が有意に抑制されることを報告している。しかしながら、PDGFの中和抗体で抑制できたのは20-40%程度であったことから、PDGF以外にも滑膜間葉系幹細胞の増殖を制御する重要な因子の存在が示唆された。最近の当教室における検討では、滑膜由来間葉系幹細胞におけるPDGFRの発現は、培養の過程で増大するが、陽性率は必ずしも100%とはならないことが明らかとなっている。また、培養滑膜間葉系幹細胞の表面抗原の網羅的発現解析を行ったところ、PDGFRと同等もしくはそれ以上の発現が観察されるサ

イトカイン/増殖因子受容体として、EGFR、IGFR、TNFRファミリー及びTGF β 結合タンパク等、21分子を同定した。これらの背景に基づき、本研究では、滑膜間葉系幹細胞の増殖に関わるシグナル経路をより詳細に検討することを目的とする。その結果を基に、より効率的な間葉系幹細胞培養の為の学術的基盤を構築することを試みる。

マウスを用いた研究では、滑膜組織中にはヌクレオチドアナログにより長期間標識される増殖活性の低い細胞が存在していること、この標識細胞の一部は、関節軟骨損傷誘導後に増殖活性を発現し、損傷部位の修復に関与することが示されていることから、滑膜中には間葉系幹細胞のnicheが存在している可能性が示唆されている。一方、私たちのこれまでの研究では、ヒト膝滑膜をコラゲナーゼ処理することにより得た有核細胞は、全体の10-30%が、コロニー形成能を有していること、自己血清又は牛胎児血清を用いて14日間培養して増殖させたこれら細胞は、骨、軟骨、脂肪細胞方向へ分化する能力を持っていること、表面抗原CD44、CD73、CD90、CD105が陽性であることから、間葉系幹細胞の定義を満たす細胞集団であることを報告している。興味深いことに、これら細胞集団は、培養に供する以前は上記の4種類の表面抗原のいずれかを発現する細胞数に大きな個人差が存在し4種類の表面抗原を同時に発現する幹細胞の表現型を持つ細胞集団がほとんど存在しないこと、培養開始後早期に4種類の表面抗原の発現細胞数、発現強度の増加が観察されること、培養14日後には、ほぼ全ての細胞が4種類の表面抗原を発現する均一な細胞集団へと変化することを私たちは見いだした。これらの背景並びに予備的検討結果は、*in vitro*における培養は、膝滑膜のniche中に存在する幹細胞画分の増殖を誘導するだけでなく、滑膜細胞の可塑性(多分化能)の再獲得を誘導している可能性も示唆して

いると考えている。

2. 研究の目的

膝滑膜由来の間葉系幹細胞を用いた関節軟骨、半月板の再生医療の有効性、安定性を保証する為には、移植に用いる細胞の量（細胞数）と共に質（可塑性、多分化能）を制御する手技及び評価法の確立が不可欠である。本研究では、その為の学術的基盤を構築することを目標とする。本研究の期間内では以下の項目に関して検討することを試みる。

(1) 滑膜由来間葉系幹細胞の増殖を制御するシグナル経路の解析

(2) 滑膜由来間葉系幹細胞の可塑性（多分化能）の維持（獲得）に関わるシグナル経路の解析

上記2項目の検討結果に基づいて、最終的には、移植した細胞による組織再生能力の正しい評価法の確立を試み、幹細胞移植による再生医療の高効率化に貢献することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 滑膜由来間葉系幹細胞の増殖を制御するシグナル経路の解析

間葉系幹細胞の増殖制御に関わるサイトカイン、成長因子の同定

間葉系幹細胞に発現が観察されるサイトカイン、増殖因子受容体のシグナルが実際に間葉系幹細胞の増殖活性の賦活化に関連しているかの検討を行う。これまでに同定した関節液中に存在するサイトカインを単独又はコンビネーションで培地に添加し、滑膜由来間葉系幹細胞の増殖活性の変化を MTT assay にて評価する。

間葉系幹細胞の増殖に関与する細胞内シグナル伝達経路の解析

PDGFR は細胞内領域に複数のリン酸化部位と様々なシグナル伝達因子と結合する領域を有しており、STAT, PI3K, JNK, PLC/PKC, Src, Ras/MAPK 等の活性化を行うことが知ら

れている。間葉系幹細胞の増殖活性を制御する細胞内シグナルの同定を行うことを目的として、間葉系幹細胞における PDGF 依存性の受容体細胞内領域の Tyrosine リン酸化部位の特定（リン酸化抗体による FACS 解析）をおこなう。更に細胞内シグナルの詳細な解析を行うため、上記の細胞内リン酸化酵素に対する阻害剤による増殖抑制効果の検討を行う。これら阻害剤の、細胞増殖に及ぼす効果に関しては、MTT Assay を用いて行う。

(2) 滑膜由来間葉系幹細胞の可塑性（多分化能）の維持（獲得）に関わるシグナル経路の解析

採取した膝滑膜から出来るだけ多くの間葉系幹細胞を得ることは、幹細胞移植による関節軟骨、半月板再生医療の成否を決定する重要な項目の一つである。これまでの予備的検討では、in vitro における滑膜細胞の培養の過程で、膝滑膜の niche 中に存在する幹細胞画分が増殖するだけでなく、滑膜細胞の可塑性（多分化能）の再獲得を誘導している可能性も示唆された。この仮説を検証するため、本研究項目では、滑膜より単離した細胞のより詳細な細胞系譜の解析を表面抗原解析の手法を用いて行う。

4. 研究成果

(1) 滑膜由来間葉系幹細胞の増殖を制御するシグナル経路の解析

間葉系幹細胞の増殖制御に関わるサイトカイン、成長因子の同定

関節液中に存在するサイトカインの中で滑膜由来間葉系幹細胞の増殖活性を活性化するものとして、PDGF 以外に TNF α 及び IL1 β を同定した。

間葉系幹細胞の増殖に関与する細胞内シグナル伝達経路の解析

PDGF による間葉系幹細胞の増殖の細胞内シグナル伝達経路の解析を行ったところ、PDGF は、細胞内 PI3K、Erk1/2 のリン酸化を

促進することが明らかとなった。また、PLCの活性化に重要な機能を有する CD140b の細胞内ドメインのリン酸化も誘導することを示した。MSCs の軟骨分化能に対する PDGF の効果を検証するために、通常の分化培地（コントロール）、PDGFAA(400ng/ml) 添加群、PDGFAA と LY294002(PI3K 阻害剤、4.2 μM) 添加群、PDGFBB(12ng/ml) 添加群、PDGFBB と LY294002 を添加した群の 5 群を 21 日間ペレット培養し、形成した軟骨塊の重量及び組織評価を行った。骨・脂肪分化はコントロール群と LY294002 を添加した群それぞれを 21 日間分化培地で培養し、alizarin red 染色、oil red-o 染色により評価した。その結果、形成した軟骨塊は PDGF 添加群で重量、大きさとも増大した。PDGFAA と PDGFBB 添加群間での有意な差は観察されなかった。LY294002 を添加した群における軟骨塊の形成は、コントロール及び PDGF 添加群に比して有意に抑制された。MSC の骨分化能に関しても LY294002 はノジュール形成を有意に抑制した。脂肪分化は LY294002 添加、非添加群間に差を認めなかった。

(2) 滑膜由来間葉系幹細胞の可塑性（多分化能）の維持（獲得）に関わるシグナル経路の解析

滑膜より調製した細胞集団は、培養前においては表面抗原の発現パターンに大きな個人差が存在しており、MSC 抗原(CD73/90/105)を同時に発現しているのは全体の 1%以下であった。培養を経るに従って、MSC 抗原陽性細胞は CD44(ヒアルロン酸受容体) 陽性細胞集団の中から生ずることが観察された。MSC 抗原の中で、CD73 陽性細胞の増加は、培養後 1 日以内に観察され、さらにその集団の中から CD90 及び 105 陽性細胞の集団が出現した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件) 全て査読あり

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. doi: 10.1186/s13287-018-0870-9. PubMed PMID: 29720268; PubMed Central PMCID: PMC5930798.

Oyaizu T, Enomoto M, Yamamoto N, Tsuji K, Horie M, Muneta T, Sekiya I, Okawa A, Yagishita K. Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation. *Sci Rep*. 2018 Jan 22;8(1):1288. doi: 10.1038/s41598-018-19670-x. PubMed PMID: 29358697; PubMed Central PMCID: PMC5778072.

Uomizu M, Muneta T, Ojima M, Sekiya I, Koga H, Tsuji K. PDGF-induced proliferation and differentiation of synovial mesenchymal stem cells is mediated by the PI3K-PKB/Akt pathway. *J Med Dent Sci*. 2018 in press

Mizuno M, Katano H, Otabe K, Komori K, Kohno Y, Fujii S, Ozeki N, Horie M, Tsuji K, Koga H, Muneta T, Sekiya I. Complete human serum maintains viability and chondrogenic potential of human synovial stem cells: suitable conditions for transplantation. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Jun 13;8(1):144. doi: 10.1186/s13287-017-0596-0. PubMed PMID: 28610596; PubMed Central PMCID: PMC5470274.

Shioda M, Muneta T, Tsuji K, Mizuno M, Komori K, Koga H, Sekiya I. TNF promotes

proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. PLoS One. 2017 May 18;12(5):e0177771. doi: 10.1371/journal.pone.0177771.

eCollection 2017. PubMed PMID: 28542363; PubMed Central PMCID: PMC5461123.

Kohno Y, Mizuno M, Ozeki N, Katano H, Komori K, Fujii S, Otabe K, Horie M, Koga H, Tsuji K, Matsumoto M, Kaneko H, Takazawa Y, Muneta T, Sekiya I. Yields and chondrogenic potential of primary synovial mesenchymal stem cells are comparable between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. Stem Cell Res Ther. 2017 May 16;8(1):115. doi: 10.1186/s13287-017-0572-8. PubMed PMID: 28511664; PubMed Central PMCID: PMC5434623.

Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I, Muneta T. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. Cell Transplant. 2017 Jun 9;26(6):1089-1102. doi: 10.3727/096368917X694831. Epub 2017 Jan 31. PubMed PMID: 28139195; PubMed Central PMCID: PMC5657749.

Saito R, Muneta T, Ozeki N, Nakagawa Y, Udo M, Yanagisawa K, Tsuji K, Tomita M, Koga H, Sekiya I. Strenuous running exacerbates knee cartilage erosion induced by low amount of mono-iodoacetate in rats. BMC Musculoskelet Disord. 2017 Jan 25;18(1):36. doi: 10.1186/s12891-017-1393-8. PubMed PMID: 28122526; PubMed Central PMCID: PMC5264323.

Ohara T, Muneta T, Nakagawa Y, Matsukura Y, Ichinose S, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. <Original Article>Hypoxia enhances

proliferation through increase of colony formation rate with chondrogenic potential in primary synovial mesenchymal stem cells. J Med Dent Sci.

2016;63(4):61-70. doi: 10.11480/jmds.630401. PubMed PMID: 28049938.

Matsumura E, Tsuji K, Komori K, Koga H, Sekiya I, Muneta T. Pretreatment with IL-1 enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 2017 Feb;19(2):181-193. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.11.004. Epub 2016 Dec 12. PubMed PMID: 27979606.

Kondo S, Muneta T, Nakagawa Y, Koga H, Watanabe T, Tsuji K, Sotome S, Okawa A, Kiuchi S, Ono H, Mizuno M, Sekiya I. Transplantation of autologous synovial mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates. J Orthop Res. 2017 Jun;35(6):1274-1282. doi: 10.1002/jor.23211. Epub 2017 Apr 24. PubMed PMID: 26916126.

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. Epub 2016 Feb 12. PubMed PMID: 26880531.

Nakagawa Y, Muneta T, Otabe K, Ozeki N, Mizuno M, Udo M, Saito R, Yanagisawa K, Ichinose S, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Cartilage Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expresses Lubricin

In Vitro and In Vivo. PLoS One. 2016 Feb 11;11(2):e0148777. doi: 10.1371/journal.pone.0148777.

eCollection 2016. PubMed PMID: 26867127; PubMed Central PMCID: PMC4750963.

Mizuno M, Katano H, Otabe K, Komori K, Matsumoto Y, Fujii S, Ozeki N, Tsuji K, Koga H, Muneta T, Matsuyama A, Sekiya I. Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA/AB in human serum are potential indicators of the proliferative capacity of human synovial mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 2015 Dec 10;6:243. doi: 10.1186/s13287-015-0239-2. PubMed PMID: 26652649; PubMed Central PMCID: PMC4675012.

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. PubMed PMID: 25993981; PubMed Central PMCID: PMC4497612.

Abula K, Muneta T, Miyatake K, Yamada J, Matsukura Y, Inoue M, Sekiya I, Graf D, Economides AN, Rosen V, Tsuji K. Elimination of BMP7 from the developing limb mesenchyme leads to articular cartilage degeneration and synovial inflammation with increased age. FEBS Lett. 2015 May 8;589(11):1240-8. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.004. Epub 2015 Apr 15. PubMed PMID: 25889639.

Nakagawa Y, Muneta T, Kondo S, Mizuno M, Takakuda K, Ichinose S, Tabuchi T, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells promote healing after meniscal

repair in microminipigs. Osteoarthritis Cartilage. 2015 Jun;23(6):1007-17. doi: 10.1016/j.joca.2015.02.008. Epub 2015 Feb 13. PubMed PMID: 25683149.

〔学会発表〕(計8件)

Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I, Muneta T: Comprehensive analysis of surface antigen expression on cultured mesenchymal stem cells from human synovial membrane. International Cartilage Repair Society. Sorrento-Naples, Italy. September 24-27, 2016

〔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〕
ホームページ等:該当なし

6. 研究組織

- (1)研究代表者
古賀 英之 (KOGA, Hideyuki)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 30594080
- (2)研究分担者
辻 邦和 (TSUJI, Kunikazu)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 20323694
- (3)研究分担者
宗田 大 (MUNETAKA, Takeshi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師
研究者番号: 50190864
- (4)研究協力者
関矢 一郎 (SEKIYA, Ichiro)
東京医科歯科大学・再生医療研究センター・教授
研究者番号: 10345291