

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 2 月 1 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19564

研究課題名(和文) ヒト脂肪幹細胞を用いた赤血球創製技術の確立と特性解析

研究課題名(英文) Study on erythrocytes from human adipose-derived mesenchymal stem cells in a unique culture system

研究代表者

宇留賀 友佳子 (Uruga, Yukako)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・戦略的研究シーズ育成事業・研究員

研究者番号：70464831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞は外科手術等による廃棄予定の脂肪組織を利用することができるため、再生医療分野での有用な細胞ソースとして、現在様々な分野で研究が行われている。本研究課題ではヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞からの赤芽球系統への分化能について検討を行った。遺伝子解析結果に基づき、赤芽球への分化に重要な役割を果たす転写因子の強制発現を行ったが、分化は認められなかった。これらの結果を受け行った網羅的遺伝子解析では、巨核球系統への分化に関連する遺伝子の発現が他細胞に比べ多いという結果が得られ、血球分化においては巨核球分化に特化した性質を持つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞(特に脂肪組織由来間葉系細胞)は、技術的に簡便に細胞が得られることや分化能のみならず細胞自体の持つ免疫調節作用等から様々な疾患への応用が期待されている。本研究成果において血球分化という観点における脂肪組織由来間葉系幹細胞の特性の一部が明らかとなり、間葉系幹細胞への巨核球・血小板様細胞への分化特異性が示唆された。今後これらの知見をさらに発展させることで間葉系幹細胞を用いた新規細胞製剤の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, umbilical cord and adipose tissue can differentiate into a variety of cell types. We have previously demonstrated that megakaryocytes(MK) can be generated from ASCs, because they contain important genes in relation to MK differentiation, such as p45NF-E2, GATA2, and RUNX1. Since MK and erythroblast(EB) are generated from a bipotent megakaryocyte-erythroid progenitor, we hypothesized that ASCs also have a potential of erythroblast differentiation. ASCs does not express any important genes in relation to EB differentiation, such as GATA1. We investigated whether ASCs differentiate into EB by transfection with GATA1, but they did not show any EB surface markers. Microarray analysis showed enrichment for the expression of MK specific genes but not EB specific genes in ASCs relative to their expression in CD34+ cells. These findings suggest that ASCs are not bipotent but biased towards MK differentiation.

研究分野：血液学

キーワード：間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化に伴う悪性腫瘍患者の増加により、化学療法や外科手術、放射線治療の対象患者も増加傾向にある。このような状況の中これらの治療経過の中で生ずる副作用への対処や治療の質を高めるための支持療法の重要性も増している。

輸血療法は悪性腫瘍への治療を安全に進めるために重要な支持療法の一つである。中でも化学療法中の血球減少や、外科手術時の出血の対処において必須となることもあり、常に一定数を確保する必要がある。しかし、供給が完全にドナーに依存すること、ドナー由来の感染症のリスクなど多くの問題点が存在する。需要が高まる傾向にある一方、若年の献血者数は減少傾向にあり、今後需給バランスの不均衡が生じる可能性が高い。また、各種ウィルスのスクリーニング法は向上しているものの、ウィンドウ期に献血された血液についてはウイルス感染を検出することができず、検査の限界や問診に頼る現在のシステムにおいて感染症の問題を解決することは難しい。このような問題から、安全な血液の安定供給のために従来の輸血療法に加え新規手法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

このような背景の中、我々の所属グループは *in vitro* でヒト脂肪前駆細胞(脂肪組織由来間葉系幹細胞、脂肪幹細胞)から遺伝子導入などの操作を経ずに巨核球・血小板への分化誘導に成功したことを報告した。脂肪組織由来間葉系幹細胞は外科手術等によって廃棄予定の脂肪組織を利用することができるため、採取における身体的負担が比較的少なく多くの細胞を得ることができる。

他の間葉系幹細胞と比べ細胞入手における量、ドナーの安全性という点、そして再生医療の早期実用化という点からも有用なソースであるといえる。そのため近年では臨床応用を見据え脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いたがん術後の乳房再建や細胞医療への応用などの研究が行われている。

これまでの研究において我々は初代培養細胞である脂肪組織由来間葉系幹細胞からの分化誘導において約 30%の割合で巨核球を得ることができることを見いだした。脂肪組織由来間葉系幹細胞からの血小板分化誘導の機序についてはまだ十分に解明されていないが、巨核球・赤血球はいずれも造血幹細胞から巨核球・赤血球前駆細胞(MEP)を経て分化し、分化系統が近い関係にあることから本研究では脂肪組織由来間葉系幹細胞からの赤芽球系統への分化能について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 出発細胞であるヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の遺伝子発現解析

マウス脂肪前駆細胞を用いた事前検討では、脂肪前駆細胞中に p45NF-E2, GATA2, RUNX1, Fli1, FOG1 といった巨核球分化関連遺伝子発現を認めるものの、赤血球分化に関連する遺伝子である GATA1 の発現を認めないというデータが得られていたため、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(初代培養細胞)においても同様の結果が得られるか否か qPCR 法を用いた検討を行った。

### (2) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞からの *in vitro* 赤芽球分化誘導法の検討

上記の遺伝子発現解析結果を受け、

GATA1 を中心とした赤血球分化に関連する転写因子の遺伝子導入を行い赤芽球への分化誘導を試みた。

分化誘導開始後、得られた細胞の表面抗原発現解析、遺伝子発現解析を行い、分化能につき検討した。

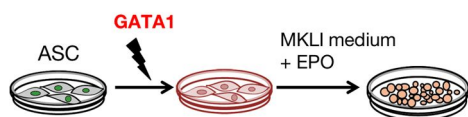


図 1: GATA1 遺伝子導入後の in vitro 分化誘導

### (3) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の網羅的遺伝子解析

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞についてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行った(臍帯血由来 CD34 陽性細胞との比較を中心に)。特に血球分化関連遺伝子に関してヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞における発現について、GSEA を用いて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の遺伝子発現解析

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞に対し、巨核球、赤芽球分化関連遺伝子発現について qPCR 法を用いて検討した。マウス脂肪前駆細胞と同様、p45NF-E2, GATA2, RUNX1, FLI1, FOG1 の発現を認め、GATA1 の発現は認められなかった。

GATA1 は赤芽球系統への分化において、重要な役割を果たす転写因子であり、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞からの赤芽球系統への分化においては、当該遺伝子の強制発現が必要である可能性が示唆された。一方で、巨核球分化関連の転写因子を有していることが示され、これらの結果から巨核球分化に際し

て遺伝子操作は不要であるという現在の培養操作と矛盾しない結果となった。

GATA1 は赤芽球系への分化だけでなく巨核球分化においても重要な役割を果たすことが知られているが、GATA1 ノックアウト細胞を用いた検討では GATA2 がその役割を果たすことで巨核球への分化が可能となることが示されている。ヒト組織由来間葉系幹細胞においても巨核球分化において GATA2 が重要な役割を果たす可能性が予想される。

### (2) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞からの in vitro 赤芽球分化誘導法の検討

上記結果を受け、赤血球分化に関連し、かついくつかの因子を目的とした発現ベクターの作成を行い、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞への遺伝子導入の際の至適条件の検討を行った。これらの発現ベクターのうち、(1)にて発現を認めなかった GATA1 について、上記で検討した至適条件を元に、遺伝子導入を行い、その血球分化能につき検討を行った。

分化誘導培地として、血球分化に用いる無血清培地にエリスロポエチンを添加したものを使用した。血球への分化誘導能の評価については各血球に特有の細胞表面抗原の発現評価にて行った。

細胞表面抗原の検討では、当該遺伝子の導入のみでは赤血球への分化は認められなかった。そのため、遺伝子導入後の血球分化過程における各種血球分化関連遺伝子の発現の経時変化について検討した。その結果、巨核球/赤血球系前駆細胞への分化を示唆する変化は認められたものの、本来赤血球系への分化の際に起こる巨核球系分化を方向付ける遺伝子群の抑制及び赤血球分化関連遺伝子の発現上昇が認められなかった。

### (3) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の網羅的遺伝子解析

(2)までの検討結果により、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞は GATA1 の強制発現のみでは赤芽球系統へ分化しないことが明らかとなった。

そこで、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の血球分化との関連を網羅的に解析するため、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞と臍帯血由来 CD34 陽性細胞(臍帯血由来造血幹細胞)を用いてマイクロアレイ解析を行った。

発現変動遺伝子数( $P < 0.05$ , Fold change  $< -2$ ,  $> 2$ )の検討では、3223 個の遺伝子変動を認め、臍帯血由来 CD34 陽性細胞に対し脂肪組織由来間葉系幹細胞で 1825 個が上昇、1408 個が減少していた。

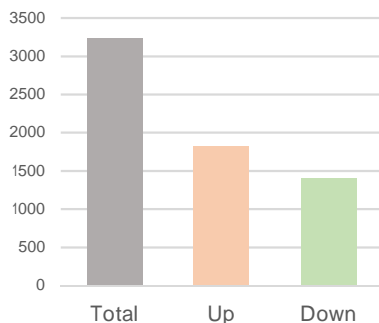


図 2: 変動遺伝子数 (脂肪組織由来間葉系幹細胞対臍帯血由来 CD34 陽性細胞)

GSEA では、臍帯血由来 CD34 細胞にとの比較において、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞が優位に巨核球関連の遺伝子群(Watkins et al, *Blood*, 2009) との関連を認めた ( $p=0.012$ , NES=1.39)(図 3)。

一方で、赤芽球関連の遺伝子群との関連性についてはヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞に比べ臍帯血由来 CD34 細胞が有意に関連を認めた( $p=0.013$ , NES -1.29)(図 4)。

これらの検討結果により、ヒト脂肪組織由

来間葉系幹細胞は巨核球分化に特徴的な遺伝子群を中心に有しているが故に、血球分化においては巨核球のみへの分化能を有する可能性が示唆された。これはヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞が、造血幹細胞からの血球分化とは異なるメカニズムを持つことを示唆している。今後は脂肪組織由来間葉系幹細胞の血球分化に着目し、その特徴的な性質と各種分化誘導機構の解明を目指し、ヒト特有の血球分化モデルの確立を目指し検討を行う予定である。

#### 巨核球関連遺伝子(Watkins et al, *Blood*, 2009)

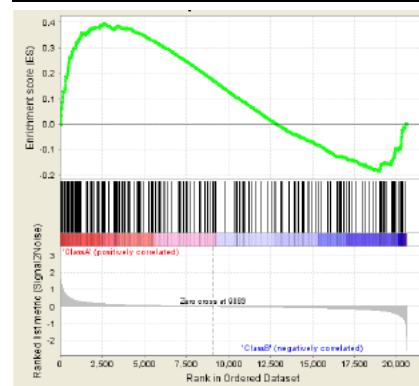


図 3: GSEA(ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(左)と臍帯血由来 CD34 細胞(右))

#### 赤芽球関連遺伝子(Watkins et al, *Blood*, 2009)

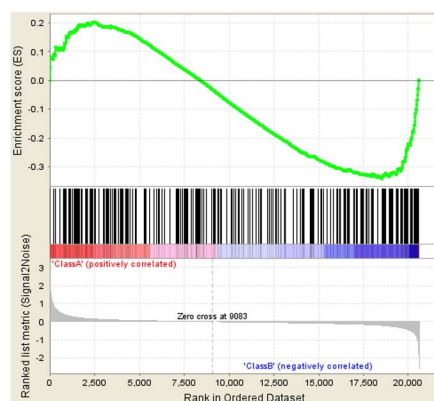


図 4: GSEA(ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(左)と臍帯血由来 CD34 細胞(右))

## 5 . 主な発表論文等

- 〔雑誌論文〕 該当なし
- 〔学会発表〕 該当なし
- 〔図書〕 該当なし

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕該当なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

研究代表者氏名：宇留賀 友佳子

ローマ字氏名：( URUGA, yukako )

所属研究機関名：公益財団法人神奈川科学技  
術アカデミー

部局名：戦略的研究シーズ育成事業

職名：研究員

研究者番号 ( 8 桁 ): 70464831