

令和元年6月19日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10377

研究課題名(和文) ヒト化マウスを利用した高放射線障害治癒効果をもつ間葉系幹細胞の模索

研究課題名(英文) Search for mesenchymal stem cells with high radiation damage healing ability using humanized mouse

研究代表者

滝澤 和也 (Takizawa, Kazuya)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・研究員(任非)

研究者番号：20739388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト化マウスを用いて、間葉系幹細胞(MSC)による組織幹細胞への放射線障害防御効果を試みた。ヒト化マウスは、超免疫不全NOGマウスの骨髄内にヒト造血幹細胞(HSC)とMSCの共移植あるいはHSCのみの移植による作製を試みた。しかし、期待に反して、移植後4から6ヶ月目の末梢血でHSCは確認されず、骨髄内造血微小環境の再構築の難しさが課題となった。一方で、より防御効果の高いMSCを作出することを目的として、ヒトiPS細胞からの誘導によるMSCを作製した。誘導による間葉系幹細胞(iMSC)由来のエキソソームは、被ばくした造血幹細胞の生存率を改善させることをin vitroで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により開発された評価系は、ヒト由来の細胞やタンパク質などとの相互作用がよりヒト生体内での反応を反映したものとなると考えられ、これまでの放射線照射マウス実験系よりも一歩踏み込んだ知見を得られるツールとして、放射線障害治療に向けた創薬基盤などに活用されることが期待できる。一方で、iPS細胞より作製されたiMSCを解析する事により、これまで多くの報告がなされてきたMSCの多様な組織障害治癒効果をもたらしている生物活性の中心的な作用機序を明らかにすると共に、遺伝子改変等によって目的の組織障害に合せた機能的なMSCを作出する医療的応用への足がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to evaluate the protective effects of human mesenchymal stem cells (MSCs) on radiation-induced damage of tissue stem cells, by using humanized mouse model. We tried to generate the humanized mouse model by co-transplantation of human hematopoietic stem cells (HSCs) with human MSCs or transplantation of the human HSCs alone into bone marrow of a hyper immunodeficiency NOG mouse. However, contrary to my expectation, the human HSCs was not detected in peripheral blood of the transplanted mouse at from 4 to 6 months after the transplantation, indicating difficulty of reconstitution of intramedullary hematopoietic microenvironments. In addition, in order to generate MSCs with higher radioprotective effects, MSCs were induced from human iPS cells. The exosomes derived from the induced MSCs (iMSCs) improved the survival rate of irradiated- HSCs in vitro.

研究分野：医歯薬学

キーワード：間葉系幹細胞 造血幹細胞 放射線障害 ヒト化マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 高線量の放射線が人体に及ぼす影響について、これまで多くの動物モデルを用いた解析が行われてきた。しかし、ヒトとヒト以外の動物種では放射線による障害性や修復能力に差があるため、動物モデルで得られた知見は必ずしもヒトに当てはまらないという問題があった。しかし近年、ヒト細胞を放射線、もしくは免疫抑制剤等で前処置した免疫不全マウスに移植することにより、マウス生体内にヒト血液細胞やヒト組織を置き換える手法が確立されてきたことにより、ヒトの病原体感染や疾患発症モデルとして多岐にわたる利用がなされるようになっていく。そこで、我々はヒトの **HSC** と **MSC** を **NOG** マウスの骨髄内に直接共移植することでヒト骨髄微小環境をマウス骨髄内に構築し、ヒト細胞同士の相互作用を保ちながら組織・個体レベルでヒト組織幹細胞に対する放射線の影響を解析できるマウスモデルを構築することを考案した。

(2) **MSC** は周囲の環境に応じて、細胞分化、抗炎症作用、血管新生、組織損傷部位へのホーミングといった選択的な生物活性を発揮することにより、放射線障害のみならず、多様な組織損傷、病態に対して治癒効果を示すことが知られ、その能力は組織再生医療分野において大きな期待を集めている。反面、由来組織(骨髄、脂肪、臍帯、胎盤、歯髄)や精製方法、あるいは培養条件により細胞特性や生物活性の有効性が大きく変わってしまうこともあり、一般的に **MSC** として定義されている細胞間でさえもヘテロな細胞集団であることが認識されている。このことは、体組織由来 **MSC** の実用化における問題点として常に議論を伴うこととなる。

2. 研究の目的

(1) **NOG** マウス骨髄内にヒト **HSC** と **MSC** を直接共移植することによりヒトの骨髄造血微小環境を再現したヒト化マウス (**IBMI-huNOG**) を作製し、**MSC** によりもたらされる組織幹細胞への放射線障害治癒効果を細胞、組織、および個体レベルで評価するためのマウスモデルを構築する。

(2) **MSC** の生物活性の中心となる分子機序を解析することにより、特定の機能性を高めた **MSC** を大量に生産する技術を確認することを最終的な目標として、高い多分化能と自己複製能を有するヒト人工多能性幹細胞 (**induced Pluripotent Stem cells**: **iPS** 細胞) から分化誘導によって、均一な細胞特性を有する **iMSC** を作製するとともに、放射線障害防護効果を中心とした機能的な有用性と細胞特性との関係を検証する。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞、および造血幹細胞の調整

ヒト骨髄単核細胞 (**BM-MNCs**, ロンザジャパン株式会社) 中に存在する **CD34** 陽性 **HSC**、および **CD271** 陽性 **MSC** を表面抗体と磁気ビーズを用いて精製した。回収された細胞は表面マーカーをもとにフローサイトメーター (**FCM**) により純度を確認するとともに、コロニーアッセイを行う事で **HSC** の分化能力を評価した。精製した **CD271** 陽性 **MSC** は培養プレート上に播種し、低酸素 (**3%O₂**) 条件下で継代、増幅した。同時に実験の比較対象として、シングルドナーのヒト骨髄由来 **MSC** (ロンザジャパン株式会社) や、セルソーティングにより純化された **MSC** (**REC**, **PuREC** 株式会社)、不死化 **MSC** 株 (**UE6E7T11**, **JCRB** 細胞バンク) なども増幅した。

(2) ヒト **iPS** 細胞からの誘導間葉系幹細胞 (**iMSC**) の作製

細胞バンクより供与された **iPS** 細胞株 7 株 (**253G1**, **201B7**, **409B2**, **454E2**, **606A1**, **610B1**, **648A1**) を用いて **iMSC** への分化誘導を行った。幾つかの誘導法を比較したが、再現性の良い結果が得られたのは大きく分けて 2 つであり、1 つは培養ディッシュから細胞剥離液を用いて、回収した細胞集団から接着性の差を利用して **MEF** 細胞を除き、ゼラチンコートされた培養ディッシュ上で分化誘導培地 (**10%FBS**, **Sodiumpyruvate**, **L-Ascorbate-2-phosphate**, **L-glutamine**, **NEAA**, **HEPES** を添加した α MEM) により 14 日間培養後、**I** 型コラーゲンコート培養ディッシュ上で増殖培地 (**10%FBS** を添加した α MEM) により継代、増幅する方法。もう 1 つは **MEF** 細

胞を除いた **iPS** 細胞を超低接着培養ディッシュ (**96Well**, 住友ベークライト) に **9,000** 個/**Well** ずつ播種し、胚様体 (**EB**) 誘導培地 (**20%KOSR**, **NEAA**, **2ME**, **Glutamax-I**, **SB431542**) を添加した **KO-DMEM** で **1** 日間培養して、**EB** 細胞塊を形成した後、**I** 型コラーゲンコート培養ディッシュ上に移し、**iMSC** 分化誘導培地で **14** 日間培養する方法である。誘導された **iMSC** はフローサイトメーターによる細胞表面抗原とリアルタイム **PCR** による遺伝子発現解析によって分化マーカーを確認し (陽性: **CD29**, **CD44**, **CD73**, **CD90**, **CD105**, **CD146**, **CD166**, 陰性: **CD14**, **CD19**, **CD31**, **CD34**, **CD45**, **SSEA-1**)、加えて骨、脂肪、軟骨への分化能力を評価することで品質確認を行った。

(3) ヒト化マウスの作製

調整したヒト骨髓由来の造血幹細胞 ($1 \sim 5 \times 10^4$) と間葉系幹細胞 ($5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$) を混合した状態で、前処置として **1** ~ **2 Gy** の γ 線を照射した **NOG** マウス下肢大腿骨髄内へ移植した。移植したヒト細胞の生着は約 **4** 週間毎に末梢血中のヒト **CD45** 陽性細胞を **FCM** により測定することで確認した。最終的には各組織でのヒト造血幹細胞の存在を確認するため、骨髓、肺、胸腺、リンパ節、脾臓、皮膚、小腸上皮などの組織を採取し、各ヒト抗体を用いた **FCM** 解析と免疫組織化学により解析した。ヒト血液細胞の解析には **CD34**, **CD38**: 造血幹細胞、**CD45**: 白血球細胞、**CD3**: T 細胞、**CD19**: B 細胞、**CD4**, **CD8**: 免疫 T 細胞、**CD11b**: 単球・マクロファージ、**CD14**: 単球などを用い、間葉系幹細胞の解析には **CD29**, **CD106**, **CD166**, **CD105**, **CD44**, **CD90**, **CD73**, **CD31**, **CD271**, **CD146**, **SSEA-3**, **SSEA-4** などを用いた。

目安として移植後 **18** 週目までに末梢血リンパ球細胞の **10%** 以上をヒト **CD45** 陽性細胞が占めることが確認されたマウスを、ヒト造血細胞の生着が成功したヒト化マウス (**IBMI-huNOG**) として選別し、放射線照射実験に用いることとした。

(4) 間葉系幹細胞由来エキソソームの濃縮と回収

あらかじめ超遠心によりエキソソームを除去した血清成分を用いて調整した増殖培地を使用して、間葉系幹細胞培養 **72** 時間目の培養上清からエキソソームを回収した。濃縮には超遠心機 ($100,000 \times g$, **2 hr**)、又は精製カラム (**exoEasy Maxi Kit**, 株式会社キアゲン) を用いた。

(5) 間葉系幹細胞の機能解析

間葉系幹細胞の放射線障害に対する防護効果を *in vitro* で検討するため以下の系を準備した。

iMSC を含めた各間葉系幹細胞培養 **48** 時間目の培養上清を用いてヒトサイトカイン抗体アレイ (**ab1339 98**, **Abcam**) を行い、放射線障害防護効果の作用機序となりうる液性因子の発現を確認した。

高線量 (**12Gy**) の γ 線を照射したヒト臍帯静脈内皮細胞 (**HUVEC**) を対象に、**Transwell** を用いた間葉系幹細胞との非接触型共培養を行った。培養 **48** 時間後にトリパンブルー染色による死細胞数と **Annexin V Assay Kits (Enzo Life Sciences)** を用いたアポトーシス細胞数の推移から、放射線障害により誘導される細胞死を抑制する効果を評価した。

同様に高線量の γ 線を照射した **HUVEC** を用いて表皮の細胞修復を模した **Scratch assay** を行い、**48** 時間後までの細胞の挙動を観察した。

(6) 間葉系幹細胞由来エキソソームの放射線障害保護効果の評価

in vitro において間葉系幹細胞の造血幹細胞に対する放射線障害防護効果を検討するため、**CD34** 陽性造血幹細胞へ **2Gy** の γ 線照射を行い、間葉系幹細胞の培養上清から精製したエキソソーム $50 \mu\text{g/ml}$ を培養液中に添加することで造血幹細胞への影響が認められるかを、コロニーアッセイ (**MethoCult H4435 Enriched**, 株式会社ベリタス) を用いて検討した。コロニー数は培養 **7** 日目と **14** 日目に計測した。

4. 研究成果

(1) IBMI-huNOG マウスの作製

当所、ヒト造血幹細胞と間葉系幹細胞を **NOG** マウスの下肢大腿骨内に直接注入することで、尾

静脈からの移植に比べてヒト造血環境の再構築が容易になるものと予想していたが、期待に反して、これまで行った移植実験においては、移植後4から6ヶ月の間を経ても末梢血中のヒト血液細胞のキメリズムの増加が認められなかった。最終的に骨髓内造血を確認するためサンプリングし、骨髓内から回収した細胞のFCM解析を行った結果、個体差はあるものの、凡そ**0.1% -1.1%のCD34陰性/CD38陽性(High)**、**0.05%のCD34陽性(Mid)/CD38陽性(High)**、**0.1%のCD34陰性(またはLow)/CD38陽性(mid)**、**0.3% -0.5%のCD34陽性(Low)/CD38陰性(Negative)**のヒト細胞集団が認められた。これらの集団は階層化された造血幹細胞を保持している様に見えるのだが、移植後12週目に先行して行った解析結果に比べて、ヒト造血細胞のキメリズムはむしろ低下しているようであった。しかし有意な差ではなかったがHSCのみを移植した群に比べ、HSCとMSCを共移植した群の方がCD34陽性細胞の存在率が僅かに高い傾向が見られた。このことは長期のヒト造血幹細胞維持にMSCが関与している事を示唆しているのかもしれない。更に、サンプリング時に骨を破砕し、コラゲナーゼ処理を行って、骨内膜に接している細胞についても解析を行ったが、**0.08% -2.0%程度のCD73陽性細胞**を認め、他は、**CD105陽性**、または**CD90陽性**の間葉系細胞集団は認められなかった。加えて、移植早期のNOGマウス骨髓内でのヒトHSCとMSCの挙動を観察するため、移植後2週間目に注入した側の骨髓内の細胞を回収し、解析を行った際にも、多量に投与されたヒトMSCが**CD105**、**CD90**等のマーカーではほとんど検出することができなくなっていた。*in vitro*でのヒトMSCとマウス骨髓細胞の共培養を2週間行っても、MSCマーカーが検出できなくなることは無いため、マウス生体内でのヒトMSCの追跡には細胞表面抗原以外の別の標的が必要であることが明確となった。

これらの経緯から、始めのスキームから期待されたヒト造血環境の再構築は難しいものと考えられ、移植方法を含めた根本的な見直しが求められた。

(2) ヒトiPS細胞由来誘導間葉系幹細胞(iMSC)の作製

より治癒効果の高い細胞特性を有するMSCを選別、あるいは作出する試みとして、ヒトiPS細胞からiMSCを作製する方法を検証した。既知のものを含め複数の誘導法を比較し、FCM解析によってiPS細胞マーカーからMSCマーカーへの発現の変化を追うことによって、EB形成を経由する方法と経由しない方法のいずれにおいても、機能的なMSCとしての細胞特性を備えたiMSCを安定して誘導する事に成功した。EB形成を経由する方法では全体の誘導期間が長くなるが、EB形成を経由せず単層で誘導するものより、MSC様細胞の出現効率が良い傾向にあった。また、どちらの方法でも最終的に得られるiMSCの形質は良く似たものになるように見えたが、EB形成を経由したiMSCの方が**CD105**の発現が高いという違いも認められた。続いて、この方法がどのiPS細胞においても有効であるかを検証するため、細胞バンクより供与されたiPS細胞株7株を用いてiMSC作成を行った。その結果、EB形成を経由する方法を用いて7株中の6株を再現良くiMSCとして分化させることが出来た。一方、EB形成を経由しない方法でもiMSC作成する事は可能であったが、細胞株によっては特定のMSCマーカーが発現しないなど、得られるiMSCの形質が安定しないこともあった。複数回の試行の結果、7細胞株の中で特に**201B7株**と**648A1株**は、いずれの誘導条件においても再現良くiMSCへと分化し、安定した形質まま良好に継代できることが分かった。対して**454E2株**は誘導直後にはiMSCとしての表現系を示すのだが、1継代することで形質が変わってしまい、増殖も止まってしまうため維持する事が出来ず、由来となるiPS細胞株に依存する分化能力の偏りが顕著に現れた。将来、遺伝子改変などの行程を想定した際には単層誘導型のiMSC作製法の方が、利便性が高い様に思われるため、今後も作製法の改善を進めていく。

(3) ヒトiMSCの機能解析

作成したiMSC(201B7株由来)の機能解析を行うため、はじめにサイトカイン抗体アレイにより、プライマリーの骨髓由来間葉系幹細胞が発現する液性因子とのプロファイリングの比較を行った。その結果、iMSCが髄由来間葉系幹細胞と同様に、**MCP-1**、**OPG**、**TIMP-1**、**TIMP-2**、**IL-6**、**IL-8**、**MIG**、**GRO**、**VEGF**、**BDNF**、**Angiogenin**といった、骨や脂肪、軟骨の分化誘導に関わる因子や、液性免疫の制御、細胞の走化性誘導、サイトカイン産生誘導、血管新生の制御、などの多様な機能的液性因子を産生していることが確認された。また、興味深い事に、骨髓由来

間葉系幹細胞では **Osteoprotegerin** の発現が高いのに対し、**iMSC** では **Osteopontin** の発現が高いという違いが見られた。このことから **iMSC** が造血微小環境における **HSC** の増殖や機能性の維持により強く貢献する可能性が示された。

iMSC に間葉系幹細胞として有用な液性因子の生産が認められたことから、次に機能的な間葉系幹細胞の一つの指標となる、骨、脂肪、軟骨の3組織への分化アッセイを行った。その結果、軟骨への分化においてはやや再現性の悪さが見られたものの、骨と脂肪へは効率良く分化する事が確認された。

続いて、**in vitro** において高線量放射線障害に対する防護効果の有効性を検証するため、 γ 線照射した **HUVEC** との共培養系を用いて、**iMSC** が放射線による細胞死を抑制する効果を持つかの評価と、被爆下での表皮の細胞修復を模した **Scratch assay** を行った。**iMSC** との共培養により細胞の生存率、及び細胞修復に改善効果が見られる事もあったのだが、残念な事に、**Transwell** を用いた非接触型の共培養実験では結果の再現性が悪く、結果的として有意な治療効果を示すことは出来なかった。そこで近年、**MSC** の機能的な生物活性のキープレイヤーと考えられるようになったエキソソームを対象を絞り、引き続き **in vitro** における放射線障害防護効果の有効性を複数のヒト **MSC** 由来のエキソソームとの比較から検証している。

(4) **iMSC** 由来エキソソームの造血幹細胞に対する放射線障害防護効果

iMSC 培養上清中のエキソソームが造血幹細胞に対する放射線障害防護効果を持つかどうかを、コロニーアッセイを用いて検討した。造血幹細胞に **2 Gy** の γ 線照射を行い、培地中へのエキソソーム添加の有無によるコロニー数への影響を培養後7日目、および **14** 日目に確認した。また比較対象として、過去の実験結果から培地中へのエキソソームの添加により顕著な細胞死抑制効果が認められている骨髄間葉系幹細胞の不死化細胞株(**UE6E7T11**)と、高い増殖能力と分化能力を持つ事が確認されている **REC** を用いた。過度の細胞死を抑えるため、造血幹細胞への照射量を **2 Gy** としたが、エキソソームを添加しなかったものではコロニーが形成されなかったため、予想外に γ 線照射の影響が強く出てしまった可能性がある。それでも、各 **MSC** 由来のエキソソームを添加したものではコロニーが確認出来た。培養7日目、**14** 日目共に、**UE6E7T11** 株、及び **REC** 由来のエキソソームを添加したものでは顕著にコロニー数の改善が見られ、造血コロニーの種類を見分けることも可能であった。また、**iMSC** 由来のエキソソームを添加したのも、他の二つには及ばないものの、コロニー数の改善が認められた。この結果は **iMSC** 由来のエキソソームが造血幹細胞に対する放射線障害を軽減していることを示唆するものであった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

Takeshi Yasuda , Wataru Kagawa , Tomoo Ogi , Takamitsu A. Kato , Takehiro Suzuki , Naoshi Dohmae , Kazuya Takizawa , et al. Novel Function of HATs and HDACs in Homologous Recombination through Acetylation of Human RAD52 at Double-Strand Break Sites. PLOS Genetics. 2018 Mar 28;14(3):e1007277. doi: 10.1371/journal.pgen.1007277. eCollection 2018 Mar.(査読有)

Wakako Kuribayashi , Kazuya Takizawa , Kenji Sugata , Madoka Kuramitsu , Haruka Momose , Eita Sasaki , Yuki Hiradate , Keiko Furuhashi , Yoshihisa Asada , Atsushi Iwama , Masao Matsuoka , Takuo Mizukami , Isao Hamaguchi. Impact of the SCF signaling pathway on leukemia stem cell-mediated ATL initiation and progression in an HBZ transgenic mouse model. Oncotarget. 2016 Aug 9;7(32):51027-51043. doi: 10.18632/oncotarget.10210. (査読有)

Obara C, Takizawa K, Tomiyama K, Hazawa M, Saotome-Nakamura A, Gotoh T, Yasuda T, Tajima K. Differentiation and Molecular Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Murine Induced Pluripotent Stem Cells Derived on Gelatin or Collagen. Stem Cells Int. 2016;2016:9013089. doi: 10.1155/2016/9013089. Epub 2016 Aug 25. (査読有)

Obara C, Tomiyama K, Takizawa K, Islam R, Yasuda T, Gotoh T, Tajima K. Characteristics of three-dimensional prospectively isolated mouse bone marrow mesenchymal stem/stromal cell aggregates on nanoculture plates. Cell Tissue Res. 2016 Oct;366(1):113-27. doi: 10.1007/s00441-016-2405-y. Epub 2016 Apr 21. (査読有)

〔学会発表〕(計 6件)

Takeshi Yasuda, Wataru Kagawa, Tomoo Ogi, Takamitsu A. Kato, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Kazuya Takizawa, Katsushi Tajima, The role of human RAD52 acetylation by p300/CBP in DNA double-strand break repair, 3R&3C Symposium, 石川、2018年11月

安田 武嗣, 香川 亘, 鈴木 健裕, 堂前 直, 滝澤 和也, 五月女 美香, 田嶋 克史, **DNA二重鎖切断修復におけるヒト RAD52 のアセチル化修飾の役割**、第 41 回日本分子生物学会、神奈川、**2018年11月**

安田 武嗣, 香川 亘, 鈴木 健裕, 堂前 直理, 滝澤 和也, 五月女 美香, 田嶋 克史, **ヒト RAD52 のアセチル化は DNA 相同組換えに関わる**、日本放射線影響学会 61 回大会、長崎、**2018年11月**

田中 泉, 石原 弘, 薬丸 晴子, 滝澤 和也, 田中 美香, 横地 和子, 明石 真言, **ヒト末梢血における極低線量放射線の吸収線量に比例して増加する lncRNA: バイオドジメトリー指標としての検証**、日本放射線影響学会第 60 回大会、千葉、**2017年10月**

安田 武嗣, 滝澤 和也, 田嶋 克史, **ヒト RAD52 の脱アセチル化酵素 SIRT2/SIRT3 は DNA 相同組換え修復に関わる**、日本放射線影響学会第 60 回大会、日本放射線影響学会第 60 回大会、千葉、**2017年10月**

小原 千寿香, 富山 健一, イスラム ラフィクル, 滝澤 和也, 安田 武嗣, 後藤 孝也, 田嶋 克史, **3次元培養マウス骨髄由来間葉系幹細胞の生物学的特性**、第 16 回日本再生医療学会総会、宮城、**2017年3月**

〔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

6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

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。