

令和 元年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10435

研究課題名(和文) マウス・ヒト間葉系細胞から人工間葉系幹細胞の樹立

研究課題名(英文) Induction of Expandable Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Aged Mesenchymal Stem Cells by a Synthetic Self-Replicating RNA.

研究代表者

潮平 知佳 (Shiohira, Chika)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50325833

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、継代を重ね老化したヒト脂肪由来幹細胞(hADSCs)に、self-replicating VEE-RNAベクターを用いて遺伝子導入を行い、人工間葉系幹細胞(induced tissue-specific stem cells from mesenchymal cells:iTS-M細胞)を作製し評価を行った。結果、もとのADSCsが老化して失った自己複製能を回復し寿命が延命したiTS-M細胞を樹立することができた。また、樹立したiTS-M細胞は、一部の遺伝子発現を除いて、もとのADSCsと同様の遺伝子発現および脂肪や骨への分化誘導能を保持していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪由来幹細胞(ADSCs)は、脂肪・骨・軟骨などの中胚葉系細胞への分化が可能な点や多くの成長因子を分泌することで臓器・組織の修復を促す点により、様々な疾患の治療に使用できる可能性を秘めた細胞として近年注目、多くの臨床研究の報告がなされている。しかしADSCsの自己複製能は限定的で、継代を重ねることによる機能低下が報告されている。本研究は老化して自己複製能を失ったヒトADSCsにiPS作成技術を応用してヒト人工間葉系幹細胞(iTS-M細胞)を樹立した点が独創的であり、臨床応用を考慮した場合、ADSCsの安定供給およびバンク化を目指すうえで、本研究は臨床応用の実現性の高い研究であると思われる。

研究成果の概要(英文)：ADSCs have attracted attention due to their potential for use in the treatment of various diseases. However, the self-renewal capacity of ADSCs is restricted and their function diminishes during passage. We generated induced tissue-specific Mesenchymal(hiTS-M)Stem cells from human aged ADSCs deficient in self-renewal, to use a single synthetic self-replicating Venezuelan Equine Encephalitis (VEE)-reprogramming factor (RF) RNA replicon (SR-RNA) expressing the reprogramming factors OCT4, KLF4, SOX2, and GLIS1. These hiTS-M cells transfected with the SR-RNA vector survived for 15 passages. The hiTS-M cells expressed cell surface markers similar to those of hADSCs and differentiated into fat cells and osteoblasts. Global gene expression profiling showed that hiTS-M cells were transcriptionally similar to hADSCs. These data suggest that the generation of iTS cells has important implications for the clinical application of autologous stem cell transplantation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：iTS-M cells iPS cells reprogramming factors ADSCs VEE-RNA vector

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系幹細胞や脂肪由来間葉系幹細胞は、脂肪・骨・軟骨などの中胚葉系細胞への分化が可能で、多くの成長因子を分泌することで臓器・組織の修復を促す点により、様々な疾患の治療に使用できる可能性を秘めた細胞として近年注目されている。最近では下肢血管再生、肝再生、軟骨再生、GVHD 治療など、多くの臨床研究の報告がなされている。しかし、臨床応用を考慮した場合、これら間葉系幹細胞の限定的な自己複製能と、継代数を重ねるうちにその機能も低下するという点は、細胞の安定供給およびバンク化を目指すうえで重要課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では iPS 細胞作製技術を応用して、ヒト人工間葉系幹細胞(human induced tissue-specific stem cells from Mesenchymal cells: iTS-M 細胞)の樹立を目的とした。我々の研究室ではすでに、山中 3 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4) もしくは 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc) をそれぞれの組織に一過性発現させ、組織特異的幹細胞のマーカーで細胞を選択することにより、マウス膵幹細胞 (iTIS-pancreas 細胞) および、マウス肝幹細胞 (iTIS-Liver 細胞) を人工的に作製することに成功している (Noguchi H et al. Cell Death Differ. IF 8.184 : 図 1)。この細胞は、膵前駆細胞、肝前駆細胞の特異的マーカーの発現を認め、かつ 100 継代以上の自己複製能を維持している。

この組織特異的幹 (iTIS) 細胞の特徴および利点は以下 3 点である。

- 1) 樹立効率が iPS 細胞よりも高い
- 2) 分化誘導効率が iPS 細胞よりも高い
- 3) 奇形腫形成がなく ES/iPS 細胞で懸念された未分化細胞残存による腫瘍形成の心配がない

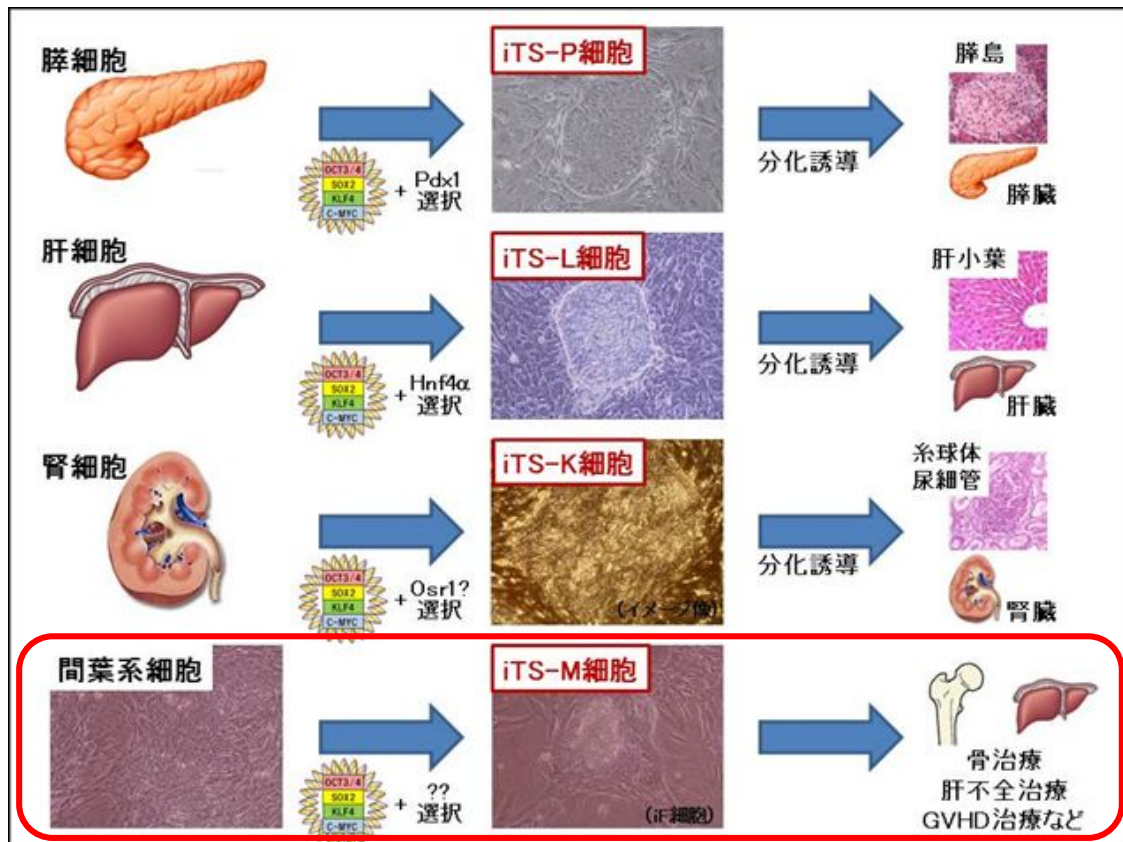


図 1 : iTS 細胞の樹立 : 間葉系細胞に山中因子を一過性に発現させ、組織特異的マーカーでセレクションを行うことにより、人工間葉系肝細胞(iTS-M 細胞)を樹立することを目的としている。現在までに、マウス人工膵幹細胞(iTS-P 細胞)およびマウス人工肝幹細胞(iTS-L 細胞)を樹立しており、マウス人工腎細胞(iTS-K 細胞)と思われる細胞集団も確認している。

3. 研究の方法

本研究期間において、iPS 細胞作製技術を応用して、ヒト間葉系細胞 (ヒト脂肪由来幹細胞; hADSCs) より人工間葉系幹細胞(ヒト iTS-M 細胞)を樹立した。効率的に iTS-M 細胞を樹立するためのセレクションマーカーの検討および決定を行う。また、iTIS-M 細胞の培養条件の検討を行い、iTIS-M 細胞の樹立およびセレクションマーカーの決定を行う。さらに iTIS-M 細胞が安定して樹立できるような培養条件設定を行い、iTIS-M 細胞の安全性試験および分化誘導効率の検討を行う。

4. 研究成果

(1) iTS-M 細胞の樹立およびセレクションマーカーの決定

本研究では、iPS 細胞作成技術を応用して、継代を重ね老化して自己不正能を失った hADSCs に、self-replicating VEE-RNA ベクターを用いて山中 4 因子 Oct3/4、Sox2、Klf4、Glis1 を遺伝子導入し、人工間葉系幹細胞:iTS-M 細胞を作製した。樹立した iTS-M 細胞は、ベクターの戦傷対への残存も確認されず、NANOG、OCT、SOX などの未分化マーカーや、TERT 遺伝子も発現していなかった。樹立した iTS-M 細胞は、自己複製能を回復し、樹立後 15 継代まで寿命を延長することが出来た。よって、明らかにもとの老化して自己複製能を失った ADSCs を若返らせ寿命を延命したことがわかった。

iTS-M 細胞を効率的に樹立するためのセレクションマーカーの検討をフローサイトメーター、免疫染色および遺伝子発現を q-PCR で行った。セレクションマーカーの候補としては、hADSCs のマーカーである CD29、CD44、CD55、CD59、CD71、CD73、CD90、CD105、CD166 をセレクトして行った。結果、樹立した iTS-M 細胞は ADSCs と同様にセレクションマーカーを発現していた。

(2) iTS-M 細胞の培養条件の検討

マウス人工膵幹細胞は ES 細胞培養条件で培養が可能であったが、ヒト人工膵幹細胞の検討では、ヒト ES 細胞培養条件ではうまく培養できないことがわれわれの予備実験で明らかとなり、iTS-M 細胞に関しては検討する必要がある。まずはヒト ES 細胞培養条件で樹立を行ってみた。結果、iTS-M 細胞の樹立後の培養条件は ADSCs と同じ条件で培養することができた。

(3) 分化誘導効率の検討

iTS-M 細胞の分化誘導効率を、遺伝子導入のない ADSCs と比較検討した。具体的には、iTS-M 細胞を *in vitro* 条件下で脂肪や骨に分化誘導し比較した。その結果、iTS-M 細胞はもとの ADSCs と同様、脂肪や骨芽細胞へと分化誘導能を保持していることがわかった。また、骨芽細胞への分化誘導効率を RUNX2 遺伝子の発現で確認した結果、ADSCs と同様に RUNX2 遺伝子が発現していた。

(4) iTS-M 細胞の遺伝子発現およびメチレーション解析

IGF1、HGF、FGF2、VEGFA、EGF 遺伝子発現を q-PCR にて確認した結果、iTS-M 細胞は HGF、FGF2 においては ADSCs より遺伝子発現が有意に高く、VEGFA および EGF より低かった。樹立した iTS-M 細胞はマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現を hADSC および iPS 細胞と比較解析した。その結果、iTS-M 細胞は、iPS 細胞とは異なる遺伝子発現をし、hADSC と非常に近い遺伝子発現をしていることがわかった。また未分化マーカー OCT および NANOG についても樹立した iTS-M 細胞、hADSC および iPS 細胞とをメチレーション解析で比較検討を行った結果、iPS 細胞は OCT、NANOG とともにメチル化の影響はなかったが、iTS-M 細胞および hADSC に関してはメチル化の影響を強く受けていることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 28 件)(下記抜粋)

1: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Shapiro AMJ, Kin T. Induction of Expandable Tissue-Specific Progenitor Cells from Human Pancreatic Tissue through Transient Expression of Defined Factors. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019;13:243-252. doi: 10.1016/j.omtm.2019.01.011. (査読有)

2: Nakashima Y, Nahar S, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, Noguchi H. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of Primary Cultured Cells and Subcultured Cells Using Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2019;7274057. doi: 10.1155/2019/7274057. (査読有)

3: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Ebi N, Hamada E, Tamaki Y, Kuwae K, Kitamura S, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M. A Novel Preservation Solution Containing a JNK Inhibitory Peptide Efficiently Improves Islet Yield for Porcine Islet Isolation. *Transplantation*. 2019;103(2):344-352. doi: 10.1097/TP.0000000000002555. (査読有)

4: Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Kinjo T, Noguchi H. The development of cancer through the transient overexpression of reprogramming factors. *Cell Med*. 2018;10, 2155179017733172 (査読有)

5: Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H. Characterization of induced tissue-specific stem cells from pancreas by a synthetic self-replicative RNA. *Sci Rep*. 2018;8(1):12341. doi: 10.1038/s41598-018-30784-0. (査読有)

- 6: Nahar S, Nakashima Y, **Miyagi-Shiohira C**, Kinjo T, Toyoda Z, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, **Noguchi H**, Fujita J. Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease. *World J Stem Cells*. 2018;10(11):146-159. doi: 10.4252/wjsc.v10.i11.146. (査読有)
- 7: Nahar S, Nakashima Y, **Miyagi-Shiohira C**, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, **Noguchi H**, Fujita J. A Comparison of Proteins Expressed between Human and Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by a Proteome Analysis through Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11). pii: E3497. doi: 10.3390/ijms19113497. (査読有)
- 8: **Miyagi-Shiohira C**, Nakashima Y, Kobayashi N, Kitamura S, Saitoh I, Watanabe M, **Noguchi H**. Induction of Expandable Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Aged Mesenchymal Stem Cells by a Synthetic Self-Replicating RNA. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11). pii: E3489. doi: 10.3390/ijms19113489. (査読有)
- 9: **Miyagi-Shiohira C**, Nakashima Y, Ebi N, Hamada E, Tamaki Y, Kuwae K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Kinjo T, **Noguchi H**. Comparison of tissue loading before and after the creation of a continuous density gradient in porcine islet purification. *Cell Med*. 2018; 10, 2155179018781343. doi.org/10.1177/2155179018781343 (査読有)
- 10: Nakashima Y, **Miyagi-Shiohira C**, Ebi N, Hamada E, Tamaki Y, Kuwae K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Kinjo T, **Noguchi H**. A Comparison of Pancreatic Islet Purification using Iodixanol with University of Wisconsin and with Na-Lactobionate and Histidine Solutions. *Cell Med*. 2018; 10, 2155179018775071. doi.org/10.1177/2155179018775071 (査読有)
- 11: Tsugata T, Nikoh N, Kin T, **Miyagi-Shiohira C**, Nakashima Y, Saitoh I, Noguchi Y, Ueki H, Watanabe M, Kobayashi N, Shapiro AMJ, **Noguchi H**. Role of EGR1 on pancreatic endoderm differentiation *Cell Med*. 2018; 10, 2155179017733177. doi.org/10.1177/2155179017733177 (査読有)
- 12: **Miyagi-Shiohira C**, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Kinjo T, **Noguchi H**. The development of cancer through the transient overexpression of reprogramming factors. *Cell Med*. 2018; 10, 2155179017733172. doi.org/10.1177/2155179017733172 (査読有)
- 13: Ebi N, **Miyagi-Shiohira C**, Hamada E, Tamaki Y, Masamoto M, Makishi E, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Kinjo T, **Noguchi H**. Evaluation of islet purification methods to make continuous density gradient and to load tissue. *Cell Med*. 2018; 10, 2155179017733090. doi.org/10.1177/2155179017733090 (査読有)
- 14: Nahar S, Nakashima Y, **Miyagi-Shiohira C**, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, **Noguchi H**, Fujita J. A Comparison of the Preservation of Mouse Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Using the University of Wisconsin Solution and Hank's Balanced Salt Solution. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1625464. doi: 10.1155/2018/1625464. (査読有)
- 15: Nakashima Y, Nahar S, **Miyagi-Shiohira C**, Kinjo T, Toyoda Z, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, **Noguchi H**. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of the Proteins Secreted by Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2018(10):1469-1494. doi: 10.1177/0963689718795096. (査読有)
- 16: Nakashima Y, **Miyagi-Shiohira C**, **Noguchi H**, Omasa T. The Healing Effect of Human Milk Fat Globule-EGF Factor 8 Protein (MFG-E8) in A Rat Model of Parkinson's Disease. *Brain Sci*. 2018;8(9). pii: E167. doi:10.3390/brainsci8090167. (査読有)
- 17: **Noguchi H**, **Miyagi-Shiohira C**, Nakashima Y, Ebi N, Hamada E, Tamaki Y, Kuwae K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M. Modified cell-permeable JNK inhibitors efficiently prevents islet apoptosis and improves the outcome of islet transplantation. *Sci Rep*. 2018;8(1):11082. doi: 10.1038/s41598-018-29481-9. (査読有)
- 18: Nakashima Y, Nahar S, **Miyagi-Shiohira C**, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, **Noguchi H**. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of Cells Cultured in DMEM 10% FBS and Chemically Defined Medium Using Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7). pii: E2042. doi: 10.3390/ijms19072042. (査読有)
- 19: Hamada E, Ebi N, **Miyagi-Shiohira C**, Tamaki Y, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Kinjo T, **Noguchi H**. Comparison Between Modified Extracellular-Type Trehalose-Containing Kyoto

Solution and University of Wisconsin Solution in 18-Hour Pancreas Preservation for Islet Transplantation. *Pancreas*. 2018;47(7):e46-e47. doi: 10.1097/MPA.0000000000001104. (査読有)

20: Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Noguchi H, Omasa T. Atorvastatin Inhibits the HIF1 α -PPAR Axis, Which Is Essential for Maintaining the Function of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol Ther*. 2018;26(7):1715-1734. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.06.005. (査読有)

21: Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H. Adhesion characteristics of porcine pancreatic islets and exocrine tissue to coating materials. *Islets*. 2018;10(3):e1460294. doi: 10.1080/19382014.2018.1460294. (査読有)

22: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y. Induced Tissue-Specific Stem Cells and Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4). pii: E930. doi: 10.3390/ijms19040930. (査読有)

23: Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H. A proteome analysis of pig pancreatic islets and exocrine tissue by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Islets*. 2017;9(6):159-176. doi: 10.1080/19382014.2017.1389826. (査読有)

24: Noguchi H, Sugimoto K, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y. RCAN-11R peptide provides immunosuppression for fully mismatched islet allografts in mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):3043. doi:10.1038/s41598-017-02934-3. (査読有)

25: Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H. Comparison of Purification Solutions With Different Osmolality for Porcine Islet Purification. *Cell Med*. 2016;9(1-2):53-59. (査読有)

26: Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H. The Evaluation of Islet Purification Methods That Use Large Bottles to Create a Continuous Density Gradient. *Cell Med*. 2016;9(1-2):45-51. (査読有)

27: Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H. Evaluation of Serum-Free, Xeno-Free Cryopreservation Solutions for Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Med*. 2016;9(1-2):15-20. (査読有)

28: Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M, Noguchi H. Cryopreservation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem cells. *Cell Med*. 2015, 8(1-2):3-7. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)(下記抜粋)

第18回再生医療学会総会(神戸)「自立複製型RNAベクターによる人工膵幹細胞(ITS-P)の樹立」潮平知佳 2019年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ヒト組織特異的幹/前駆細胞の人工作製方法

発明者: 野口洋文、潮平知佳、中島義基

権利者: 琉球大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-228996

出願年: 2018年

国内外の別: 国内特許

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：野口洋文

ローマ字氏名 Hirofumi Noguchi

所属研究機関名：琉球大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：50378733

※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。