

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06264

研究課題名(和文) 起源が異なる2つの間葉系幹細胞の細胞生物学的特徴の解析と疾患モデル治療

研究課題名(英文) Study for mesenchymal stem cells derived from the two different origin

研究代表者

江良 択実 (Era, Takumi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：00273706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹細胞(iPSC)は個体にかわるの細胞源として期待されている。私たちは、ヒトiPS細胞から中胚葉様および神経上皮様細胞を介してMSCに分化させるための新しい方法を確立しました。派生した両方のMSC集団は、褥瘡マウスモデルの皮膚潰瘍や変形性関節症のマウスモデルで治療効果を有していた。興味深いことに、2種類の疾患モデルでは、2つの由来が異なるMSC間で治療効果が異なり、治療効果は細胞の起源に依存することが示唆された。この違いは、MSCの分泌する蛋白因子の発現の差に起因することが考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、iPS細胞由来MSCの臨床での治療効果の基盤的知見となる。また個体からMSCと採取することにかわり、iPS細胞から同一的なMSCを将来誘導、分離、増幅するために役立つ知見となる。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from adult human tissues are capable of proliferating in vitro and maintaining their multipotency, making them attractive cell sources for regenerative medicine. However, the availability and capability of self-renewal under current preparation regimes are limited. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) now offers an alternative, similar cell source to MSCs. Herein, we established new methods for differentiating hiPSCs into MSCs via mesoderm-like and neuroepithelium-like cells. Both derived MSC populations exhibited self-renewal and multipotency, as well as therapeutic potentials in mouse models of skin wounds, pressure ulcers, and osteoarthritis. Interestingly, the therapeutic effects differ between the two types of MSCs in the disease models, suggesting that the therapeutic effect depends on the cell origin. Our results provide valuable basic insights for the clinical application of such cells.

研究分野：幹細胞医学

キーワード：間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は成体の骨髄や脂肪組織に広く分布し、比較的容易に分離することができる。線維芽細胞状の形態をもち、試験管内では、適切な条件下で増殖を維持することが可能である。この細胞は、3つの主要な細胞系列、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞に分化できる能力を有し、それ以外にも、筋肉細胞など様々な間葉系細胞へ分化する能力をもっている (Era T. *Inflamm Regen*. 2013)。間葉系幹細胞はその多分化能ゆえに、関節や骨の損傷での修復効果を期待して、その投与がすでに試みられている。しかしながら、間葉系幹細胞を広く臨床に応用するには以下のような、いくつかの基礎医学上と医療上の問題点が存在する。

1) 間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織などに存在すると考えられるが、それぞれの組織由来の間葉系幹細胞の由来や細胞生物学的特徴がはっきりしていない。2) 移植した間葉系幹細胞の治療効果の分子機構について不明である。一方、医療上の問題点として、3) 高齢者からの分離と間葉系幹細胞の増幅は難しい場合が少なくない。4) 分離と増殖に1か月以上も必要のために必要時に自由に使えない。したがって広く行渡りにくい。5) 個人からの採取であり、医療費が高額である。このように間葉系幹細胞が血液幹細胞につぐ第2の幹細胞治療として期待されながらも、この治療を一般化させるには、間葉系幹細胞についての基礎医学的な検討とその医学応用での問題点を解決できる研究を遂行する必要がある。

そこで、ヒトの胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)は様々な細胞へ分化できるという多能性と大量に培養できるという点を活用し、人工多能性幹細胞(iPS細胞)由来の間葉系幹細胞を使つての疾患モデルの治療効果を解析するとともに、間葉系幹細胞がもつ損傷組織を修復する“力”の分子メカニズムを解明する研究を提案する。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞由来の間葉系幹細胞の臨床応用を目指し、1) 誘導した中胚葉由来間葉系幹細胞と神経上皮由来間葉系幹細胞の細胞生物学的特徴を網羅的な遺伝子解析を使ってその相違を明らかにする。2) さらに、疾患モデルマウスを使って、2つの間葉系幹細胞を投与(移植)による治療効果を解析、判定し、効果を解析する。3) 治療効果の分子メカニズムを解明する。前述の目的を達成するために、以下のことを中心に研究を行う。

1) ヒト iPS 細胞から誘導した中胚葉由来と神経上皮由来の間葉系幹細胞の細胞生物学的特徴、増殖能力、遺伝子発現、細胞表面マーカー、分化能、代謝機能、ミトコンドリア機能等の違いがあるかについて解析し、その相違を明らかとする。
2) マグネット圧迫による褥瘡モデルマウス、ヒト変形性膝関節症モデルマウスに、誘導した間葉系幹細胞を移植し治療効果を解析する。
3) 間葉系幹細胞の治療効果の分子機構を組織解析や分泌因子の発現解析などを通して明らかとする。

3. 研究の方法

申請者は、これまでにヒト iPS 細胞から由来が異なる2つの間葉系幹細胞(MSC)を分化誘導することに成功している。1つ目は、BMP4, Activin A 等を用いて中胚葉様細胞を

誘導し、そこから間葉系幹細胞を誘導する方法である。これらの因子を加えてヒト iPS 細胞の分化を誘導すると 6 日後には中胚葉系表面マーカー (PDGFR α , VEGFR2) 陽性の中胚葉様細胞が出現する。これまでの研究から、PDGFR α ⁺VEGFR2⁺(PDGFR α Single Positive: PSP)の分画が将来骨・軟骨になる沿軸中胚葉系細胞であること明らかとしている(Sakurai et al, *Stem cells*, 2006; Miwa et al, *Methods Mol Biol.* 2014)。この PSP 分画から中胚葉系細胞に由来する間葉系幹細胞を誘導できることを見出した。2 つ目は、神経上皮様細胞から間葉系幹細胞を誘導する方法である。申請者はマウス ES 細胞のレチノイン酸 (RA) 添加の分化誘導課下において、神経上皮由来の間葉系幹細胞が培養開始 9 日目の PDGFR α ⁺細胞に含まれることを明らかとした(Takashima et al. *Cell*, 2007)。ヒト iPS 細胞においても添加する RA の時期、PDGFR α ⁺細胞が出現してくる時期がマウスと比べて異なるが、同様の方法で神経上皮由来の間葉系幹細胞を得ることができる。これら起源が異なる 2 種類の間葉系幹細胞をヒト iPS 細胞より誘導し、以下の実験を行う。

- 1) 脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化能力を調べ、多分化能を確認する。
- 2) 間葉系幹細胞で発現する分子を調べる。
- 3) コロニーアッセイ法(CFU-F)にて自己複製能力を調べ確認する。
- 4) 網羅的な遺伝子発現プロファイルを RNA-Sequence や DNA アレイを用いて作成し、総合的な遺伝子発現での相違点を明らかにする。
- 5) さらに、2 つの間葉系幹細胞で異なる遺伝子群のリストを作成し、GO 解析や GSEA 解析にてどのような違いがあるのかを解析する。
- 6) ヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞の疾患モデルでの治療効果の解析
 - 6-1. 褥瘡モデルマウスでの 2 つの間葉系幹細胞の治療効果
 - 6-2. 変形性関節症モデルマウスでの 2 つの間葉系幹細胞の治療効果
- 7) ヒト間葉系幹細胞の Immunomodulate factor と anti-fibrotic factor の検索

4. 研究成果

方法で述べた実験についてそれぞれ結果を記述(番号が対応)。

1. 脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化能力を調べ、多分化能を確認する。

由来が異なる 2 つの間葉系幹細胞(MSC)を脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞へ誘導し、それぞれの細胞系列特異的なマーカーの発現を確認した。また特殊染色を行い、これらの細胞へ分化していることを確認し、多能性を有することを証明した。
2. 2 つの MSC にて、間葉系幹細胞で発現する分子、PDGFR β , CD90, CD73, CD105 が発現していることを FACS 等を用いて確認した。
3. コロニーアッセイ法(CFU-F)を行い、自己複製能力があることを確認した。
4. 網羅的な遺伝子発現プロファイルを DNA アレイを用いて作成し、クラスター解析、PCA 解析を行った。その結果、iPS 細胞から誘導した中胚葉細胞の由来 MSC は、神経上皮(神経堤)細胞由来の MSC に比べて、骨髄由来の MSC と近い関係にあることが明らかとなった。
5. 2 つの間葉系幹細胞で異なる遺伝子群のリストを作成し、分泌因子のいくつかで異なる発現が見られることが明らかとなった。
6. 疾患モデルへの治療効果
 - 6-1. 褥瘡モデルマウスへの効果について

2 つの MSC を褥瘡モデルマウスへ移植し、その治療効果を解析した。その結果、移植群が無移植群に比べて治癒スピードが速かった。以上から、皮膚潰瘍に対して治療効果があることが判明した。

6-2. 変形性関節症モデルマウスへの効果について

膝関節の前十字靭帯を切断することによって正常マウスに変形性関節症のモデルを作成することができる。このモデルマウスの関節内へ 2 種類の間葉系幹細胞を注入した。細胞はすでに効果が認められているヒアルロン酸に混ぜて投与した。投与後 2 週間目の関節の組織切片を作成し、HE 染色による通常の組織解析を行うと共に、軟骨を染める特殊染色を行い関節軟骨の修復の程度を解析した。

明らかに MSC を移植した群が軟骨損傷の修復が早く終了した。これは iPS 細胞から誘導した起源が異なる 2 種類の MSC に軟骨損傷修復を加速させる能力があることを示唆している。また中胚葉由来の MSC が神経上皮由来の MSC よりも効果が高かった。このことは同じ MSC でも由来に依存して治療効果が異なることが示唆された。

7. ヒト間葉系幹細胞の Immunomodulate factor と anti-fibrotic factor の検索

網羅的遺伝子発現プロファイルを使った分泌因子の階層的クラスタリング分析は、PSP-MSC と RA-P α -MSC の間の類似性があることが明らかになった。しかし一部の因子では、発現に差が見られた。qPCR による mRNA の発現確認実験では、HGF および EGF は、RA-P α -MSC よりも PSP-MSC で、より強く発現していた。対照的に、RA-P α -MSC は、PSP-MSC よりも VEGF-A と bFGF を、より高く発現していた。HGF と EGF は皮膚の創傷治癒に関与し、VEGF-A と bFGF は血管新生に関与する。これらの発現の差は、両者がなぜ疾患モデルにての有効性に差があったかを、都合よく説明できる。以上の結果から、MSC による治療効果の差は、それぞれの MSC が発現している分泌因子の差異に基づいていることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsushita K, Numakawa T, Odaka H, Kajihara R, Soga M, Ozasa S, Nakamura K, Mizuta H and Era T.	4. 巻 414
2. 論文標題 Presynaptic Dysfunction in Neurons Derived from Tay-Sachs iPSCs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 128-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2019.06.026.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanigawa S, Naganuma H, Kaku Y, Era T, Sakuma T, Yamamoto T, Taguchi A and Nishinakamura R.	4. 巻 13
2. 論文標題 Activin Is Superior to BMP7 for Efficient Maintenance of Human iPSC-Derived Nephron Progenitors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 322-337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.07.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuboyama T, Yagi K, Naoi T, Era T, Yagi N, Nakasato Y, Yabuuchi H, Takahashi S, Shinohara F, Iwai H, Koubara-Yamada A, Hasegawa K, Miwa A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Simplifying the Chemical Structure of Cationic Lipids for siRNA-Lipid Nanoparticles.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 749-753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmchemlett.8b00652.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eto S, Goto M, Soga M, Kaneko Y, Uehara Y, Mizuta H and Era T	4. 巻 13
2. 論文標題 Mesenchymal Stem Cells Derived from Human iPS Cells via Mesoderm and Neuroepithelium Have Different Features and Therapeutic Potentials.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0200790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0200790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito N, Katoh K, Kushige H, Saito Y, Umemoto T, Matsuzaki Y, Kiyonari H, Kobayashi D, Soga M, Era T, Araki N, Furuta Y, Suda T, Kida Y and Ohta K	4. 巻 13
2. 論文標題 Ribosome Incorporation into Somatic Cells Promotes Lineage Transdifferentiation towards Multipotency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20057-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miwa H and Era T	4. 巻 145
2. 論文標題 Tracing the destiny of mesenchymal stem cells from embryo to adult bone marrow and white adipose tissue via Pdgfr expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.155879.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajihara R, Numakawa T, Odaka H, Yaginuma Y, Fusaki N, Okumiya T, Furuya H, Inui S and Era T	4. 巻 14
2. 論文標題 Novel drug candidates improve ganglioside accumulation and neural dysfunction in GM1 gangliosidosis models with autophagy activation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Rep	6. 最初と最後の頁 909-923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.03.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takumi Era, Kozo Matsushita, Ryutaro Kajihara, Haruki Odaka, Minami Soga, Kimitoshi Nakamura and Tadahiro Numakawa.
2. 発表標題 Presynaptic dysfunction in neurons derived from Tay-Sachs-iPSCs.
3. 学会等名 16th Annual WORLD Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takumi Era
2. 発表標題 Derivation, Induction and Gene manipulation in Mesenchymal Stem Cell.
3. 学会等名 The 25th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江良 択実
2. 発表標題 疾患由来iPS細胞を使った疾患解析と薬剤開発
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江良 択実
2. 発表標題 間葉系幹細胞の起源と分化
3. 学会等名 第4回幹細胞研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江良 択実
2. 発表標題 間葉系細胞の発生と分化
3. 学会等名 第8回細胞再生医療研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Era
2. 発表標題 Origin and development of mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 The 24th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Era
2. 発表標題 Deviation and differentiation in mesenchymal stem cell.
3. 学会等名 第53回日本発生生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関