

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15127

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の運命を左右する新規細胞接着シグナル

研究課題名(英文) Dissecting molecular function of JAM family protein in adipose derived stromal cells

研究代表者

金子 哲治 (Kaneko, Tetsuharu)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20598255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：密着結合分子JAMファミリー(JAMs)は上皮細胞のみならず様々な組織幹細胞に発現するが、その役割は不明である。そこで我々は脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells; ADSC)におけるJAMsの発現分布とその機能解析を行った。その結果8種類あるJAMsのうちJAM-BとJAM-Cが、ADSCの細胞表面に発現していた。そのうちJAM-Cは細胞外ドメインが切断を受けて可溶化され、脂肪組織間質の細胞外基質に沈着することを突き止めた。このJAM-C可溶体を培養皿にコートすると、ADSCの増殖能と幹細胞マーカーの発現量が共に亢進し、幹細胞培養基剤としての有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞を用いた細胞治療には極めて大量の細胞を確保する必要があるが、幹細胞は特殊な培養条件を必要とすることもあり莫大な費用がかかる。よって再生医療の実現にあたって効率の改善と低コスト化が望まれている。本研究により、JAM-C可溶体の幹細胞培養基剤としての有用性が示された。JAM-Cは分子量が小さくリコンビナント蛋白質として比較的安価に調整することができることから、新規幹細胞培養補助剤として有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The JAM family is expressed not only in epithelial cells but also in a variety of stem cells, whereas their functions remain obscure. We analyzed the expression and function of JAMs in adipose-derived stem cells (ADSCs). Among the eight members of JAMs, JAM-B and JAM-C were expressed on surface of ADSCs. Among them, JAM-C was broadly distributed on the extracellular matrix of adipose tissue after cleavage of the extracellular domain. By coating the culture dishes with the soluble JAM-C, the proliferation and stemness of ADSCs were both enhanced, indicating its utility as stem cell culture-material.

研究分野：実験病理学

キーワード：細胞間接着 間葉系幹細胞 培養補助技術

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年 iPS 細胞の発見に端を発する再生医学の著しい進歩によって、これを補完あるいは代替する手法として、幹細胞を用いた再生医療が現実味を帯びてきている。特に間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSCs)は様々な細胞への分化能を有することに加えて、傷害組織に遊走・集積するホーミング能力や、種々の栄養因子産生を介する組織再生能力、免疫抑制作用を併せ持つ(Uccelli et al., Nat Rev Immunol, 2008)ことから、細胞治療のツールとして期待されている。実際に重症心筋梗塞、肝硬変、および多発性硬化症など多彩な疾患に対して MSCs を用いた治験が行われている。MSC のなかでも脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells; ADSC)は体表に近い脂肪組織の採取しやすさに加え、骨髄由来の MSCs と比較して 500-1,000 倍の細胞数が得られるという利点がある。また ADSC は多くの幹細胞と異なり、特殊な因子を加えることなく通常の培地で安定して培養でき、FACS ソーティングによる選別を必ずしも必要としないなど、現実的な幹細胞リソースとしての有用性が大きい。しかしながら ADSC は単一の特異的な表面抗原が同定されておらず、自己複製能や分化能などの幹細胞性(stemness)および増殖能の制御機構や、生体内でどのような周囲微小環境(ニッチ)によって維持されているかなど、多くが謎に包まれている。我々はこれまで細胞間接着による幹細胞の運命決定機構の研究に取り組んできた。細胞間接着分子のうち Junctional adhesion molecule (JAM)ファミリー分子(JAMs)は全 8 種類の分子から構成され、組織や細胞ごとに異なった特有の分布を示す。さらに他の細胞間接着分子が上皮系の細胞で優位に発現し、がちであるのに対し、JAMs は造血幹細胞、神経幹細胞、あるいは筋芽細胞など様々な幹細胞や前駆細胞で発現しており、特に JAM-C は造血幹細胞の維持に重要であることが報告されている(Ebnet et al., Physiol Rev, 2017)。よって JAMs は ADSC の発生、維持、および分化においても何らかの役割を持つ蓋然性が高いと考えた。本研究では、ADSC における JAMs の発現および機能解析を実施し、幹細胞医療における基盤的知見とするものである。

### 2. 研究の目的

本研究では、ADSC の維持における sJAM-C の役割を解明し、さらに細胞培養補助剤としての機能を評価することで、新規幹細胞培養技術として展開することを目的とする。

### 3. 研究の方法

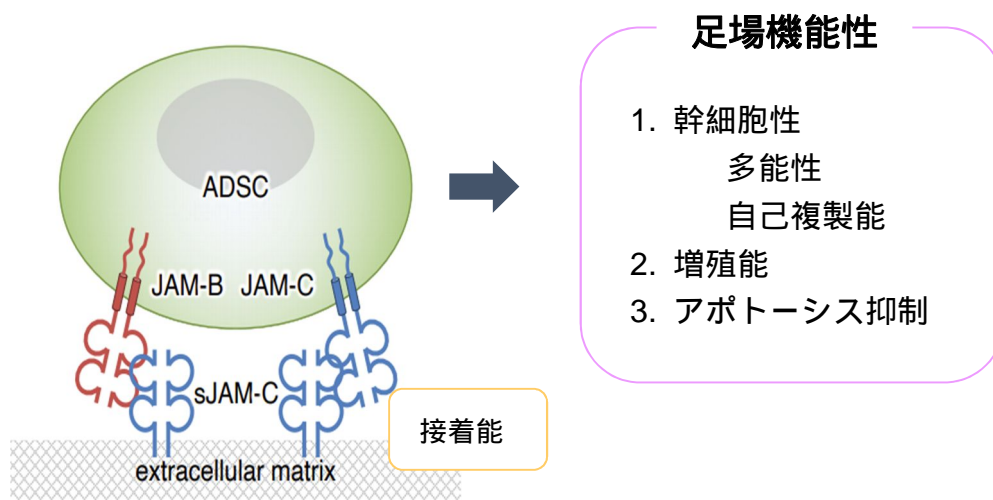
マウス ADSC における JAMs の発現を、JAM-C の N 末端と C 末端を認識する 2 種の抗体を用いて染色、および脂肪組織のウエスタンブロットで確認した。さらに HEK293T 細胞に対し C 末端を HA タグで標識した JAM-C を過剰発現させ、細胞抽出物と培養上清の蛋白質をそれぞれウエスタンブロットで行った。続いて、培養皿に sJAM-C に相当するリコンビナント蛋白質をコートして ADSC を培養し、ADSC の増殖能と幹細胞マーカーの発現量を調べた。

### 4. 研究成果

マウス ADSC における JAMs の発現解析を行った結果、全 8 種類の JAMs のうち JAM-B と JAM-C が細胞表面に発現していた。またマウス脂肪組織でも同様に JAM-B と JAM-C が発現していた。さらに JAM-C のシグナルは細胞膜のみならず広く間質に見られたことから、これまでに報告されている血管内皮細胞などでの例と同様に、切断を受けて可溶化体として SVF から放出され、細網線維から成る脂肪間質に沈着しているのではないかと考えられた。それを証明するため JAM-C の N 末端と C 末端を認識する 2 種の抗体を用いて染色したところ、膜貫通ドメインよりも細胞質側を認識する C 末抗体は細胞膜のみで、分泌される細胞外ドメインを認識する N 末抗体は広く間質で陽性像を示した。また脂肪組織のウエスタンブロットでは全長約 40 kD の JAM-C に加えて、切断を受けた約 28 kD の可溶体も検出された。さらに HEK293T 細胞に対し C 末端を HA タグで標識した JAM-C を過剰発現させ、細胞抽出物と培養上清の蛋白質をそれぞれウエスタンブロットに供した結果、細胞抽出物では約 40 kD の全長の JAM-C のみが検出された一方で、培養上清では約 28 kD の可溶化体に相当する分子量のバンドが検出され、さらにこれは HA タグで認識されなかったことから N 末端であると考えられた。以上より JAM-B と JAM-C は ADSC や SVF の細胞表面に局在すること、ならびに JAM-C は可溶化体 sJAM-C として脂肪組織の間質に分布することが明らかとなった。続いて sJAM-C の機能を解析するにあたり、これが幹細胞ニッチに貢献するという仮説のもと、培養皿に sJAM-C に相当するリコンビナント蛋白質をコートして ADSC を培養すると、ADSC の増殖能と幹細胞マーカーの発現量が共に亢進した。以上より sJAM-C は幹細胞培養コート剤として有用であることが示唆され、提出確認用れた(図)。sJAM-C は分子量

30 kD未満と小さく、ラミニンなど既存のタンパク質コート材料よりも格段に安価に供給できる利点を有する。今後、マウス個体の創傷治癒におけるsJAM-Cの創傷促進剤としての有用性、およびヒトADSCへの応用性を示したのち論文として発表する予定である

図



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Hasegawa Hiroshi, Kaneko Tetsuharu, Kanno Chihiro, Endo Manabu, Akimoto Tetsuo, Yamazaki Morio, Kitabatake Takehiro, Masui Seiichiro, Ishihata Hiroshi, Izumi Kenji	4. 巻 34
2. 論文標題 Evaluation of a Newly Designed Microperforated Titanium Membrane with Beta-Tricalcium Phosphate for Guided Bone Regeneration in Dog Mandibles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants	6. 最初と最後の頁 1132 ~ 1142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11607/jomi.6776	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 Hasegawa Hiroshi, Masui Seiichiro, Ishihata Hiroshi, Kaneko Tetsuharu, Ishida Daichi, Endo Manabu, Kanno Chihiro, Yamazaki Morio, Kitabatake Takehiro, Utsunomiya Shinji, Izumi Kenji, Sasaki Keiichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Evaluation of a Newly Designed Microperforated Pure Titanium Membrane for Guided Bone Regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants	6. 最初と最後の頁 411 ~ 422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11607/jomi.6777	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----