

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10024

研究課題名（和文）組織間葉系細胞亜集団の同定およびクロストークによる組織修復機構の解明

研究課題名（英文）Identification and Crosstalk of Mesenchymal Cell Subpopulations.

研究代表者

馬淵 洋（Mabuchi, Yo）

順天堂大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：50424172

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞は、生体の恒常性に関与するため周りの細胞とクロストークしていると考えられる。しかしながら、間葉系幹細胞集団の不均一性は幹細胞特有のシグナルの同定、組織内の細胞間相互作用解析を困難にしている。本研究では、雑多な集団として扱われてきた間葉系幹細胞を遺伝子発現により分類した。その結果、間葉系幹細胞クローンを用いた遺伝子発現解析より、FZD5が間葉系幹細胞で高発現していること示した。また、間葉系幹細胞と造血幹細胞の共培養実験系を用いて、間葉系幹細胞分泌因子が造血幹細胞の骨髄細胞への分化を促進することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、レポーターマウス及びリネージトレーシングマウスを用いた間葉系幹細胞の可視化や骨髄細胞に対する解析は国内外で進められている。しかしながら、間葉系幹細胞集団の不均一性により、特有のシグナルを同定することが困難であり、培養による性質変化はさらに解析を複雑化する。本研究では、「幹細胞・前駆細胞を含む間葉系細胞亜集団の特性はどのようなものか？」について明らかにし、それぞれ集団を細胞表面抗原と単一細胞による遺伝子発現解析により詳細に定義し、再生治療への関与・細胞間のクロストークを解析する。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells are believed to interact with surrounding cells to contribute to the homeostasis of the organism. However, the heterogeneity of the mesenchymal stem cell population makes it difficult to identify stem cell-specific signals and analyze cell-cell interactions within tissues. In this study, we classified mesenchymal stem cells based on gene expression, which have been treated as a heterogeneous population. As a result, gene expression analysis using mesenchymal stem cell clones revealed that FZD5 is highly expressed in mesenchymal stem cells. Furthermore, using a co-culture experimental system of mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells, we demonstrated that mesenchymal stem cell-secreted factors promote the differentiation of hematopoietic stem cells into bone marrow cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 Single-cell RNA sequence 細胞多様性 細胞間クロストーク

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSCs)は、骨髄およびその他の臓器に存在する組織幹細胞として定義され、紡錘形の形態、自己複製能力および多分化能力によって特徴付けられる(Science,1999)。間葉系幹細胞は培養ディッシュへの接着を利用して骨髄細胞から単離されるが、in vitroでの長期培養はMSCsの細胞老化を引き起こす(Aging,2011)。また、抗炎症性サイトカイン産生の低下や骨折修復能力の低下など、治療活性を阻害することも報告されている(Plos Biol,2008)。したがって、細胞の培養増幅は細胞治療にとって重大な障壁となる可能性がある。さらに、炎症性サイトカインによる刺激・細胞間接触・細胞内シグナル伝達経路の調節不全など、他のさまざまな要因が細胞老化を促進する(J Clin Invest, 2012)。間葉系幹細胞に影響を与えるシグナルの解析は、間葉系幹細胞の未分化維持機構の解明や老化メカニズムの理解に貢献する可能性がある。

1974年に発見されて以来間葉系幹細胞は「細胞を増殖させる培地」で培養されており、分化・老化が進行している間葉系幹細胞を用いた実験結果が報告されている。「間葉系幹細胞は静止状態にあり、老化せずに組織内に存在している」というin vivoでの定義と「間葉系幹細胞は増殖性であり、継代培養すると老化が促進される」というin vitroの定義に大きなズレが生じている。実際、臨床応用に用いられている間葉系幹細胞は、in vitroで増殖させた(老化が進んだ)細胞を幹細胞ソースとして利用している。生体内では間葉系幹細胞はどのような状態か?治療効果に効いている細胞群はどれか?という問いに対して、未だ答えることができていないのが現状である。間葉系幹細胞集団の不均一性により、特有のシグナルを同定することが困難であり(Cell Transplant, 2016) 培養による性質変化はさらに解析を複雑化する。本研究では、「幹細胞・前駆細胞を含む間葉系細胞亜集団の特性はどのようなものか?」について明らかにするため、それぞれ集団を細胞表面抗原と単一細胞による遺伝子発現解析(Single cell RNA-Sequence: scRNA-Seq)により詳細に定義し、再生治療への関与・クロストークを解析する。

2. 研究の目的

本研究では、単一細胞レベルでの遺伝子発現及び表面抗原を指標として間葉系幹細胞を詳細に分類することを目的とする。細胞集団の解析や培養方法を改善することにより、雑多な集団として扱われてきた間葉系幹細胞の本質を解明する。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞の未分化マーカーの同定 間葉系幹細胞の増殖能力・多分化能力の指標となるようなマーカーを調べるため、幹細胞機能の異なる細胞群の根底にある分子機構を調査する。我々の以前の研究では、ヒト間葉系幹細胞を構成するコロニー形成集団から生じるクローンが、その能力に基づいて数種類に分類できることを実証した(Mabuchi et. al., 2013)。本実験では、これらの細胞の挙動の根底にある分子機構を調査するために、遺伝子発現プロファイルを分析する。

(2) 分泌因子に着目した細胞機能の解析 間葉系幹細胞から放出される分泌因子を抽出し、造血幹細胞に与える影響を調べる。実際に細胞外に分泌されているかどうか培養上清の解析や、添加実験などを行い炎症・再生に関わっている分子を同定する。

4. 研究成果

(1) 間葉系幹細胞の未分化マーカーの同定

ヒト間葉系幹細胞を構成する単一細胞クローン (REC) は、増殖能力が高く、多分化能力を有していることを同定している (Mabuchi et. al., 2013)。本実験では、これらの細胞の挙動の根底にある分子機構を調査するために、REC の遺伝子発現プロファイル进行分析した。REC と比較して増殖能力や分化能力が低い細胞 (MEC/SEC) と比較した結果、REC に高く発現している遺伝子 (57 遺伝子) を抽出した (REC の発現レベルが MEC/SEC の発現レベルよりも少なくとも 1 倍以上高い遺伝子群)。遺伝子発現およびオントロジー分析により、REC で上方制御される遺伝子には、Wnt シグナル伝達遺伝子が含まれることが明らかになった。これらのデータを踏まえ、その後の REC の特徴付けにおいて Wnt-Fzd 経路に焦点を当てた。FZD ファミリーの遺伝子の中で、FZD5 は REC で特異的に発現されており (図 1A)、定量的 RT-PCR により、MEC/SEC と比較して REC で高発現されている遺伝子であった (図 1B)。ウェスタンブロットングおよび免疫染色により、REC における FZD5 の特異的発現がタンパク質レベルで確認された (図 1C、1D)。ヒト骨髄中から培養を経ずに単離した細胞画分を調べたところ、FZD5 が間葉系幹細胞画分 (LNGFR+THY-1+) でのみ発現していることが示唆された (図 1E、F)。これらのデータより、FZD5 が未分化な間葉系幹細胞において特異的に発現されることが示された。さらに、FZD5 が多分化能の維持に機能的に重要な役割を果たしているデータを得ることができた (Stem Cells, 2021)。

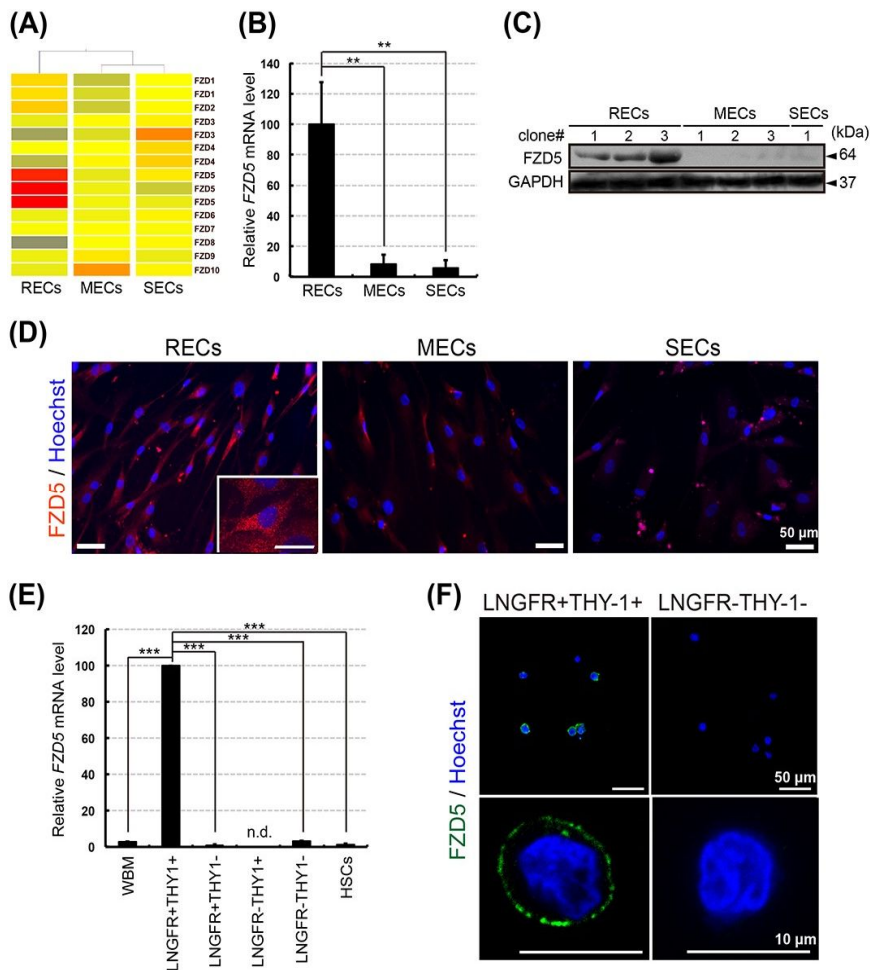


図 1: 高機能間葉系幹細胞で特異的に発現される FZD5 の解析

(A) FZD ファミリー遺伝子発現のヒートマップ。(B) 定量的 RT-PCR によって測定された、REC、MEC、および SEC における相対的な FZD5 発現レベルの解析。(C) FZD5 のウェスタン

ブロット分析。GAPDH を内部対照として使用した。(D) REC、MEC、および SEC における FZD5 (赤) および核 (青) の免疫染色。(E) 骨髄単核細胞の各画分における相対的な FZD5 mRNA 発現レベル。(F) ヒト骨髄からの LNGFR+THY-1+ または LNGFR-THY-1- 画分の新たに選別された細胞における FZD5 (緑色) および核 (青色) の免疫染色。

(2) 分泌因子に着目した細胞機能の解析

造血幹・前駆細胞 (HSPCs) は骨髄ニッチに未分化状態で存在する (Schofield, 1978)。ニッチ内で、間葉系幹細胞は造血幹細胞の分化を制御している (Omatsu et al., 2014)。この相互作用の背後にあるメカニズムを解明するために、造血幹細胞 (c-Kit+Sca-1+Lineage- 細胞: KSL 細胞) と間葉系幹細胞 (CD45-CD31-Ter119-PDGFra+Sca-1+ 細胞: PaS 細胞) を単離した。間葉系幹細胞によって分泌される因子を調べるために、LPS で刺激した後の PaS 細胞から得られた培養上清を使用して分析した。LPS 処理 PaS 細胞の培養上清を KSL 細胞に添加すると、未処理 PaS 細胞と比較して細胞数と骨髄系細胞の割合が増加した (図 2A, 2B)。特に、CD11b 陽性細胞クラスターは集団を大幅に増加させた (図 2C)。これらの結果は、間葉系幹細胞分泌因子が造血幹細胞の骨髄細胞への分化を促進することを示すと考えられる。さらに我々は、PaS 細胞から分泌される分泌因子の特徴を調べ、Ccl2 を同定した。マウス骨髄細胞から、CD34 陰性の長期 HSPCs、CD34 陽性の短期 HSPCs、骨髄性共通前駆細胞 (CMPs)、および GMPs に分離し (図 2D)、リコンビナントマウス Ccl2 を添加した。その結果、GMPs 集団において CD11b 陽性骨髄系への分化を促進した (図 2E)。Ccl2 シグナル伝達が GMP の骨髄系細胞への分化を促進する機構を解明するために、マウス造血幹細胞の培養液に Ccl2 を添加し、scRNA-seq を用いて Ccl2/Ccr2 下流シグナルを解析した。その結果、細胞集団を表すクラスターを 9 つのクラスターに分類することができ、主要な画分は骨髄性細胞を特徴とする細胞集団であった (図 2F: ドット棒)。さらに、Ccr2 の下流にある代表的なシグナル伝達遺伝子の発現を解析したところ、KRas、Raf1、Nfkb1、および Nfkb1 が骨髄細胞クラスターで高く発現していることが示唆された (図 2G)。

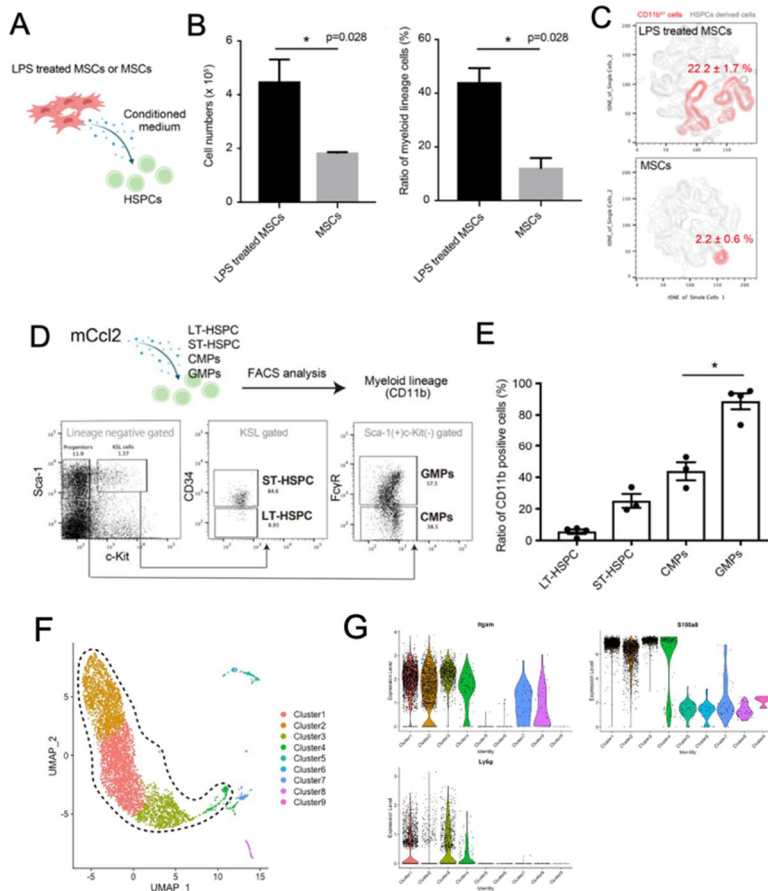


図 2: 間葉系幹細胞由来分泌因子による分化制御

(A) リポポリサッカライド (LPS) による間葉系幹細胞 (MSCs) への刺激の後、得られた培養上清を造血幹前駆細胞 (HSPCs) に添加した。(B) グラフは細胞数と骨髄系細胞の割合を示す。(C) CD11b 細胞表面抗原のクラスター分析。(D) 造血細胞集団に対する Ccl2 の影響の解析。FACS で分離した血球性細胞集団 (LT-造血幹/前駆細胞 [HSPC]、ST-HSPC、CMP、および顆粒球/マクロファージ前駆細胞

[GMP]) に対する分化調節。(E) 棒グラフは FACS プロファイルにおける骨髄細胞の比率を示す。(F) 単一細胞の遺伝子発現を指標とした細胞集団の同定。Ccl2 刺激後のマウス HSPC の UMAP プロット、ドット棒は骨髄性細胞を特徴とする細胞集団を示す。(G) マウス HSPC の細胞を分類する骨髄マーカー (Itgam、Ly6g、および S100a8) の発現。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Ohori-Morita Yumi, Niibe Kunimichi, Limraksasin Phoosuk, Nattasit Praphawi, Miao Xinchao, Yamada Masahiro, Mabuchi Yo, Matsuzaki Yumi, Egusa Hiroshi	4. 巻 11(4)
2. 論文標題 Novel Mesenchymal Stem Cell Spheroids with Enhanced Stem Cell Characteristics and Bone Regeneration Ability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 434 ~ 449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stcltm/szab030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naraoka Yuna, Mabuchi Yo, Yoneyama Yosuke, Suto Eriko Grace, Hisamatsu Daisuke, Ikeda Mami, Ito Risa, Nakamura Tetsuya, Takebe Takanori, Akazawa Chihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Isolation and Characterization of Tissue Resident CD29-Positive Progenitor Cells in Livestock to Generate a Three-Dimensional Meat Bud	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2499 ~ 2499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10092499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mabuchi Yo, Okawara Chikako, Mendez-Ferrer Simon, Akazawa Chihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Cellular Heterogeneity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in the Bone Marrow	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 689366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.689366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamazaki Morio, Sugimoto Kotaro, Mabuchi Yo, Yamashita Rina, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kaneko Tetsuharu, Akazawa Chihiro, Hasegawa Hiroshi, Imura Tetsuya, Chiba Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Soluble JAM-C Ectodomain Serves as the Niche for Adipose-Derived Stromal/Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 278 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9030278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Seiko, Mabuchi Yo, Kohyama Jun, Shimojo Daisuke, Suzuki Sadafumi, Kawamura Yoshimi, Araki Daisuke, Suyama Takashi, Kajikawa Masunori, Akazawa Chihiro, Okano Hideyuki, Matsuzaki Yumi	4. 巻 39
2. 論文標題 FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 318 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Morio, Sugimoto Kotaro, Mabuchi Yo, Yamashita Rina, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kaneko Tetsuharu, Akazawa Chihiro, Hasegawa Hiroshi, Imura Tetsuya, Chiba Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Soluble JAM-C Ectodomain Serves as the Niche for Adipose-Derived Stromal/Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 278-278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9030278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Seiko, Mabuchi Yo, Kohyama Jun, Shimojo Daisuke, Suzuki Sadafumi, Kawamura Yoshimi, Araki Daisuke, Suyama Takashi, Kajikawa Masunori, Akazawa Chihiro, Okano Hideyuki, Matsuzaki Yumi	4. 巻 39
2. 論文標題 FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 318-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Niibe Kunimichi, Ohori-Morita Yumi, Zhang Maolin, Mabuchi Yo, Matsuzaki Yumi, Egusa Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 A Shaking-Culture Method for Generating Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Spheroids With Enhanced Multipotency in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 590332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2020.590332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suto Eriko G., Mabuchi Yo, Toyota Saki, Taguchi Miyu, Naraoka Yuna, Itakura Natsumi, Matsuoka Yoh, Fujii Yasuhisa, Miyasaka Naoyuki, Akazawa Chihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Advantage of fat-derived CD73 positive cells from multiple human tissues, prospective isolated mesenchymal stromal cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72012-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Yuta, Fujisaki Keiko, Hosoda Shoko, Amemiya Yusuke, Okazaki Shogo, Notsu Chihiro, Nishiyama Chiharu, Mabuchi Yo, Matsuzaki Yumi, Oda Akihisa, Goitsuka Ryo	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcription factor Tlx1 marks a subset of lymphoid tissue organizer-like mesenchymal progenitor cells in the neonatal spleen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56984-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Nobuharu, Hyodo Mai, Hayashi Chikako, Mabuchi Yo, Sekimoto Kaori, Onchi Chinami, Sekiguchi Kiyotoshi, Akazawa Chihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Laminin 2, 4, and 5 Chains Positively Regulate Migration and Survival of Oligodendrocyte Precursor Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56488-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Chikako, Suzuki Nobuharu, Mabuchi Yo, Kikura Naomi, Hosoda Yukina, de Vega Susana, Akazawa Chihiro	4. 巻 523
2. 論文標題 The extracellular domain of teneurin-4 promotes cell adhesion for oligodendrocyte differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 171 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ouchi Rie, Togo Shodai, Yo Mabuchi et al.	4. 巻 30
2. 論文標題 Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 374 ~ 384.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2019.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Junichi, Mabuchi Yo, Hata Kenji, Yasuhara Rika, Takamatsu Koki, Kujiraoka Satoko, Yukimori Akane, Takakura Ikuko, Sumimoto Hidetoshi, Fukada Toshiyuki, Azuma Masayuki, Akiyama Haruhiko, Nishimura Riko, Shimane Toshikazu, Mishima Kenji	4. 巻 382
2. 論文標題 Sox9 regulates the luminal stem/progenitor cell properties of salivary glands	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111449 ~ 111449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.05.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 YO MABUCHI
2. 発表標題 FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells
3. 学会等名 12th Stem Cell Society Singapore Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬淵 洋、須藤 絵里子、鈴木 喜晴、赤澤 智宏
2. 発表標題 間葉系幹細胞垂集団の同定と特性解析
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mabuchi Yo	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Elsevier Inc.	5. 総ページ数 7
3. 書名 Encyclopedia of Bone Biology.	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 幹細胞の分離方法ならびに培養および分化誘導方法	発明者 赤澤智宏、須藤絵里子、 子グレース、馬淵洋、 武部貴則	権利者 東京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-079272	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>順天堂大学 大学院医学研究科 難病の診断と治療研究センター https://akazawalab.com/ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子生命情報解析学分野 http://akazawalab.com/publication/</p>
--

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
研究分担者	赤澤 智宏 (Akazawa Chihiro) (80291160)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	

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
---------	---------