

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10029

研究課題名（和文）間葉系幹細胞の生体内挙動解析に基づく機能増強型移植細胞の作製

研究課題名（英文）Functional enhancement of MSCs based on analysis of expression profiles of secreted factors

研究代表者

高田 仁実 (Hitomi, Takada)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：80641068

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）：間葉系幹細胞は再生医療の実用化に向けた臨床研究が急速に進んでいるにも関わらず、その培養方法や選別方法に統一されたスタンダードがほとんど存在しない。本研究は、マウス脂肪組織から回収した間質血管細胞群を用いて、培養の有無および培養条件の違いによる遺伝子発現変化を解析した。さらに下肢虚血モデルマウスにそれら条件の異なる細胞を投与し、治療効果を比較解析した。その結果、培養後の細胞は脂肪組織から回収した直後の細胞として遺伝子発現が大きく変化すること、また培養条件の違いにより分泌性因子の発現が変化することなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞を用いた再生医療は、様々な炎症性疾患や虚血性疾患における新たな治療法として急速に研究が進められている。ところが、間葉系幹細胞の培養方法や選別方法は統一されておらず、どのような性質を持った間葉系幹細胞が高い治療効果を持つのかについて包括的な研究はほとんどなされていない。本研究は、培養条件の異なる間葉系幹細胞の遺伝子発現をシングルセルレベルで比較し、下肢虚血モデルマウスを用いてそれらの治療効果比較した。

研究成果の概要（英文）：Although mesenchymal stem cells holds great promise in regenerative medicine to treat various inflammatory diseases or ischemic diseases, there are no standards for cell isolation procedure and culture method. Here we analyzed the gene expression profile of freshly isolated stromal vascular fraction (SVF), SVF cultured under the adherent condition, and SVF cultured under the floating condition by single-cell RNA-seq. In addition, we injected those cells into limb ischemia model mice and analyzed their therapeutic efficacy. We found that SVF cultured under the floating condition maintained the gene expression profiles of freshly isolated SVF, and that SVF cultured in different culture conditions exhibited different expression profiles of secreted factors.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 シングルセル解析 分泌性因子 下肢虚血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

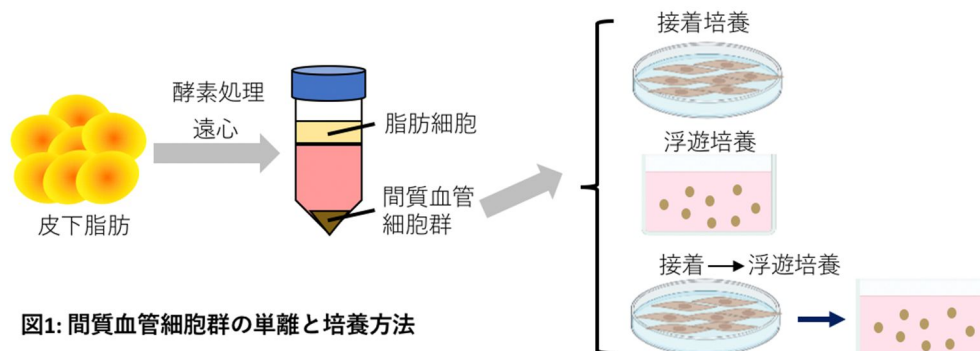
間葉系幹細胞は、骨髄や脂肪などの成体組織に存在する体性幹細胞であり、骨、脂肪、軟骨等への分化能を持つ。一方、本細胞は液性因子を介した抗炎症作用や組織再生促進作用により、様々な炎症性疾患や虚血性疾患に対する治療効果を示すことから、再生医療の実用化に向けた臨床試験が急速に進んでいる。例えば、下肢虚血の患者に間葉系幹細胞を移植すると、既存の治療法では治すことができなかった難治性潰瘍が改善し、疼痛が緩和されて歩行能力が向上するなど目覚ましい成果を挙げた治療例が報告された。その一方で、治療効果が思うように上らず下肢切断に至る例も報告されており、間葉系幹細胞のロット差や培養条件の違いに伴う治療効果のばらつきが指摘されるなど、多くの課題も残されている。

2. 研究の目的

上記課題を解決するためには、間葉系幹細胞の性質と機能を正確に理解することが重要である。間葉系幹細胞は、培養の有無や培養方法の違いによって遺伝子発現が変化し、それに伴って細胞機能が変化することが示唆されている(文献 1)。ところが、どのような性質を持った間葉系幹細胞が高い治療効果を有するのかを体系的に解析した研究は少なく、移植用細胞の機能を正確に評価することが困難であることが問題となっている。そこで本研究は、培養方法の異なる間葉系幹細胞の遺伝子発現を比較し、それらの治療効果と照らし合わせることで、間葉系幹細胞の性質の違いによる細胞機能の変化を包括的に理解することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理した後に遠心し、間質血管細胞群を採取した。間質血管細胞群は脂肪組織に含まれる脂肪細胞以外の細胞集団であり、間葉系幹細胞や血球系細胞および血管内皮細胞などを含んでいる。採取した間質血管細胞群を(a)接着培養、(b)浮遊培養、(c)接着培養後に浮遊培養、の3条件で培養を行った(図1)。これら3条件の培養細胞と、脂肪から採取した直後の間質結果細胞群の遺伝子発現をシングルセル解析および RT-qPCR によって比較した。



(2) マウス大腿動脈を結紮・除去することにより下肢虚血モデルマウスを作製した。次に、(1)に記載した3条件の培養細胞をトリプシン処理により乖離し、pKH26を用いて染色した後、虚血肢に注入した。同様に、脂肪組織から採取した直後の間質血管細胞群も pKH26 で染色し、虚血肢に注入した。細胞の注入は、下肢虚血の誘導と同時に行った。一週間ごとに病態スコア(表 1)を記

録した後、虚血肢の作製から4週間後に虚血肢の腓腹筋を回収し、凍結切片をヘマトキシリン・エオシン染色によって解析した。

4. 研究成果

(1)我々が以前に報告したシングルセル解析の結果から、皮下脂肪組織から回収した直後の間質血管細胞群の中には、表面マーカーで分離可能な2種類の性質の異なる間葉系幹細胞が存在することが明らかになっている(文献2)。

1種類はCD55+/CD34+細胞であり、*Bmp2*, *Fgf2*, *Netrin*, *Lif*などの分泌性因子を発現する。もう1種類はCD55-/CD34+細胞であり、コラーゲンやマトリックスメタロプロテアーゼなどの細胞外基質制御因子を主に発現する。そこでまず、これらの生体内間葉系幹細胞が発現する遺伝子の発現パターンを3種類の培養条件の細胞で解析した。その結果、浮遊培養を行った細胞で*Cd34*, *Cd55*の発現が比較的高く維持されることが明らかとなった。この結果と対応して、浮遊培養細胞は生体内間葉系幹細胞が発現する分泌性因子*Bmp2*, *Lif*, *Netrin*を高発現することが示された。以上の結果より、浮遊培養は生体内における間葉系幹細胞の性質を維持できる培養条件であることが示唆された。一方、血管新生において中心的な役割を果たす*Vegfa*は培養前の細胞や浮遊培養細胞での発現は低く、接着培養もしくは接着培養の後に浮遊培養した細胞で高発現することが示された。最近、SDC1陽性の脂肪前駆細胞が繊維化に寄与することや、CXCL14を発現する脂肪前駆細胞が単球の浸潤を制御する能力があることが示されている。3条件の培養細胞でこれらの因子の発現を解析した結果、*Sdc1*は接着培養した細胞で発現が低く、一方CXCL14は培養条件ごとの発現の差は認められなかった。その他、各培養条件で発現量に差がある分泌性因子をリストアップしてまとめており、培養前後および培養条件の違いにより発現が変動する遺伝子を網羅的に同定することに成功している。

(2)下肢虚血モデルマウスを作製し、脂肪組織から回収した直後の間質血管細胞群、3種類の条件で培養した細胞、およびネガティブコントロールとしてPBSを虚血肢に注入し、4週間後にそれぞれの群における病態改善能を解析した。1週間ごとに記録した病態スコアを比較した結果、接着培養から浮遊培養した細胞を投与した群で、壊死の抑制がやや向上することが示された。次に、筋組織の凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色によって、筋繊維の壊死および再生の度合いを比較した。その結果、病態スコアの結果と対応して、接着培養から浮遊培養した細胞を注入した群において、中心核を持つ再生筋の数が増加する傾向が認められた。

スコア	病態
0	下肢切断
1	下肢に壊死が見られる
2	足に壊死が見られる
3	2本以上の指が変色している
4	1本の指が変色している
5	2本以上の爪が変色している
6	1本の爪が変色している
7	正常

表1: 病態スコア

<引用文献>

1. Mashiko T, Takada H, Wu SH, Kanayama K, Feng J, Tashiro K, Asahi R, Sunaga A, Hoshi K, Kurisaki A, Takato T, Yoshimura K. Therapeutic effects of a recombinant human collagen peptide bioscaffold with human adipose-derived stem cells on impaired wound healing after radiotherapy. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 May;12(5):1186-1194.
2. Sasagawa Y, Danno H, Takada H, Ebisawa M, Tanaka K, Hayashi T, Kurisaki A, Nikaido I. Quartz-Seq2: a high-throughput single-cell RNA-sequencing method that effectively uses limited sequence reads. *Genome Biol.* 2018 Mar 9;19(1):29. doi: 10.1186/s13059-018-1407-3. PMID: 29523163; PMCID: PMC5845169.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒岩隆史、高田仁実、栗崎晃
2. 発表標題 成熟胃オルガノイドの分化培養条件検討
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019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
---------	---------