

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10033

研究課題名(和文) 高機能間葉系幹細胞の選択的培養増殖法の開発と組織肥沃化・血管新生治療への応用

研究課題名(英文) Development of Methods for Selective Proliferation of Highly Functional Mesenchymal Stem Cells and Applications to Tissue Enrichment and Angiogenesis Treatments

研究代表者

白土 タカ子 (SHIRADO, TAKAKO)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：50790391

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)：ヒト脂肪組織由来幹細胞(hASCs)に培養過程でストレス(高温、低pH、酵素、低浸透圧、メカニカルストレス)を与えることでMuse細胞を含む多能性を保持した高機能間葉系幹細胞を濃縮することができた。また、hASCsをポリスチレンビーズまたはコラーゲンビーズのマイクロスフェアを足場として接着させ、攪拌により微小重力下で培養したところ、静置培養されたhASCsに比べて多能性マーカー遺伝子を発現している細胞が多く見られ、そのような細胞集団は脂肪生成、骨形成、軟骨形成への高い分化能を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織中に含まれる脂肪幹細胞は入手のしやすさ、安全性の高さなどから形成外科領域の疾患においても慢性下肢虚血、放射線障害組織、瘢痕拘縮組織、自己免疫性疾患など様々な難治性疾患の質的・機能的改善にその適応が拡大されつつある。脂肪幹細胞は均一な細胞集団ではなく、その中にはわずかながら高度な分化能を示す未分化細胞が含まれており、未分化状態を維持したまま選択的に大量培養することはこれまで困難であった。本研究によりそれが可能になることで、これまで根本的な治療法がなかった糖尿病および糖尿病性腎症などに起因する重症下肢虚血などの治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：By applying stress (high temperature, low pH, enzyme, low osmotic pressure, mechanical stress) to human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) during the culture process, we were able to concentrate highly functional mesenchymal stem cells containing pluripotency including Muse cells. In addition, when hASCs were adhered using microspheres of polystyrene beads or collagen beads as scaffolds and cultured under microgravity by stirring, many cells expressed pluripotent marker genes compared to statically cultured hASCs. It was revealed that such cell populations show high differentiation potential in adipogenesis, osteogenesis, and chondrogenesis.

研究分野：再生医学

キーワード：高機能間葉系幹細胞 選択培養 ヒト脂肪組織由来幹細胞 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

近年、従来では均一 (homogenous) な細胞集団であると思われていた組織幹細胞中にも、多能性マーカーの多寡をはじめとする不均一性 (heterogeneity) や個性 (individuality) が存在することが分かってきた。長時間のトリプシン処理やコラゲナーゼ処理に対し耐性を示し、組織から細胞抽出後に表面抗原 SSEA-3 により濃縮・選抜される Muse 細胞を含む多能性幹細胞は胚葉を超えた高い分化能を示すが、由来する組織によってその分化方向性に違いが見られることから、同じ多能性幹細胞であってもそれぞれの組織によってその性質に違いがあることが推測されている。臨床応用のためには、安定して必要量の高機能間葉系幹細胞を脂肪組織から抽出・培養することが必須となる。しかし組織中にわずかにしか存在しないため、未分化状態を維持したまま大量培養する手法が確立していない。脂肪組織からストレスによる選択的培養や浮遊培養により、高機能間葉系幹細胞を濃縮することができれば、従来の治療で用いられる脂肪由来幹細胞 (hASCs) および血管新生促進効果が期待される脂肪由来血管内皮前駆細胞 (AEPCs) と組み合わせることで、変性・虚血組織に対する肥沃化・血管新生治療効果が高まる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究ではヒト脂肪由来幹細胞集団内における高機能間葉系幹細胞を選択的に培養増殖させる新規的な培養法を開発し、組織肥沃化・血管新生のために、その細胞集団を利用した効果的な再生治療を開発するための研究を行う。高機能間葉系幹細胞が間葉系幹細胞よりも高ストレス耐性であり、ストレスにより増殖・活性化する性質を利用し、高機能間葉系幹細胞の増幅と濃縮が可能であるのかを明らかにすることを目的とした。

多能性間葉系幹細胞を主軸とした再生治療が可能となれば、従来の抗炎症作用・免疫抑制作用に依存した幹細胞治療だけでなく、生体内での幹細胞の本来の役割といえる細胞分化・組織修復を主軸とした再生医療の実現が可能となり、その治療対象は肝硬変、脳梗塞、心筋梗塞などの致死的な疾患にまで拡大される。

## 3. 研究の方法

- (1) 脂肪移植術などで不要となったヒト脂肪組織を患者の同意を得て回収し、hASCs を抽出した。継代数 3 (P3) で 5 種類のストレス条件下 (温度 (45 °C、1 分)、低 pH 溶液 (pH5、1 時間)、酵素 (TrypLE Express、20 時間、37 °C)、低浸透圧 (Milli-Q 水、1 分)、メカニカルストレス (穴の小さなコネクタでつないだ 2 本のシリンジを 30 回往復させる)) に hASCs を暴露し、細胞の未分化状態の指標となる SSEA-3 の発現をフローサイトメーターで解析した。
- (2) マイクロスフェア (ポリスチレンビーズ、コラーゲンビーズ) を足場とし hASCs を接着させ、攪拌による微小重力下で培養を行い、細胞の接着および増殖が問題なく行われる培養条件を検討した。
- (3) マイクロスフェアを使って、静置または攪拌による微小重力下で培養された hASCs における SSEA-3 陽性細胞を計測した。
- (4) マイクロスフェアを使った微小重力下で培養された hASCs において多能性幹細胞マーカー (OCT4、SOX2、NANOG) の発現を蛍光抗体染色法により調べた。
- (5) マイクロスフェアを使って静置または攪拌により培養された hASCs における OCT4、SOX2、NANOG、MYC、KLF4、CD34 の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。
- (6) マイクロスフェア上で攪拌により培養した hASCs と静置培養した hASCs のコロニー形成能、管状構造形成能、脂肪生成・骨細胞・軟骨細胞への分化能を比較した。

#### 4. 研究成果

(1) フローサイトメトリーにより、P3 の hASCs の  $94.9 \pm 3.3\%$  で CD105、CD90 および CD73 が発現し、そのうちの  $94.9 \pm 3.3\%$  で CD45 が発現していないことを確認した。5 種類のストレス処理と無処理 (コントロール) の hASCs で、処理後 1 日の総細胞数とその生存率、SSEA-3 陽性率を計測した。ストレスを与えた細胞では、コントロールに比べて生存率が 62.4-74.2% と低下していた (図 1A)。また、ストレスを与えた細胞では、SSEA-3 陽性細胞の割合がコントロールの 1.3% に比べ、熱 (2.1%)、低 pH (3.1%)、酵素 (4.2%)、低浸透圧 (2.2%)、メカニカルストレス (1.4%) と高くなった。しかし、SSEA-3 陽性細胞の総数としてはコントロールと比べて違いは認められず、メカニカルストレスにおいてはむしろ少なくなった (図 1B)。この結果から、本研究で行ったストレス条件下に細胞を暴露することで、SSEA-3 陽性細胞が濃縮されることがわかった。

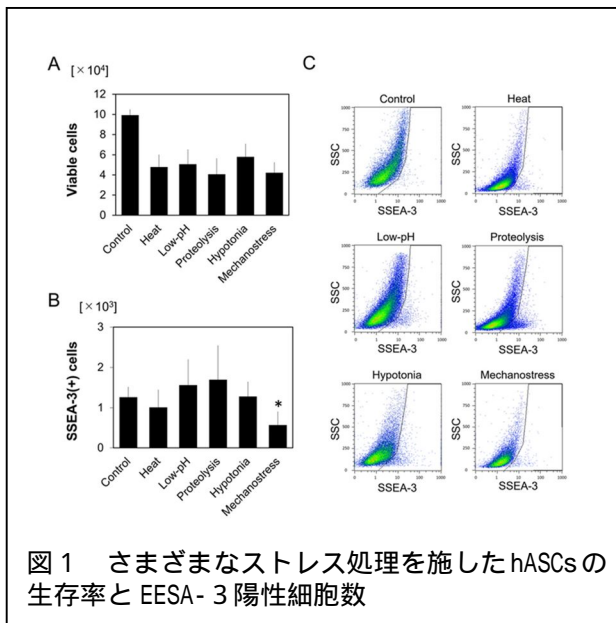


図 1 さまざまなストレス処理を施した hASCs の生存率と SSEA-3 陽性細胞数

(2) マイクロスフェアを使って浮遊培養と接着培養双方の環境を実現することで、hASCs に含まれている多能性をもつ細胞群を増殖させることができるか検討した。マイクロスフェアとしてポリスチレンビーズまたはコラーゲンビーズを使い、攪拌による微小重力下で培養を行った。細胞の数、攪拌の条件をさまざまに変えて、細胞の増殖を観察した。その結果、いずれのマイクロスフェアでも細胞の接着および増殖は培養 14 日目でポリスチレンディッシュおよびコラーゲンコートディッシュによる静置培養と同程度であった (図 2)。よって、攪拌による微小重力下でもマイクロスフェア上での細胞の接着と増殖には問題がないことがわかった。

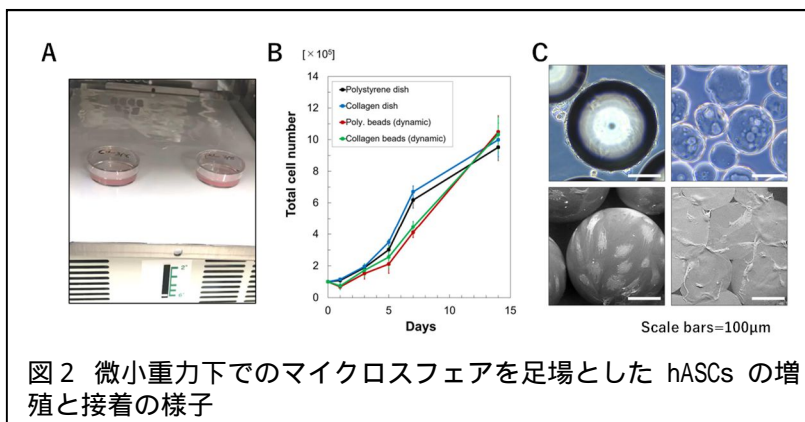


図 2 微小重力下でのマイクロスフェアを足場とした hASCs の増殖と接着の様子

(3) ポリスチレンディッシュ、コラーゲンコートディッシュ、ポリスチレンビーズ、コラーゲンビーズを使い、静置 (static) または攪拌 (dynamic) による hASCs の培養を行い、培養 7 日目に SSEA-3 陽性率をフローサイトメーターにより測定した。ポリスチレンビーズおよびコラーゲンビーズのいずれにおいても、ディッシュに比べて SSEA-3 陽性細胞率がそれぞれ 2.3 倍と 2.2 倍に増加し、さらに攪拌によりそれぞれ 2.7 倍と 2.9 倍に増加した (表 1)。攪拌による微小重力下で、未分化状態の高い hASCs を増やすことができることがわかった。

表 1 マイクロスフェアを用いた静置または攪拌培養による SSEA-3 陽性細胞率

	Cell Number	Cell Viability	SSEA-3 Positivity	SSEA-3(+) Cell Growth Rate
Polystyrene dish	$(5.9 \pm 0.7) \times 10^5$	$99.8 \pm 0.2\%$	$1.1 \pm 0.4\%$	5.1
Collagen dish	$(6.3 \pm 0.8) \times 10^5$	$99.9 \pm 0.1\%$	$1.0 \pm 0.5\%$	4.8
Polystyrene beads (static)	$(3.8 \pm 1.2) \times 10^5$	$81.3 \pm 7.7\%$	$2.5 \pm 0.9\%$	6.1
Collagen beads (static)	$(3.9 \pm 1.4) \times 10^5$	$89.0 \pm 9.2\%$	$2.4 \pm 1.1\%$	6.6
Polystyrene beads (dynamic)	$(3.8 \pm 1.6) \times 10^5$	$95.8 \pm 3.6\%$	$4.8 \pm 1.5\%$	14.0
Collagen beads (dynamic)	$(4.0 \pm 1.1) \times 10^5$	$98.9 \pm 1.0\%$	$4.7 \pm 1.4\%$	14.7

SSEA-3(+) cell growth rate = SSEA-3(+) cell number on day 7/day 0.

(4) 微小重力下でマイクロスフェア上に培養された hASCs の細胞集団における未分化 hASCs の存在を確認するため、他の多能性幹細胞マーカーの発現についても蛍光抗体免疫染色によって調べた。ポリスチレンビーズ上で培養された hASCs では OCT4 と SOX2 のシグナルが強く、コラーゲンビーズ上で培養された hASCs では NANOG と SSEA-3 のシグナルが強く検出された。一方、ポリスチレンディッシュとコラーゲンコートディッシュでは、いずれのシグナルも検出されないか弱かった(図4)。このことから、足場が細胞の未分化状態に影響を与えることが示唆された。

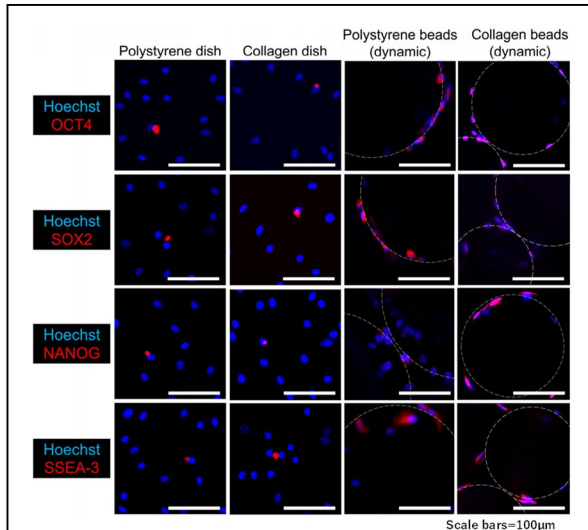


図4 培養7日目のhASCsにおける多能性幹細胞マーカーの蛍光抗体染色画像

(5) マイクロスフェアを使って静置または攪拌により培養された hASCs における多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。ポリスチレンディッシュで培養された hASCs における発現量を1としたときの各培養条件における OCT4、SOX2、NANOG、MYC、KLF4、CD34 の発現量の相対値を図4に示す。ポリスチレンビーズ上で培養された hASCs では、攪拌による培養で、静置培養よりも OCT4、SOX2、KLF4、CD34 が有意に発現上昇していた。一方、コラーゲンビーズ上で培養された hASCs では、SOX2、NANOG、MYC、KLF4、CD34 の発現が攪拌による培養で、静置培養よりも有意な発現上昇が認められた(図5)。

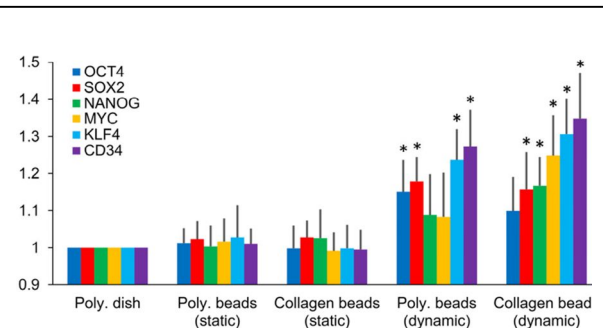


図5 培養7日目のhASCsにおける多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現

(6) マイクロスフェア上で攪拌により培養した hASCs のコロニー形成能を調べるため、ポリスチレンビーズまたはコラーゲンビーズを使って攪拌により培養した hASCs を1ウェルあたり100細胞で播種し、10日目にクリスタルバイオレット染色を行いコロニー数を計測した。その結果、ポリスチレンビーズおよびコラーゲンビーズのいずれにおいても、攪拌により培養した hASCs を播種した方で、ポリスチレンディッシュで静置培養した hASCs に比べて多くのコロニーを形成した(図6)。

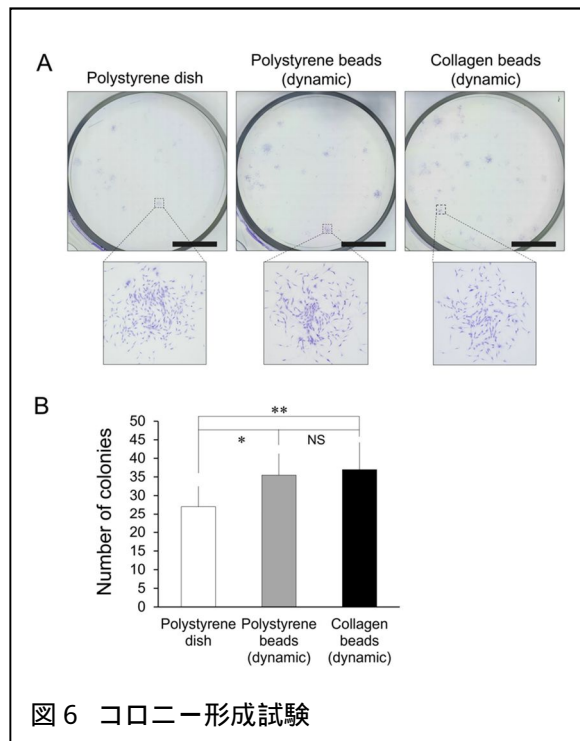


図6 コロニー形成試験

(7) ネットワークフォーメーションアッセイにより、マイクロスフェア上で培養した hASCs の管状構造形成能を調べた。ポリスチレンビーズおよびコラーゲンビーズ上で攪拌により培養した hASCs は、ポリスチレンディッシュで静置培養した hASCs に比べて、管状構造の形成が速く、複雑であった(図7)。



(8) マイクロスフェア上で培養した hASCs の分化能の程度を比較するため、脂肪生成能、骨形成能、軟骨形成能を調べた。いずれも、マイクロスフェア上で攪拌培養した hASCs において、高い脂肪生成能、骨形成能、軟骨形成能が認められた ( 図 8 )。

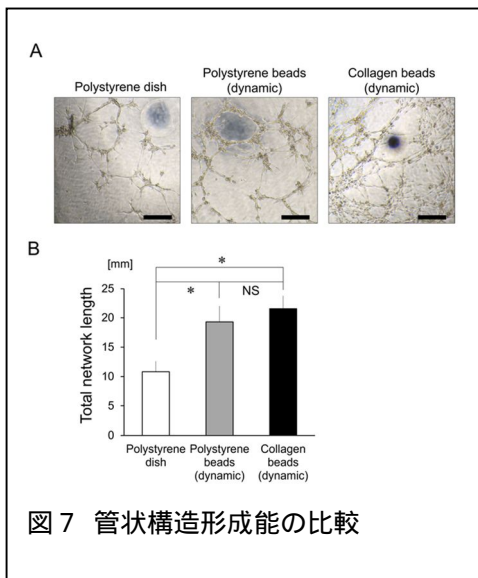


図 7 管状構造形成能の比較

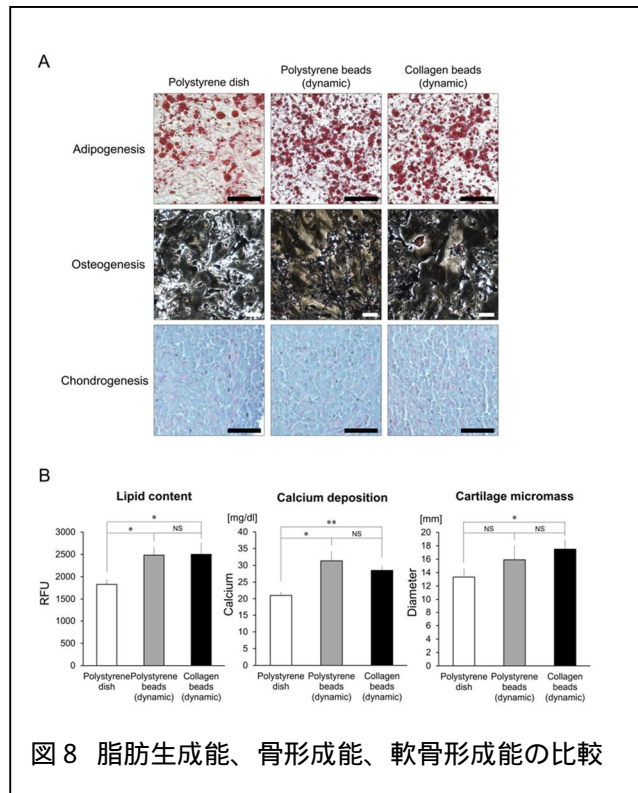


図 8 脂肪生成能、骨形成能、軟骨形成能の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mashiko Takanobu, Kanayama Koji, Saito Natsumi, Shirado Takako, Asahi Rintaro, Mori Masanori, Yoshimura Kotaro	4. 巻 10
2. 論文標題 Selective Proliferation of Highly Functional Adipose-Derived Stem Cells in Microgravity Culture with Stirred Microspheres	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 560 ~ 560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10030560	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
---------------------------	-----------------------	----

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