

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16018

研究課題名（和文）間葉系幹細胞の血管新生機構解明による細胞単離／濃縮技術の開発

研究課題名（英文）Development of cell isolation technology by elucidating the mechanism of angiogenesis of mesenchymal stem cells

研究代表者

渡邊 朋子（Watanabe, Tomoko）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：70827980

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）：本研究では高血管新生能MSCの分泌因子／転写因子ネットワークの解明、および細胞単離システムへの応用を目指した。近年MSCの虚血性疾患への治療効果が報告され、研究が進められている。しかしMSCは株ごとに血管新生能が異なるという課題がある。本研究では1)血管新生能評価系を用いた高血管新生能MSCの特定、2)網羅的解析による血管新生関連因子の特定、3)細胞分離システムへの応用、以上の課題に取り組んだ。本年度までに培養上清を用いた血管新生能評価系を構築し、プロテオーム解析により血管新生に関わるシグナル関連因子を特定することに成功した。現在は高血管新生能MSC単離技術の開発に向け、準備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は高血管新生能MSCの分泌因子／転写因子ネットワークを解明することである。具体的にはin vitro評価系を用いて血管新生能の高い細胞株を選出し、発現の高い因子をマイクロアレイ解析により選出する。転写因子群やシグナル関連因子を高血管新生能予測マーカーとして同定し、血管新生機能の検証を行う。当研究室の先行研究において、虚血状態の際にIGFやVEGFリガンドを介したPI3K/AKTシグナルが抑制されている可能性が示唆されていた。そこで高血管新生能予測マーカー候補とPI3K/AKTシグナル関連因子の関連について検証を進める。また過剰発現や機能欠損実験を行い、血管新生能への影響を検証する。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the secreted factor/transcription factor network of MSCs with high angiogenic potential and its application to cell isolation systems. Recently, therapeutic effects of MSCs on ischemic diseases have been reported, and research is underway. However, the angiogenic potential of MSCs varies from strain to strain. In this study, we addressed the following issues: 1) identification of MSCs with high angiogenic potential using an angiogenic potential evaluation system, 2) identification of angiogenesis-related factors by comprehensive analysis, and 3) application to cell separation systems. By the end of this fiscal year, we have established an evaluation system for angiogenic potential using culture supernatants and succeeded in identifying signaling-related factors involved in angiogenesis by proteome analysis. Currently, preparations are underway to develop a technology for the isolation of MSCs with high angiogenic potential.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 血管新生

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSC)は中胚葉性組織由来の体性幹細胞で、骨や軟骨、脂肪などの組織細胞への分化能に加え、**血管新生能や抗炎症作用も有し、虚血症疾患に対する細胞移植治療を目指した臨床研究が進められている**。MSCの血管新生能については、MSC自身が血管構成細胞に分化して血管新生を促進することや[1]、MSCが分泌するサイトカインやエキソソーム中の因子が骨格筋細胞や血管内皮細胞に刺激を与えることで血管新生が亢進されることが、ヒト血管内皮細胞やヒト肝癌由来細胞株を用いた研究で報告されている[2][3]。しかし、**どの因子が血管形成に必須な役割を担っているかについては結論が出ておらず、MSCの持つ血管新生能を評価する系すら存在しないのが現状である**。

当研究室の先行研究では通常培地に含まれる複数種のサイトカイン(因子X,Y)を欠失させることで、血管内皮細胞を用いた *in vitro* 血管新生能評価モデルを作製することに成功している。また培養上清が持つ血管新生能を検証可能な *in vitro* モデルも構築済みである。このモデルでは虚血状態からの血管構造の回復の過程を観察出来る。この系を利用して生体内で高い血管新生能を持つMSC株を簡便に選別し、その**MSCが発揮する血管新生能作用機序の詳細な解析が可能**であると考えた。

参考文献 [1] Akahane M et al., *J. Orthop. Sci.*, **7**, 677-82 (2002). [2] Kagiwada H et al., *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 184-9 (2008). [3] Yukawa H. et al., *Sci. Rep.*, **8**, 6765 (2018).

2. 研究の目的

本研究の目的は**高血管新生能MSC株で発現する分泌因子/転写因子群を特定**し、それらが協調的に働くネットワークを解明することである。さらにその知見を基に、**MSCの単離/濃縮法開発も可能**となると考えた。MSCの血管新生能を初期段階で評価する予測マーカーを網羅的に探索する点[特徴-1]、MSCが関わる血管新生の主要遺伝子および他の遺伝子との相互作用を解明する点[特徴-2]が研究の独自性として挙げられる。

【特徴-1: MSCの持つ血管新生能の予測マーカーの網羅的探索】

MSCは継代ごとに増殖/分化能が低下することが知られている。したがって継代数を重ねることなく**迅速にMSCの性質を評価する手法の開発**が必要であると考えた。まず *in vitro* モデルを用いて選出された血管新生能の高い/低い細胞株を比較し、高血管新生能細胞株で特異的に発現が上昇する因子をマイクロアレイ解析により選出する。さらに中期段階(5継代目)と比較して初期段階(3継代目)において発現が高い因子を選出し、早期の高血管新生能細胞株で発現上昇する遺伝子として選出する。またMSCの分化能は継代を重ねるごとに減少することが知られているため、継代数の多い細胞株で発現量が少ない遺伝子を選出する。最終的にこれらの条件に共通する一連の転写因子群やシグナル関連因子を**初期段階での高血管新生能予測マーカーとして同定**する。

【特徴-2: MSCが関与する血管新生の分子ネットワークの解明】

高血管能予測マーカーとして選出した因子について血管新生における役割の検証を行う。当研究室の先行研究において、因子欠失状態(虚血状態)の際にヒト血管内皮細胞HUVECにおいて発現が上昇/減少する因子がマイクロアレイ解析により選出されている。その結果、因子欠失状態ではIGFやVEGFリガンドを介したPI3K/AKTシグナルが抑制さ

れている可能性が示唆された。特に IGF リガンドや AKT シグナル因子の発現量は顕著に減少していた。これらの結果から **高血管新生能予測マーカーは PI3K/AKT シグナル関連因子の発現に関連している**と考え、今後検証を進める予定である。予測マーカーの機能を検証するために、MSC への遺伝子導入による過剰発現や目的遺伝子に対する siRNA を用いた遺伝子機能欠損を行い、血管新生能への影響の有無を検証するとともに、*in vitro* モデルへの過剰 / 機能阻害細胞投与の際の効果も検証する。**この *in vivo* での実験方法が確立されると MSC の有用な評価法を新たに構築できると考える。**

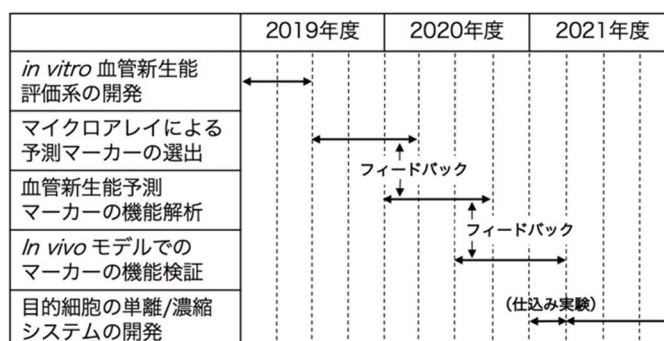
3 . 研究の方法

本研究で MSC が持つ血管新生能の新規評価系の開発と網羅的な血管新生能予測マーカーの探索を行い、**MSC による血管新生機構を解明**する。最終的には移植治療への応用を目的とした**非侵襲的な高血管新生能細胞の単離 / 濃縮システムを開発**する。

【2019 年度の計画】まず MSC の *in vitro* 血管新生能評価系の開発を行う。構築済の HUVEC を用いた評価系その他、成人微小血管内皮細胞株や大動脈内皮細胞株等の細胞株を用いた条件検討を行い、生体の状態に近い評価系を構築する。NIH angiogenesis analyzer ImageJ plug-in を用いて総チューブ長をピクセル単位のデータで得、客観的データ取得を行う。系の確立後は評価系を用いて様々な組織由来かつ複数ロットの MSC 株の血管新生能を評価する。**血管新生能が高い / 低いと評価された細胞株について DNA マイクロアレイを行い、特異的な発現変化のある転写因子 / 分泌因子群を特定**する。

【2020 年度の計画】昨年度の結果に基づき、サイトカインや増殖因子の発現量に関しては ELISA 法を用いて検証も行う。また特定された全ての候補遺伝子群について、MSC においてエレクトロポレーション法等を用いた機能獲得あるいは siRNA を用いて機能欠損させ、血管新生能の変化を検証する。最終的にはセルソーターを用いてマーカー発現細胞を単離 / 濃縮し、その細胞群を虚血モデルマウスに移植し、**生体内で平滑筋などの筋肉細胞や免疫細胞が存在する状態で効果を示すか否かを検証**する。

【2021 年度の計画】最終年度には高血管新生能 MSC を単離 / 濃縮するシステムを開発する。より**非侵襲的かつ生体移植可能な細胞濃縮法確立のために生物分解可能な磁気ビーズを用いて細胞の性質や安全性を担保した系の確立**を目指す。まず、細胞を 1 つ 1 つ単離し、目的抗原(高血管新生能マーカー)に対する磁気抗体を用いたセルソーティングを行い、目的遺伝子が発現している細胞のみを選出する。選出した細胞をプレートに播種し、増殖が十分に見られたウェルを選択し、凍結ストックの作製を行う。この**生体移植可能な高血管新生細胞のストックが作製されれば、虚血性疾患への治療法に対して非常に有用な手段となると考えられる。**

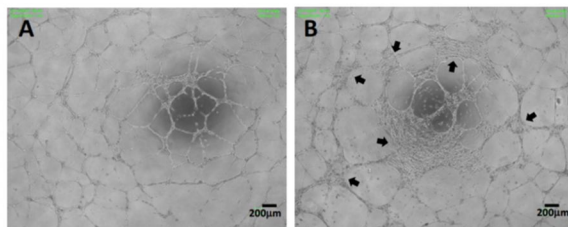


4 . 研究成果

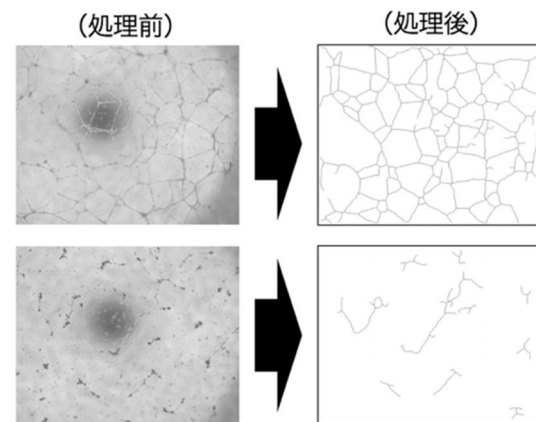
本年度までに以下について研究を行った。血管内皮細胞を用いて不完全な血管構造が構築される条件を見出し、**培養上清を添加した際の血管構造の回復度合いから、血管新生能を評価出来る *in vitro* 評価系を構築**した[成果 1]。この評価系では虚血状態からの血管構造の回復の過程を観察出来る。さらに血管新生能評価系を用いて 6 種類の血管新生能の異なる細胞株を取得し、プロテオーム解析を行い、タンパク質の発現プロファイルの比較解析を行った。その結果、高血管新生能を持つ細胞株で高発現するタンパク質、さらに血管新生能とタンパク質発現量の間には正の相関が見られるものの中から、**血管新生に寄与する因子として 2 種類のシグナル関連因子を新規に同定**した[成果 2]。

[成果 1] 培養上清の血管新生能を定量評価可能な *in vitro* 評価系の構築

まず当研究室で構築した**培養上清が持つ血管新生能を検証可能な *in vitro* 血管新生能評価モデルの定量化**を行った[図 1,2]。位相差画像から血管構造を線形化し、血管の全長、分岐ポイント数、網目構造の面積を定量化した。NIH angiogenesis analyzer ImageJ plug-in を用いて総チューブ長をピクセル単位で得、定量化を行い、血管新生能を評価するためのパラメーターを決定した。**構築した血管新生能評価系を用いて様々な組織由来および複数ロットの MSC 株の血管新生能を評価可能であることを確認**した。そこで血管新生能が高い/低いと評価された細胞株についてプロテオーム解析を行い、血管新生能を相関のある転写因子あるいは分泌因子群を特定することを目指した。



[図1] MSCの *in vitro* 血管新生能評価モデル
(A, B) 通常/因子欠失条件で培養したHUVECが形成した血管網。
矢印は正常な血管網形成が起こらなかった領域を示している。



[図 2] ImageJを用いた血管構造の線化図解析

[成果 2] 血管新生に関する新規シグナル関連因子の同定

6 種類の血管新生能の異なる MSC 株を取得し、プロテオーム解析により細胞株間のタンパク質の発現プロファイルの比較を行った。その結果、高血管新生能を持つ細胞株で高発現するタンパク質、あるいは血管新生能とタンパク質発現量の間には正の相関が見られるものの中から、**血管新生に寄与する因子として 2 種類のシグナル関連因子を同定することに成功**した。同定した**2 種類のシグナル関連因子のリコンビナントタンパク質を血管内皮細胞に添加したところ、顕著に血管新生が促進**される様子が見られた。次に siRNA を作製し、各因子のノックダウン実験を行ったところ、血管新生の度合いが顕著に減少することを確認した。2 因子の同時ノックダウン実験では血管新生がほとんど起こらなかった。これらの結果から 2 因子は MSC の培養上清の持つ血管新生機能に必須の因子であることが示唆された。現在は同定した新規血管新生関連因子を用いた MSC の単離 / 濃縮技術の開発に向け、準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------