

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21529

研究課題名（和文）幹細胞ニッチシグナルを利用した組織再生新戦略

研究課題名（英文）Tissue regeneration using the niche signal for stem cells

研究代表者

千葉 英樹（Chiba, Hideki）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00295346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：幹細胞が自身の細胞間接着分子Junctional adhesion molecule-C (JAM-C)の細胞外ドメインを切り出すことで、自らに利するニッチを作り出すことを見出した。またJAM-C可溶体 (sJAM-C)が組織間質に沈着し、脂肪由来幹細胞 (ADSCs)の細胞接着・増殖及び幹細胞性維持を促すことを明らかにした。さらに「9アミノ酸からなるsJAM-Cペプチド」がADSCsのニッチとして必要十分であることを突き止めた。またsJAM-CやsJAM-Cペプチドは皮膚全層欠損モデルにおける表皮及び皮膚付属器の再生を促進し、間葉系幹細胞マーカーの発現が顕著に誘導する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

熱傷・外傷・手術創や糖尿病等による重度の全層性皮膚欠損は難治性であり、瘢痕が残ることや皮膚付属器の再生が不十分なことが問題である。また軟骨損傷は再生しにくく、自家培養軟骨移植の適応疾患は限られている。一方脳神経は最も再生困難な組織の一つであり、例えば脳梗塞では生体内の神経幹細胞が遊走し新生ニューロンが出現するものの、その大部分は死滅することが知られている。sJAM-C及び同定したsJAM-Cペプチドは幹細胞ニッチとして機能し、新規幹細胞培養法や組織再生に有望である可能性が示された。また細胞接着分子は細胞外ドメインを切断することで、自らに利する幹細胞ニッチを作り出すという学術的意義を見出した。

研究成果の概要（英文）：We found that the extracellular domain of a cell adhesion molecule JAM-C (junctional adhesion molecule) is excised as a soluble form (sJAM-C) from stem cells to generate an adequate niche-like microenvironment, which is beneficial to their own maintenance. We also demonstrated that sJAM-C is deposited to the interstitial tissue and promotes cell adhesion, cell growth, and the expression of MSC (mesenchymal stem cell) markers in ADSCs (adpose-derived stromal/stem cells). In addition, the sJAM-C peptide consisting of 9 amino acids is enough to function as the niche for ADSCs. Furthermore, using a full-thickness skin injury model, we revealed that sJAM-C and the peptide accelerate regeneration of epidermis and skin appendages, as well as the expression of MSC markers.

研究分野：組織再生

キーワード：幹細胞 間葉系幹細胞 脂肪由来幹細胞 ニッチ 細胞接着 タイト結合 皮膚損傷

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞間接着分子 Junctional adhesion molecules (JAMs) の会合は造血幹細胞の集積や運命決定を司ることが報告されているが (Arcangeli et al., *Stem Cells*, 2013; Kobayashi et al., *Nature*, 2014)、他の幹細胞における JAMs の役割は全く分かっていなかった。我々は研究開始当初、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSC) のうち「採取や培養が容易で、再生医療の幹細胞ソースとして有望視されている脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells; ADSC)」を対象に、JAM ファミリーの機能を研究した。その結果、以下の未発表データを得た。

- 1) マウス培養 ADSC 及びその供給源である脂肪組織では、JAM-C の細胞外ドメインが切断される。
- 2) 切断された JAM-C (soluble JAM-C; sJAM-C) は細胞外基質として脂肪組織間質に沈着する。
- 3) sJAM-C が周囲微小環境 (ニッチ) として機能し、細胞膜上の JAM-B とヘテロフィリックに会合することで ADSC の接着能、増殖能及び幹細胞性を高める。
- 4) 脊椎動物間で保存された 9 アミノ酸からなる sJAM-C 部分ペプチドが ADSC のニッチとして必要十分である。

### 2. 研究の目的

上述した独自の未発表データを踏まえ、sJAM-C 及び sJAM-C 部分ペプチドが幹細胞のニッチとして機能するかを明らかにし、新規幹細胞培養法を確立しようと考えた。また sJAM-C 及びその部分ペプチドの生体に応用することで、組織幹細胞がニッチ領域に遊走・集積するホーミング能力を更に引き出し、革新的な組織再生戦略の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

RT-PCR 法、Western blot 法、蛍光免疫染色法にて、マウス ADSC における JAM ファミリーの発現プロファイルを検討した。

ADSC の供給源となるマウス脂肪組織 SVF (stromal vascular fraction) における JAM 分子発現と MSC マーカー発現の相関について、FACS 解析で評価した。

マウス脂肪組織における JAM-B/C の局在を二重蛍光免疫染色法で解析した。この際、血管内皮マーカーとして ZO-1 及び claudin-5、細胞外マトリックスマーカーとして type III collagen 及び heparan sulfate proteoglycan を用いた。

マウス ADSC の全細胞抽出液及び培養上清、マウス脂肪組織・脾組織の細胞抽出液をサンプルとして全長 JAM-C 及び sJAM-C を認識できる抗 JAM-C (N) 抗体を用いた Western blot 解析を行った。また抗 JAM-C (N) 抗体及び抗 JAM-C (C) 抗体を用いて、マウス脂肪組織の二重免疫染色を行った。

可溶性 JAM-B/C 細胞外ドメイン (sJAM-B/C) に相当するリコンビナントタンパク質 rJAM-B 及び rJAM-C またはマウス IgG (20/100/500 ng) でコートした 12 穴ディッシュ上でマウス ADSC を 48 時間培養し、細胞接着能、細胞増殖能 (BrdU アッセイ)、MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*, *Sca-1*) の遺伝子発現を調べた。

JAM-C 及び sJAM-C は JAM-C より強く JAM-B に結合することが報告されているため (Powell et al., *PLoS Biol*, 2011; Arcangeli et al., *FEBS Lett*, 2012)、マウス ADSC における sJAM-C と JAM-B の相互作用を免疫沈降法にて検証した。

ゲノム編集技術を用いてマウス ADSC における JAM-B の発現をノックダウンすることで、sJAM-C と JAM-B のヘテロフィリックの会合が ADSC の接着能及び幹細胞性に寄与するかを明らかにした。

9 アミノ酸からなる sJAM-C 部分ペプチド (JAM-C D1) が脊椎動物間で保存されていることを見出した。そこで 500 ng の type I collagen 及び rJAM-C または 100 ng の JAM-C D1 でコートした 12 穴ディッシュ上でマウス F9 細胞を 48 時間培養し、細胞接着アッセイを行った。

100 ng の JAM-C D1 ペプチド、JAM-C D1ΔN ペプチド (N 末 1 アミノ酸を欠損させた 8 アミノ酸)、JAM-C D1ΔC ペプチド (C 末 1 アミノ酸を欠損させた 8 アミノ酸) 及びランダムペプチドでコートした 12 穴ディッシュ上でマウス ADSC を 48 時間培養し、細胞増殖能 (BrdU アッセイ)、MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*, *Sca-1*) の遺伝子発現を検討した。

500 ng の rJAM-C またはヒト IgG でコートした 12 穴ディッシュ上でヒト ADSC を 72 時間培養し、MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*) の遺伝子発現を RT-qPCR 法で検討した。

100 ng の JAM-C D1 ペプチド、JAM-C D1ΔN ペプチド、JAM-C D1ΔC ペプチド及びランダムペプチドでコートした 12 穴ディッシュ上でヒト ADSC を 72 時間培養し、MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*) の遺伝子発現を RT-qPCR 法で評価した。

直径 6 mm のデルマパンチでラット背部の表皮・真皮・皮下組織全層を欠損させた後、創部を PBS、500 ng の rJAM-C またはラット IgG で毎日処置し、10/14/16 日目に皮膚組織をサンプリングした。ホルマリン固定パラフィン包埋標本についてヘマトキシリン - エオジン染色とエラスチカ - マッソン染色を施行し、組織像を観察した。また 10 日目の組織から RNA を採取し、MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*, *Sca-1*) の遺伝子発現を調べた。

上述したラット皮膚全層欠損モデルを用いて、皮膚組織再生における sJAM-C 部分ペプチドの有効性を検証した。創部を 100 ng の JAM-C D1 ペプチドまたはランダムペプチドで毎日処置し、10 日目に皮膚組織をサンプリングした。この検体における MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*, *Sca-1*) の遺伝子発現を評価した。

### 4. 研究成果

マウス ADSC では、*Jam-A*, *Jam-B*, *Jam-C*, *Car* 及び *Clmp* mRNA の発現が認められたが、*Jam-4*, *Jam-L*, *Esam* mRNA の発現はみられなかった。Western blot 解析では、JAM-B, JAM-C, CLMP タンパク質がマウス ADSC に発現していたが、CLMP の発現レベルは継代 8 代目で減弱していた。一方 JAM-A と CAR タンパク質の発現は検出できなかった。蛍光免疫染色法では、JAM-B 及び JAM-C シグナルがマウス ADSC の細胞表面に認められたが、CLMP は細胞表面には局在せず細胞質全体に広く分布していた。

FACS 解析では、JAM-B 及び JAM-C がマウス脂肪組織 SVF の約 30% に検出された。またマウス MSC マーカーのうち、CD44 と Sca-1 の発現が JAM-B 発現と関連し、CD105, CD140a 及び Sca-1 の発現が JAM-C 発現と関連していた。さらにマウス脂肪組織 SVF のうち Sca-1<sup>+</sup>/CD140a<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/Ter119<sup>-</sup> 細胞成分では、JAM-C 発現がほぼ 100% 認められた。従って JAM-C はマウス MSC の新規マーカーであることが示された。

マウス脂肪組織を免疫染色したところ、JAM-C は間質に広く分布していた。また JAM-C は血管内皮マーカーである ZO-1 及び claudin-5 と共局在するのみならず、血管周囲にびまん性の分布を示した。さらに JAM-C は、細胞外マトリックスマーカーである type III collagen 及び heparan sulfate proteoglycan と少なくとも一部共局在していた。

JAM ファミリー分子について、細胞外ドメインが切断され培地や血液中への放出されることが 3 つの研究グループによって報告されている(Koenen et al., *Blood*, 2009; Haarmann et al., *PLoS ONE*, 2010; Hourri et al., *PLoS ONE*, 2013)。そこで全長 JAM-C と sJAM-C の両方を認識できる抗 JAM-C (N)抗体を用いた Western blot 解析によって、マウス ADSC やマウス組織においても JAM-C の細胞外ドメインが切断されるかを評価した(図 1)。その結果、マウス ADSC の全細胞抽出液では全長 JAM-C、培養上清では sJAM-C が各々検出された。ゲノム編集技術で JAM-C 発現をノックダウンしたマウス ADSC では、これらのシグナルは著しく減弱していた。また sJAM-C はマウス脂肪組織・脾組織の細胞抽出液にも認められた。一方 sJAM-B シグナルはマウス ADSC の培養上清やマウス脂肪組織・脾組織には検出されなかった。さらに JAM-C (N)陽性シグナルはマウス脂肪組織間質に広く分布する一方、JAM-C (C)陽性シグナルは間質中の小型円形細胞の細胞質と細胞膜に局限していた(図 1)。これらの結果から、JAM-C の細胞外ドメインは *in vitro/vivo* で切断・放出され、細胞外基質として脂肪組織間質に沈着することが強く示唆された。

rJAM-C はマウス ADSC の細胞接着能を用量依存性に亢進した(図 2)。rJAM-B は最大容量 (500 ng)でのみマウス ADSC の接着能を高めたが、その効果は rJAM-C や type I collagen に比べて低かった。細胞増殖能は rJAM-C によって有意に高まったが、rJAM-B では有意な変化はみられなかった(図 2)。また rJAM-C はマウス ADSC における MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*, *Sca-1*) の遺伝子発現を顕著に亢進した。一方 rJAM-B は *Cd44* と *Cd105* の発現を軽度増加させるにとどまった(図 2)。

免疫沈降法によって、マウス ADSC 上の JAM-B が sJAM-C と複合体を形成することが示された。

JAM-B 発現をノックダウンさせたマウス ADSC では、sJAM-C による細胞接着能亢進及び MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*) の発現誘導が有意に阻害された(図 3)。

type I collagen, rJAM-C、及び 9 アミノ酸からなる sJAM-C 部分ペプチド(JAM-C D1)はマウス F9 細胞の細胞接着能を有意に亢進させた。

JAM-C D1 ペプチドはマウス ADSC の細胞増殖能を上昇させたが、JAM-C D1ΔN ペプチド、JAM-C D1ΔC ペプチド及びランダムペプチドは増殖能に影響を及ぼさなかった。また JAM-C D1 は、マウス ADSC における MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*, *Sca-1*) の遺伝子発現を有意に亢進させた。一方 JAM-C D1ΔN ペプチド及び JAM-C D1ΔC ペプチドによる MSC マーカーの発現誘導は全く認められなかった(図 4)。これらの結果は、脊椎動物間で保存された 9 アミノ酸からなる sJAM-C 部分ペプチドがマウス ADSC のニッチとして必要不可欠であることを示している。

rJAM-C はヒト ADSC における MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*) の遺伝子発現を顕著に誘導した(図 5)。

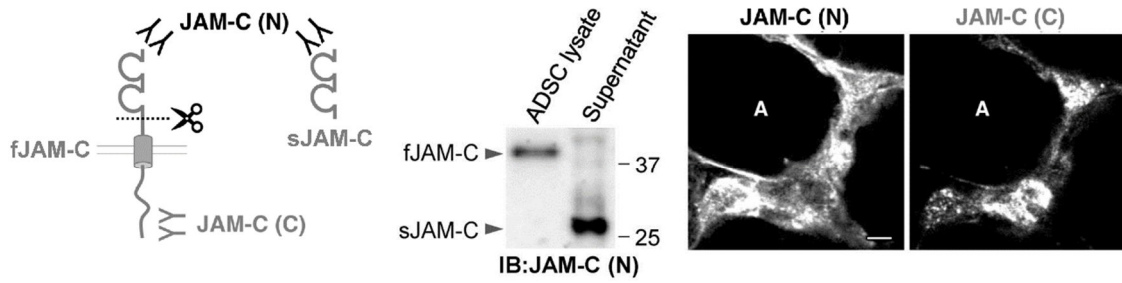
JAM-C D1 ペプチドは、ヒト ADSC における MSC マーカー (*Cd44*, *Cd105*, *Cd140a*, *Cd166*) の遺伝子発現を有意に亢進させた。一方 JAM-C D1ΔN ペプチド及び JAM-C D1ΔC ペプチドによる MSC マーカーの発現誘導は認められなかった。これらの結果から、sJAM-C 部分ペプチドがヒト ADSC のニッチとして有用であることが示された。

ラット皮膚全層欠損モデルの創部を rJAM-C で毎日処置すると、10/14/16 日目には表皮過形成や皮膚付属器の再生が促進され、癒痕領域が小さくなった。また rJAM-C 処置群では、MSC マーカー (*Cd105*, *Cd166*, *Sca-1*) の遺伝子発現が顕著に誘導された。

ラット皮膚全層欠損モデルの創部を JAM-C D1 ペプチドで毎日 10 日間処置すると、MSC マーカー (*Cd105*, *Cd166*, *Sca-1*) の遺伝子発現を有意に亢進した(図 6)。

本研究で得られた知見を基に培養効率を飛躍的に高めた幹細胞培養法が確立できれば、細胞医療への貢献は大きい。また sJAM-C 及びその部分ペプチドの生体応用は再生医療に全く新しい展開をもたらすことが強く期待される(図 7)。さらに本研究がさきがけとなり、「様々な組織幹細胞や胚性幹細胞および iPS 細胞さらにはがん幹細胞が、自身の細胞間接着分子の細胞外ドメインを切り出すことで、自らに利するニッチをつくり出す」というこれまでの概念が覆される可能性を秘めている。

図1. JAM-Cは可溶化され基質として脂肪組織間質に沈着している



中央: ウェスタンブロットにて可溶性sJAM-CがADSC培養上清にみられる。  
 右上: JAM-C (N)抗体とJAM-C (C)抗体によるマウス脂肪組織の免疫染色。全長のfJAM-Cが間質血管分画の構成細胞のみに陽性である一方、sJAM-Cは細胞周囲を含む広範囲に分布している。A, 成熟脂肪細胞; Bar, 20  $\mu$ m.

図2. 可溶性JAM-CはマウスADSCのニッチとして機能する

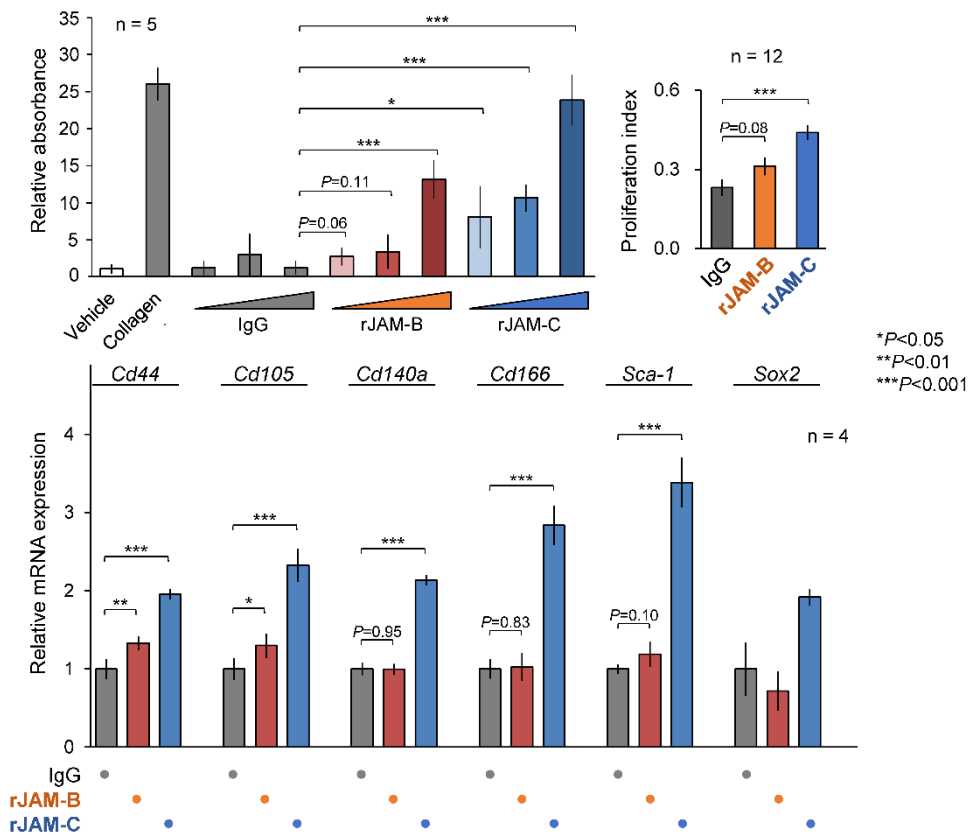


図3. 可溶性JAM-Cは細胞膜上のJAM-Bと会合することでADSCの幹細胞性を高める

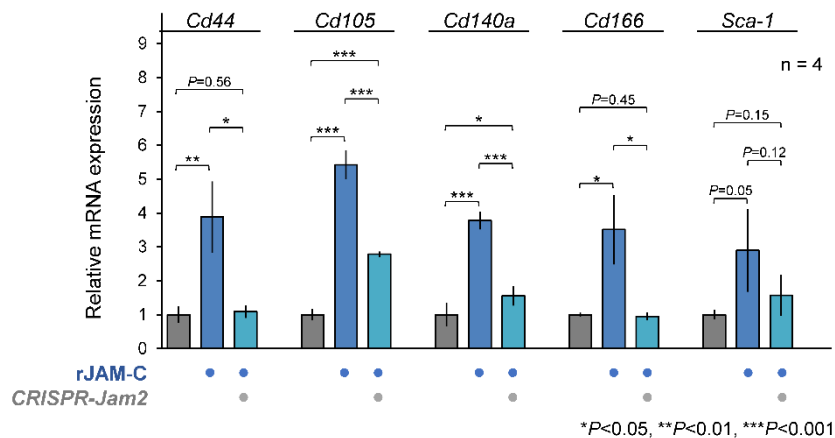


図4.9アミノ酸からなるJAM-CペプチドはマウスADSCのニッチとして必要不可欠である

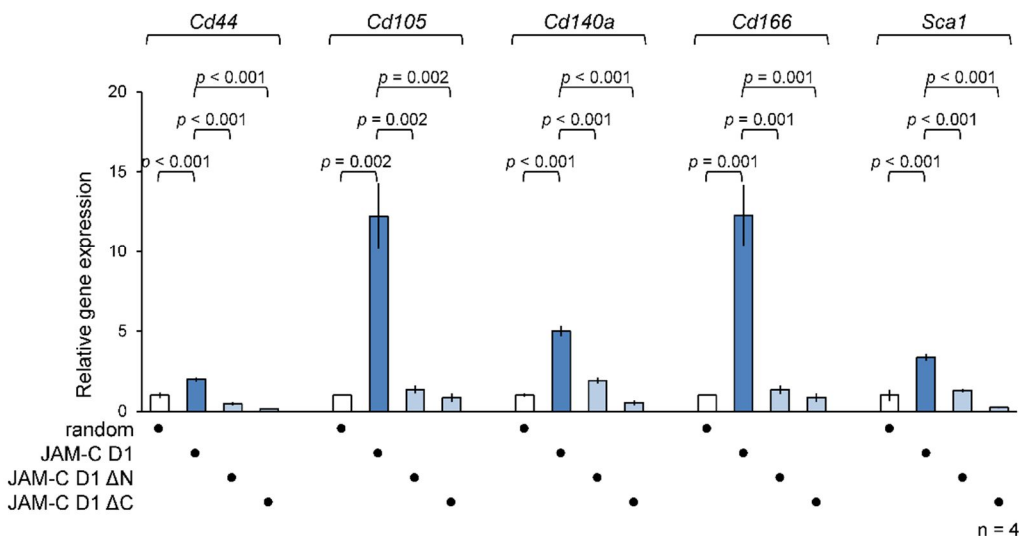


図5.可溶性JAM-CはヒトADSCの幹細胞性を高める

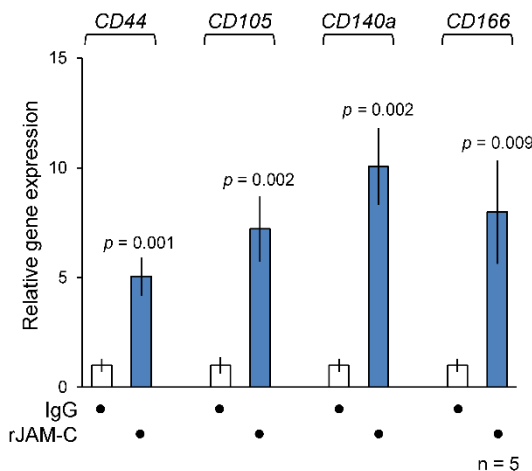


図7. 可能性JAM-Cは幹細胞ニッチとして機能する

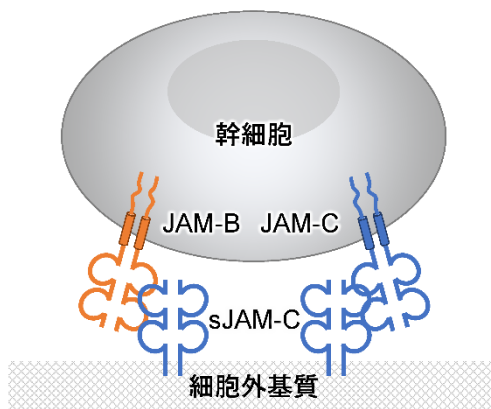
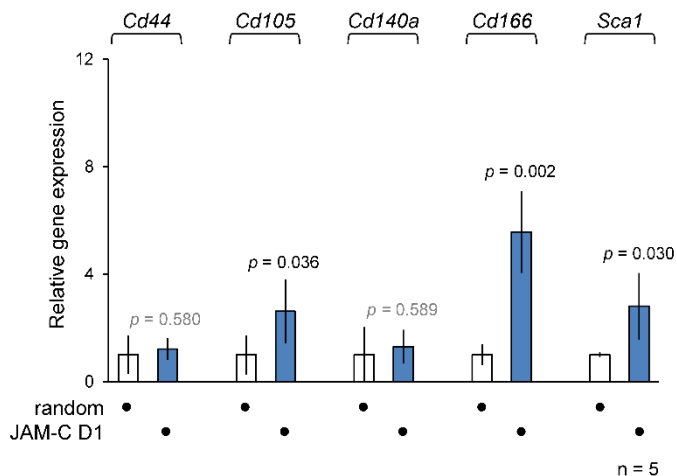


図6. 9アミノ酸からなるJAM-Cペプチドはラット皮膚全層欠損モデルにおけるMSCマーカーの発現を促進する



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 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞培養補助剤	発明者 千葉英樹、杉本幸太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、17/053900	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

公立大学法人 福島県立医科大学基礎病理学講座 <a href="https://www.fmu.ac.jp/home/p2/index.html">https://www.fmu.ac.jp/home/p2/index.html</a>
---

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	杉本 幸太郎  (Kotaro Sugimoto)  (40791009)	福島県立医科大学・医学部・講師    (21601)	

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