

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791755

研究課題名(和文)

内在性電場変化による間葉系幹細胞の In Vivo 遊走制御

研究課題名(英文)

Regulation of mesenchymal stem cells in vivo by endogenous electric fields

研究代表者

馬淵 洋 (MABUCHI YO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50424172

## 研究成果の概要(和文):

創傷治癒は多細胞生物の完全性維持に不可欠である。間葉系幹細胞はその多分化能から創傷治癒に関与していると考えられているが、ヒト間葉系幹細胞の in vivo での性状、組織修復能力に関わる解析は未だ行われていない。そこで申請者は、細胞表面抗原を標的としたスクリーニングにより、間葉系幹細胞をフローサイトメーターで純化する方法を開発した。ヒト間葉系幹細胞の移植が可能になり、損傷後の幹細胞遊走が in vivo で解析することができるようになった。申請者の開発した分離技術により、ピュアな幹細胞そのものを解析することができ、イメージング技術により幹細胞と創傷治癒のより深い理解を得ることが可能となるであろう。

## 研究成果の概要(英文):

Wound healing is essential for maintaining the integrity of multicellular organisms. It is thought that Mesenchymal Stem Cells (MSCs) were concerned with wound healing, however because MSCs have only been isolated from tissue in culture, the equivalent cells have not been identified in vivo. In this study, we performed a comprehensive screening of putative surface markers in order to select those that are most predictive of a pure MSC population in hBM. The transplant of the human MSCs enabled to analyze the migration of the human MSCs after the injury in vivo. Isolation technology of human MSC can analyze pure stem cell itself and elucidation of wound healing by an imaging technology.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒学

## 1. 研究開始当初の背景

創傷治癒は多細胞生物の完全性維持に不可欠であり、止血過程・炎症過程・増殖過程・再建過程を通して行われる (Moulin et al. *Eur J Cell Biol.* 1995, Gurtner et al. *Nature* 2008)。さらにそれらのイベントごと

に細胞や成長因子が複雑に関与しており、未だ解明していない部分が多く存在している。近年になって、電気的信号に応答した細胞移動や、電場による創傷治癒を導くシグナル伝達経路が明らかにされた (Zhao et al. *Nature* 2006)。これまでに研究されたすべての生物

種において、上皮層が損傷を受けると瞬時に内因性の電場が発生し、これが創傷治癒に重要であると提唱されている。また、人為的に内因性電場と同程度の電場を発生させることで、創傷治癒過程における細胞の移動方向を指示できることが示された。これらの結果は、治癒過程をより詳細に解析することができる事に加え、創傷治癒を模倣・促進させる可能性を秘めている。

間葉系幹細胞はその多分化能から創傷治癒に関与していると考えられているが、ヒト間葉系幹細胞の *in vivo* での性状、組織修復能力に関わる解析は未だ行われていない。ヒト間葉系幹細胞は、モデル動物に効率よく生着させることが免疫学的に困難であることが、*in vivo* での機能を解析する大きな障壁となっている (Kenneth et al *Nat Med* 2000)。生着率が低いことに加え、接着培養によって分離する方法をとっているため、関与していない細胞が含まれてしまい、実際に組織修復に関与している細胞集団を特定することができない。そのため、移植後の *in vivo* での動態や、損傷部位における遊走機構、またその分化能については不明瞭な点が多く残され、ヒト間葉系幹細胞の本質を知ることは困難である。そこで申請者は、細胞表面抗原を標的としたスクリーニングにより、間葉系幹細胞をフローサイトメーター (FACS) で純化する方法を開発した (Mabuchi et al *Inflammation and Regeneration* 2009)。

## 2. 研究の目的

本研究は、幹細胞治療法の確立を目標として、体内に存在する間葉系幹細胞の遊走制御を行うことを目的としている。近年、さまざまな組織において組織幹細胞が分離され、その細胞を用いた細胞移植治療が試みられている。この実現には、再生現象に関わる増殖能・分化能の高い幹細胞の生物医学的研究が

重要であり、さらには細胞に生体組織の再生を誘導する手法も不可欠である。本研究では、組織幹細胞の中でも分化能が高く、さまざまな分野で研究されている間葉系幹細胞を用いて、体内での遊走制御機構を解明し、早期に医療への応用を実現可能な技術を確立する。

## 3. 研究の方法

申請者が開発した間葉系幹細胞分離方法は、短時間でピュアな間葉系幹細胞を分離できるうえに、CD271・CD133 マーカーを指標にすることで、生体内での間葉系幹細胞を容易に観察できる画期的な方法である (特許出願済み)。また本課題では、ヒト組織の生着率が非常に高いことを特徴とする重度の免疫不全動物 NOD/SCID  $\beta$ 2m<sup>-/-</sup> (NOG) マウスを用いることによって、免疫学的生着効率の問題を解決できると考えている。このマウスへのヒト造血幹細胞の移植はすでに行われており、移植後6ヶ月でマウス体内の血液細胞の大部分がヒト由来の血球細胞に置き換わった報告がされている (Ishikawa et al *Blood* 2006)。さらに、移植細胞にレンチウイルスを用いて CBR (変異型ルシフェラーゼ遺伝子) を導入し (Okada et al *FASEB* 2005)、移植細胞に恒常的に発現させることにより、移植後、高感度 CCD カメラ (IVIS) によるバイオイメージングによって *in vivo* での細胞動態・生着部位を経時的かつ定量的に観察することが可能となる。ヒト間葉系幹細胞の移植が可能になり、損傷後のヒト間葉系幹細胞の遊走が *in vivo* で解析できれば、創傷治癒に対する間葉系幹細胞移植治療の確立へ大きく前進することになる。

本研究の具体的な手順としては、まず 21 年度において、ヒト骨髄細胞より間葉系幹細胞

胞を分離し機能を調べる。分離したヒト間葉系幹細胞を NOG マウスへ移植し、移植後の間葉系幹細胞の移植効率を経時的に観察する。ヒト間葉系幹細胞を移植した NOG マウスに後背部欠損創を作成し、損傷部に細胞が流入してくるかどうかを調べる。同時に、細胞が流入してこない場合も考え、分離した間葉系幹細胞を *in vitro* で電場をかけることで、遊走能を獲得するかどうかを調べ、損傷に加え電場変化を起こし、また G-CSF などのサイトカインで遊走の促進を行う。

### (1) 損傷部位の細胞・成長因子の解析

フローサイトメーターにて分離したヒト間葉系幹細胞を、NOG マウスの眼下静脈叢 (iv) より移植する。ヒト骨髄細胞を移植した NOG マウスに損傷 (後背部全層欠損層) を作成する。損傷を与えることで移植細胞が遊走する様子を、免疫組織染色にて組織学的に観察、またヒト細胞マーカーを指標に FACS を用いて定量化する。創傷部位への細胞の遊走が見られない場合、電場変化や G-CSF を初めとする細胞動員を誘導する成長因子を投与して遊走する条件を探索する。

上記の性質を明らかにした段階で、22 年度では、*in vivo* 実験を中心に、ヒト間葉系幹細胞移植マウスを用いて、創傷治癒に対して電場変化の与える影響や、細胞外マトリックスによる遊走制御を行う。また、細胞モニタリングシステムを応用し、間葉系幹細胞が創傷治癒に関わる様子を経時的に観察する。

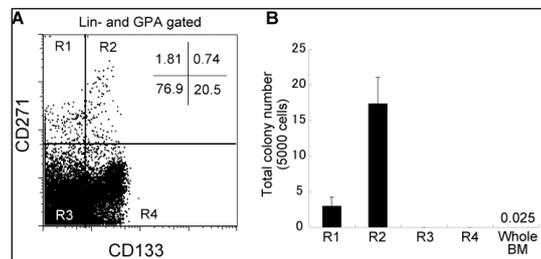
### (2) 間葉系幹細胞の電場変化による遊走能・遊走促進因子の探索

電場による間葉系幹細胞の遊走活性を *in vitro* にて調べる。さらに実験(1)の際に、局所および血中で変化する PDGF や、TGF- $\beta$ 、炎症系サイトカインを ELISA で定量し、変動

が見られた成長因子に対する間葉系幹細胞の遊走活性を *in vitro* にて調べる。また、前述の論文で明らかにされたシグナル伝達や電気走性応答 (PI3K や PTEN) に対するノックダウン、また遊走活性のあった成長因子に対する中和抗体を用いて、遊走現象が抑制されるかどうかを調べる。

### 4. 研究成果

はじめに、フローサイトメーターにて分離したヒト間葉系幹細胞を、NOG マウスの眼下静脈叢より移植し、その生着率・動態を調べた(図)。



### 図：間葉系幹細胞の予期的分離

骨髄細胞中の、成熟血球系細胞マーカー (Lin, GPA) 陰性・CD271 陽性・CD133 陽性分画に、コロニー形成能を持ち、間葉系 (骨・軟骨・脂肪) への多分化能を有する間葉系幹細胞が濃縮されていることが示された。

移植後 3 ヶ月では、NOG マウス中のヒト細胞の割合が 10-30% 確認された。一方、従来行われている培養による間葉系幹細胞の分離方法では、間葉系幹細胞は肺の静脈にトラップされてしまい、骨髄に homing する割合が極めて低かった。6 ヶ月後、NOG マウス骨髄中のヒト細胞の割合はさほど変化はなかったが、末梢血やその他の臓器における間葉系幹細胞の割合は低いことがわかった。続いて、生着したヒト間葉系幹細胞を末梢に動員させるようなアッセイ系の確立を行った。現在、レポーター遺伝子を組み込んだ間葉系幹細胞を用いて G-CSF などの投与を行い、体内での遊走機構の解明を行なっている。本研究により、*In vivo* での間葉系幹細胞の遊走、

動態を知る上でのデータの一つになったと考えられる。間葉系幹細胞は、ヘテロな集団で in vivo の動態解析は不可能であったが、申請者の開発した分離技術により、ピュアな幹細胞そのものを解析することができ、イメージング技術により幹細胞と創傷治癒のより深い理解を得ることが可能となる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1, " Purified mesenchymal stem cells are an efficient source for iPS cell induction. " Kunimichi Niibe, Yoshimi Kawamura, Daisuke Araki, Satoru Morikawa, Kyoko Miura, Sadafumi Suzuki, Shigeto Shimmura, Takehiko Sunabori, Yo Mabuchi, Yasuo Nagai, Taneaki Nakagawa, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki  
*Plos ONE*, 2011, 6(3): e17610  
( 査読あり )

2, Schwann Cell Plasticity After Spinal Cord Injury Shown by Neural Crest Lineage Tracing.  
Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Toyama Y, and Okano H  
*Glia* 2011 59(5): 771 -84.  
( 査読あり )

3, Mesp1+ early paraxial mesodermal cells supply initial bone marrow mesenchymal stem cells capable of differentiating into neural crest lineage cells.  
Niibe K, Morikawa S, Mabuchi Y, Araki D, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y  
*Inflammation and Regeneration*, 2011 31(1): 116 -124.  
( 査読あり )

4, Dynamics of Delayed P53 Mutations in Mice Given Whole-Body Irradiation at 8 Weeks  
RYUJI OKAZAKI, AKIRA OOTSUYAMA, HIROYO KAKIHARA, YO MABUCHI, YUMIMATSUZAKI, YUICHIMICHIKAWA, TAKASHI IMAI, AND TOSHIYUKI NORIMURA,  
*Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 2011 Jan 1;79(1):247 -54.  
( 査読あり )

5, The late effects of radiation on lifespan, lymphocyte proliferation and p53 haploinsufficiency in mice  
Ryuji Okazaki, Yo Mabuchi, Yasuhiro Yoshida, Sadafumi Suzuki, Ning Ding, Yumi Matsuzaki, Akira Ootsuyama & Toshiyuki Norimura  
*Int J Radiat Biol.* 2010 Nov;86(11):927 -34  
( 査読あり )

6, c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis  
T Shimizu, T Ishikawa, E Sugihara S Kuninaka, T Miyamoto, Y Mabuchi, Y Matsuzaki, T Tsunoda, F Miya, H Morioka, R Nakayama, E Kobayashi, Y Toyama, A Kawai, H Ichikawa, T Hasegawa, S Okada, T Ito, Y Ikeda, T Suda and H Saya  
*Oncogene*. 2010 Oct 21;29(42):5687 -99.  
( 査読あり )

〔学会発表〕(計3件)

1, 「Clonal isolation of human mesenchymal stem cells elucidates heterogeneity within the self-renewal and multi-potent stem cell compartment」  
Yumi Matsuzaki, Yo Mabuchi (発表者), Seiko Harada, Kunimichi Niibe, Hideyuki Okano  
第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会  
2010年12月9日・神戸(口頭・ポスター)

2, 「PROSPECTIVE CLONAL ISOLATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS ELUCIDATES HETEROGENEITY WITHIN THE MULTI-POTENT STEM CELL COMPARTMENT」  
Mabuchi, Yo (発表者), Morikawa, Satoru, Suzuki, Sadafumi, Lein, Lawrence, Niibe, Kunimichi, Nagai, Yasuo, Sunabori, Takehiko, Okano, Hideyuki, Matsuzaki, Yumi  
International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 8th ANNUAL MEETING  
June 16 -19, 2010, San Francisco

3, 「PROSPECTIVE CLONAL ISOLATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS ELUCIDATES HETEROGENEITY WITHIN THE MULTI-POTENT STEM CELL COMPARTMENT」  
Mabuchi, Yo (発表者), Morikawa, Satoru, Suzuki, Sadafumi, Lein, Lawrence, Niibe,

Kunimichi, Nagai, Yasuo, Sunabori,  
Takehiko, Okano, Hideyuki, Matsuzaki,  
Yumi

第8回幹細胞シンポジウム・2010年5月  
13-15日・淡路島

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okano-lab.com/ja/publication>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬淵 洋 (MABUCHI YO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50424172

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし