

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23618007

研究課題名(和文) 低分子化合物による幹細胞遊走の制御と再生医学への応用

研究課題名(英文) Control of stem cell migration by small chemical compounds and their application to regenerative medicine

研究代表者

前田 明人 (MAEDA, AKITO)

大阪大学・産学連携本部・特任教授

研究者番号：50298882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：先の研究で、間葉系幹細胞の遊走を活性化する低分子化合物を複数同定している。本研究では、同定した化合物の刺激による幹細胞遊走の特性を解析し、さらに動物組織内での化合物刺激による幹細胞の遊走活性と組織再生の効果を調べた。その結果、PL-17とPL-C1について、糖尿病マウスを使った皮膚創傷モデルにおいて組織再生を増強すること、そして皮膚創傷による幹細胞誘引モデルにおいて化合物塗布が皮膚創傷部へ幹細胞の集積を増強していることが示唆された。今後、これらの化合物を使ってさまざまな組織再生モデルへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have identified several small chemical compounds that activate the migration of mesenchymal stem cells. In present study, we analyzed the characteristics of stem cell migration by stimulation of the compounds. Furthermore, we examined the effect of migration activity and tissue regeneration of stem cells by compound stimulation in animal tissues. As a result, PL-C1 and PL-17 could enhance tissue regeneration in the skin wound model using diabetic mice, and could enhance the accumulation of stem cells with a compound applied in stem cell attraction model by skin wound. It is expected to be applied to a variety of tissue regeneration model using these compounds.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：再生医学・医療

キーワード：再生医学 シグナル伝達 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療において体性幹細胞を用いた細胞治療に関する研究が進展し、調製した細胞を生体へ移入する事が行われているが、細胞のホーミングについては体循環に依存しており、きわめて確率が低い。国内外で、細胞遊走に影響を与える液性因子やそれらのレセプターに関して遺伝子改変した動物モデルの解析、遺伝子導入した細胞を移入する事でホーミングを増強する研究が進められている。一方、低分子化合物を利用した幹細胞の研究については、ES細胞やiPS細胞の特定細胞種への分化誘導や幹細胞の増殖、iPS細胞のリプログラミングなどに関して世界的に研究され、活性のある低分子化合物が多数報告されている。今後、生体組織形成や細胞動態に関する方法論や知見が蓄積されるに従って、ホーミングやニッチ形成といった生物現象の増強や再構築に関して、低分子化合物による細胞運動の活性化を使った方法も有効な手段となる可能性がある。

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでに細胞遊走に関する研究成果を基に天然物ライブラリーの探索を行い、間葉系幹細胞の遊走を活性化する低分子化合物を発見した。そこで本研究では、それらの化合物刺激による細胞遊走の運動特性を解析し、さらに動物組織内での化合物刺激による幹細胞の遊走活性と、動物モデルにおける化合物刺激による組織再生の効果を調べることで再生医学へ応用するための研究基盤の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 骨髄細胞の誘引作用と化合物刺激による細胞活性化の解析

動物体内で化合物によって幹細胞誘引がされるのかを予備解析するために、GFP発現

骨髄細胞の骨髄移植モデルにて、GFPをトレーサーとして使って化合物の皮下注投与での誘引作用をマトリゲルプラグ法で調べた。その他の特徴として、化合物刺激による細胞応答と細胞内情報伝達系との関係付けのため、細胞内機能分子の活性化を確認した。細胞遊走に関連のある情報伝達系について、ウエスタンブロッティングや阻害剤を用いて、プロテインキナーゼなど細胞内機能タンパクのリン酸化や活性化状況を確認した。

(2) 化合物刺激による創傷治癒の解析

化合物による組織再生への影響を調べるため、創傷治癒速度が遅い糖尿病マウスを使って全層欠損創からの皮膚創傷モデルを作製し、創傷面への化合物の塗布による創面積の縮小変化についてコントロールとの比較計測を行った。また、組織再生の質的な検討として創部組織を血管新生や肉芽組織を血管マーカーやマツソントリクローム法による組織染色で評価した。

(3) 化合物刺激による幹細胞誘引作用の解析

動物体内の血流から化合物によって幹細胞誘引がされるのかを検証するために、皮膚創傷を作った後にルシフェラーゼ発現間葉系幹細胞を移入した幹細胞誘引モデルマウスを作製した。マウスの創傷面へ化合物を含ませた基質スポンジをコートし、数日後に幹細胞のルシフェラーゼ発光をトレーサーとして使って化合物による幹細胞の誘引作用を調べた。

4. 研究成果

(1) 化合物刺激による細胞誘引作用と細胞遊走特性

研究代表者らは、間葉系幹細胞の細胞遊走を亢進させる化合物を見つけるために、天然

物ライブラリーからボイデンチャンバー法を用いて探索を行い、間葉系幹細胞の遊走を活性化する低分子化合物 PL-17、PL-70、PL-C1、PL-G9 を同定した。予備試験として、動物体内で幹細胞を誘引するのか GFP 発現骨髄細胞の骨髄移植モデルマウスにて、化合物を含んだマトリゲルプラグを皮下に埋め込み、GFP 発現細胞をトレーサーとして使って誘引作用を調べたところ、PL-17、PL-70 と PL-C1 がコントロールと比べて誘引作用が認められた。続いて、PL-17 と PL-C1 刺激による細胞遊走に関連するシグナル伝達系について、細胞内機能分子の活性化状況を調べたところ、細胞内タンパクのリン酸化が起きていた。キナーゼ阻害剤によって細胞遊走も抑制されるので、PL-17 と PL-C1 は特定のプロテインキナーゼの活性化を起こすことで細胞遊走を活性化する可能性が考えられた。また、PL-70 刺激による細胞遊走に関連するシグナル伝達系について、ウエスタンブロッティング法を用いて細胞内機能分子の活性化状況を調べたが、典型的な機能分子は影響を受けていなかった。さらに化合物刺激した細胞を固定して、細胞染色像で細胞骨格の状況を調べたところ、細胞内アクチン骨格変化に作用する可能性が示唆された。以上の結果より、PL-17、PL-70 と PL-C1 について細胞遊走に関与している細胞内機能タンパクと相互作用していることが示唆された。

(2) 化合物刺激による組織再生の解析

次に化合物刺激による組織再生への影響を評価するため、動物モデルを使って化合物の創傷治癒効果を調べた。遺伝性糖尿病マウスを使って背中に全層欠損創（径 1.5cm）を持つ皮膚創傷モデルを作製し、創部に毒性の無い濃度範囲で化合物を塗布し、治癒過程での創面積の縮小変化を評価したところ、

PL-17 について、有意に治癒増強効果が認められた（図 1）。

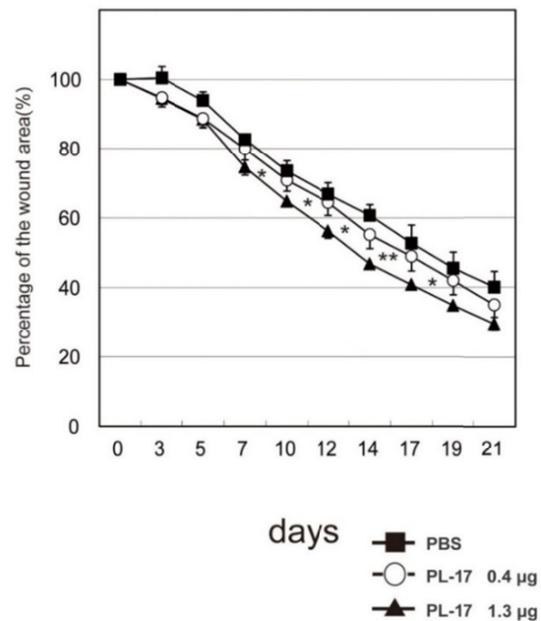


図1. 創傷縮小変化の評価

また、創傷治癒過程 10 日目の創部組織の組織再生を血管新生や肉芽組織形成について血管マーカー（ α -SMA）やマツソントリクローム法による組織染色を行った結果、創傷部の血管数の増加と肉芽組織量の増加が観察された（図 2）。創傷治癒の初期に間葉系幹細胞の遊走が起こり皮膚細胞が活性化するようなサイトカインの産生することや、間葉系幹細胞が創縮小、血管新生や肉芽肥厚に関わることが幾つかの研究でも報告されている。これらのことから、PL-17 は、間葉系幹細胞の動員を活性化することで血管新生や肉芽組織形成の増強を誘起している可能性が考えられた。さらに、PL-C1 についても同様の創傷治癒効果が見られたが、PL-70 には創傷治癒効果がなかった。

(3) 動物組織内での化合物刺激による幹細胞遊走活性の解析

化合物による細胞遊走活性の解析を基にして、PL-17 について間葉系幹細胞誘引作用について、血流から化合物によって幹細胞誘引がされるのかを検証した。

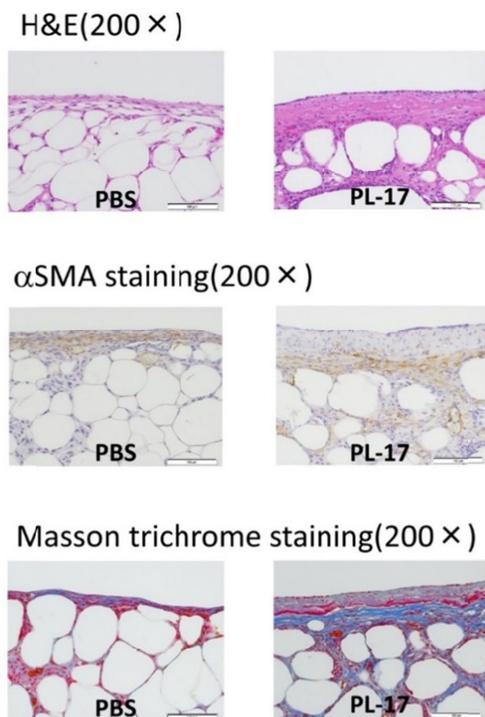


図2. 化合物塗布10日目の創傷部切片標本

そこで、ホタルルシフェラーゼを発現させた間葉系幹細胞を、背中に皮膚創傷を作製したヌードマウスに尾静注し、創部へ化合物塗布した時の幹細胞誘引作用を調べた。幹細胞誘引モデルは、2日後と6日後にルシフェリンを注入し、IVIS イメージ検出器で生物発光を観察したところ、化合物塗布した創傷部で幹細胞の集積増強が認められた(図3)。PL-C1 についても同様に創傷部へ幹細胞を集積増強する活性があった。

以上の結果より、PL-17 と PL-C1 について動物体内で組織再生を増強すること、そして組織再生過程で間葉系幹細胞誘引に作用する可能性があることが示唆された。今後、これらの化合物を使って様々な組織再生モデ

ルへの応用が考えられる。

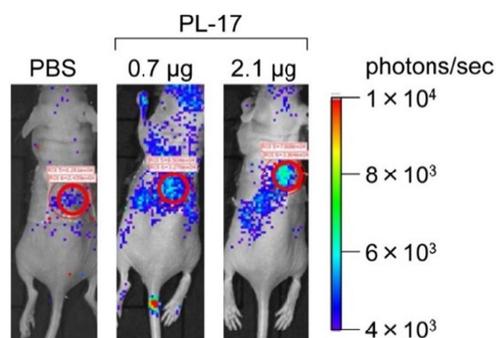


図3. ルシフェラーゼ発光による幹細胞集積の検出(細胞移植6日後)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Furumoto T, Ozawa N, Inami Y, Toyoshima M, Fujita K, Zaiki K, Sahara S, Akita M, Kitamura K, Nakaoji K, Hamada K, Tamai K, Kaneda Y, Maeda A.

Mallotus philippinensis dervier components enhance the mobilization of mesenchymal stem cells for skin regeneration.

Phytomedicine. 21(3), 247-253, 2014.

Hayashi H, Nakagami H, Takeichi M, Shimamura M, Koibuchi N, Oiki E, Sato N, Koriyama H, Mori M, Gerardo Araujo R, Maeda A, Morishita R, Tamai K, Kaneda Y

HIG1, a novel regulator of mitochondrial γ -secretase, maintains normal mitochondrial function. The FASE Journal. 26(6), 2306-2317, 2012.

Nakagami H, Nishikawa T, Tamura N, Maeda A, Hibino H, Mochizuki M, Shimosato T, Moriya T, Morishita R, Tamai K, Tomono K, Kaneda Y.

Modification of a novel angiogenic peptide,

AG30, for the development of novel therapeutic agents. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 16(7), 1629-1639, 2012.

〔学会発表〕(計3件)

古元義、藤田浩祐、稲見雄太、豊島美咲、仲尾次浩一、濱田和彦、竹仲有希子、棚橋孝雄、前田明人、クスノハガシワ含有成分による間葉系幹細胞の動員と皮膚創傷治癒の促進、第134回日本薬学会年会、2014年3月28日、熊本市総合体育館

古元義、藤田浩祐、豊島美咲、財木香里、佐原俊矢、秋田茉莉子、小澤範恭、仲尾次浩一、濱田和彦、前田明人、クスノハガシワ含有成分による間葉系幹細胞の集積と皮膚創傷の修復、第13回日本再生医療学会年会、2014年3月4日、国立京都国際会館

Furumoto T, Fujita K, Toyoshima M, Zaiki K, Sahara S, Akita M, Ozawa N, Nakaoji K, Hamada K, Tamai K, Kaneda Y, Maeda A, Mallotus philippinensis derived components enhance the mobilization of mesenchymal stem cells for skin regeneration. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸国際展示場

古元義、稲見雄太、豊島美咲、財木香里、藤田浩祐、小澤範恭、仲尾次浩二、濱田和彦、前田明人、クスノハガシワ含有成分による間葉系幹細胞の動員と皮膚創傷治癒の促進、第12回日本再生医療学会年会、2013年3月21日、パシフィコ横浜

Furumoto T, Inami Y, Toyoshima M, Zaiki K, Fujita K, Ozawa N, Nakaoji K, Hamada K, Maeda A, Ingredient in Mallotus extract enhances the motility of mesenchymal stem cells to regenerate injured skin, 第35回日本分子生物学会年会、

2012年12月14日、福岡国際会議場

Kanda A, Furumoto T, Kanematu Y, Maeda A, Enhancement of the chemotactic activity of mesenchymal stem cells by components in Oenothera, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月14日、福岡国際会議場

〔産業財産権〕
出願状況(計2件)

名称：抗老化剤、抗老化用飲食品及び抗老化方法
発明者：前田 明人・その他
権利者：大阪大学・ピアス株式会社
種類：特許、特願
番号：2014-021608
出願年月日：2014年02月06日
国内外の別：国内

名称：間葉系幹細胞を皮膚組織へ誘導する皮膚外用剤
発明者：前田 明人・その他
権利者：大阪大学・ピアス株式会社
種類：特許
番号：2012-139442
取得年月日：2012年06月21日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://pias-cr.casi.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 明人 (MAEDA AKITO)
大阪大学・産学連携本部・特任教授
研究者番号：50298882

(2) 研究分担者 該当者なし

(3) 連携研究者

古元 義 (FURUMOTO TADASHI)
大阪大学・産学連携本部・特任助教授
研究者番号：70594117