

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792058

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞の生体内における局在・動態・生理学的機能の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the phenotype and localization of murine mesenchymal stem cells in vivo

研究代表者

河村 佳見 (KAWAMURA YOSHIMI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20505044

研究成果の概要（和文）：

間葉系幹細胞（MSCs）は主に骨髄に存在し、*in vitro* において脂肪・軟骨・骨など間質細胞への分化能（多能性）と自己複製能を持つことが解析されてきたが、*in vivo* での局在、表現型や発生学的起源は不明なままである。本研究では、近年我々が見出した Sca-1 および PDGFR α 表面抗原の発現を指標に胎生期 MSCs を解析し、Sca-1 の発現パターンが胎生（E）14.5-16.5 日目から変化することを見出した。さらに細胞系譜を追跡するために Sca-1 遺伝子座に CreERT2 2A KO α を knock in した ES 細胞を作製し、germline キメラマウスを得た。

研究成果の概要（英文）：

Because MSCs are defined as cells that undergo sustained *in vitro* growth and can give rise to multiple mesenchymal lineages, the equivalent cells have not been identified *in vivo* and little is known about their physiological roles, developmental origins or even their exact tissue location. In this study, to elucidate developmental localization of MSCs, we analyzed embryonic MSCs by using expressions of Sca-1 and PDGFR α . As results, MSCs changed Sca-1 expression at E14.5-16.5. Next, to investigate cell lineage, we generated Sca-1 CreERT2 2A KO α knock in ES cell line and we obtained germline chimeras.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

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：再生医学、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄中には造血幹細胞に加え、間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells: MSCs）が存在しており、脂肪・軟骨・骨など間質細胞への分化能を持つことが知られている。MSCs は上記に述べた間質細胞のみならず、培養条件によっては神経・骨格筋・心筋など、間質以外の細胞への分化能も示すことから、近年、これらの組織の難治性疾患に対する細胞移植療法のための魅力的な細胞ソースとして注目され、臨床応用を目指した研究が国内外で盛んに行われている。しかしながら、一般

的に用いられている MSC の分離法は、骨髄細胞を培養皿上で培養後、付着増殖した細胞をもって MSCs とみなすとされており、造血幹細胞研究で長く行われてきたような細胞表面抗原解析が進んでおらず、有効な抗原マーカーが知られていなかった。実際に、この方法で得られた細胞集団は、MSCs・前駆細胞・血液細胞等が混在した雑多な集団にすぎないため、このような細胞集団を用いての性状解析で得られた結果は、MSCs そのものの性状とは言い難く、様々に矛盾する結果が得られている。また骨髄内での挙動や局在など

in vivo の動態を詳細に解析することも不可能である。このような理由から、安全で効率的な臨床応用のために必須である MSCs についての基礎的な研究はほとんど進んでいないのが現状であった。

2. 研究の目的

近年我々は、特異抗原を指標にフローサイトメトリーを用いて、MSCs を培養を経ずに直接分離する方法を確立した。本研究では、これを用いてレポーターマウスを作製することにより、MSCs の生体内における局在と動態、生理学的性質及び役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胎生期 MSCs の性状解析 (図1)

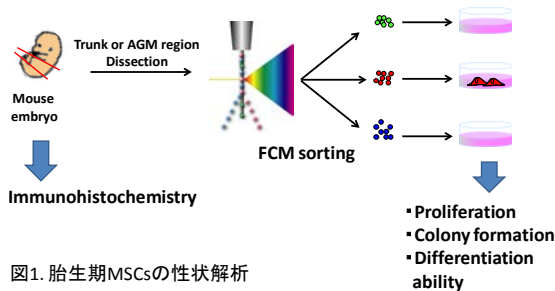


図1. 胎生期MSCsの性状解析

Sca-1 および PDGFR α が成体だけではなく胎生期の MSCs のマーカーとしても機能するかを解析するために、発生段階ごとに Sca-1 および PDGFR α 共陽性、PDGFR α 陰性、PDGFR α 単独陽性細胞を FACS にて分離し、それらの線維芽細胞様コロニー形成能を播種細胞 1000 個中のコロニー形成数で比較した (CFU-F assay)。また、骨・脂肪への分化能を解析した。

(2) 胎生期 MSCs の局在解析

Sca-1 および PDGFR α 共陽性細胞がマウス胎児のどこに局在しているかを新鮮凍結切片の免疫染色にて解析した。

(3) Sca-1 KI ES 細胞の作製

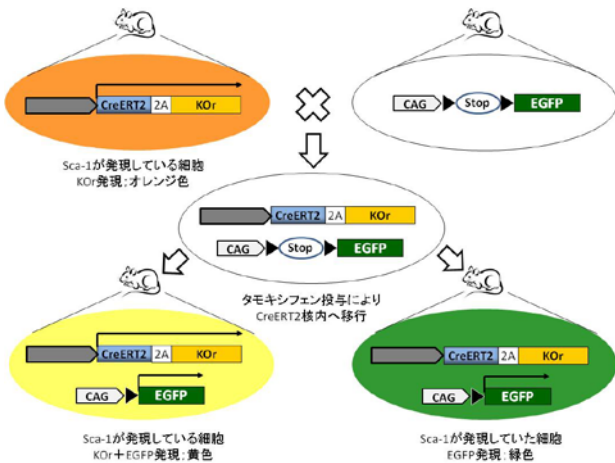


図2. Cre-loxpを利用した細胞標識システム

Sca-1 遺伝子座を含む BAC を購入し、大腸菌内で相同組換えを起こすことにより、Sca-1 の開始コドン直下にタモキシフェン誘導性 CreERT2、口蹄疫ウイルス 2A 遺伝子由来の自己開裂ペプチド (2A)、オレンジ色蛍光タンパク Kusabira-Orange (KOr) および Neo カセットを挿入した (図 2)。この組換え BAC から必要領域をリトリービングし、ターゲティングベクターとした。NotI にて線状化後、v6.5 (strain: C57BL/6 x 129/SV) ES 細胞にエレクトロポレーションし、G418 で選抜、生じたコロニーを pick up 後サザンブロットティングで相同組換え体を得た。

(4) Sca-1 KI マウスの作製

得られた相同組換え体を ICR 胚盤胞にインジェクションし、偽妊娠マウスに胚移植して産仔を得た。得られた雄キメラマウスを C57BL/6 雌と交配し、F1 産仔を得た。

4. 研究成果

(1) 胎生期 MSCs の性状解析

MSC 活性 (線維芽細胞様の形態、高い増殖能、骨・軟骨・脂肪への分化能) を示す細胞が初めて現れるのは E11.5 の AGM 領域であるという報告 (Mendes et al., Development, 2005) および胎生初期の MSCs は神経堤由来で成体骨髄へはあまり寄与せず、E14.5 付近から神経堤由来以外の MSCs が生じるという報告 (Takashima et al., Cell, 2007) から、E11.5-E17.5 のマウス胎児を解析した (図 3A)。各分画の CFU-F assay を行った結果 (図 3B)、E11.5 由来細胞はどの分画からも増殖しなかった。共陽性画分は E14.5 まではコロニー形成数が少ないが、E16.5 で急激に増加した。PDGFR α 陽性/Sca-1 陰性画分は E13.5 以降からコロニーを形成した。PDGFR α 陰性画分は E14.5 でコロニー数が最大であったが、それ以降は減少した。

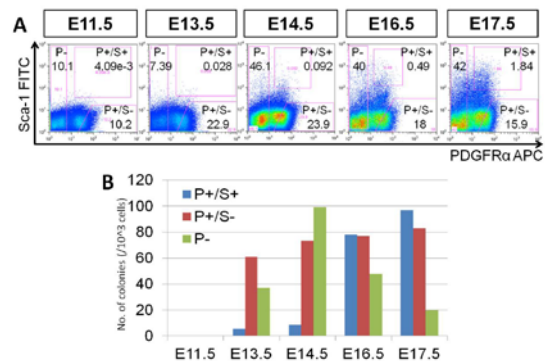
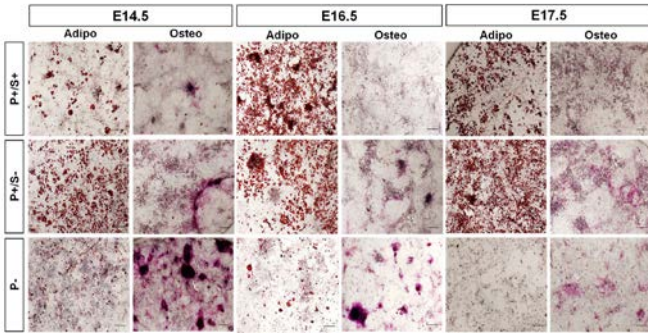


図3. 各分画の割合とコロニー形成能

これらの分画の分化能を解析した結果、共陽性画分は E16.5 から脂肪・骨への分化能を持っていた。PDGFR α 陽性/Sca-1 陰性画分は E14.5-E17.5 でどちらにも分化した。PDGFR

α 陰性画分は脂肪へは分化せず、骨のみへ分化した (図 4)。

図4. 各分画の骨・脂肪分化能



胎生期では共陽性画分は E16.5 から MSCs としての特徴を持つことが分かった。

(2)胎生期 MSCs の局在解析

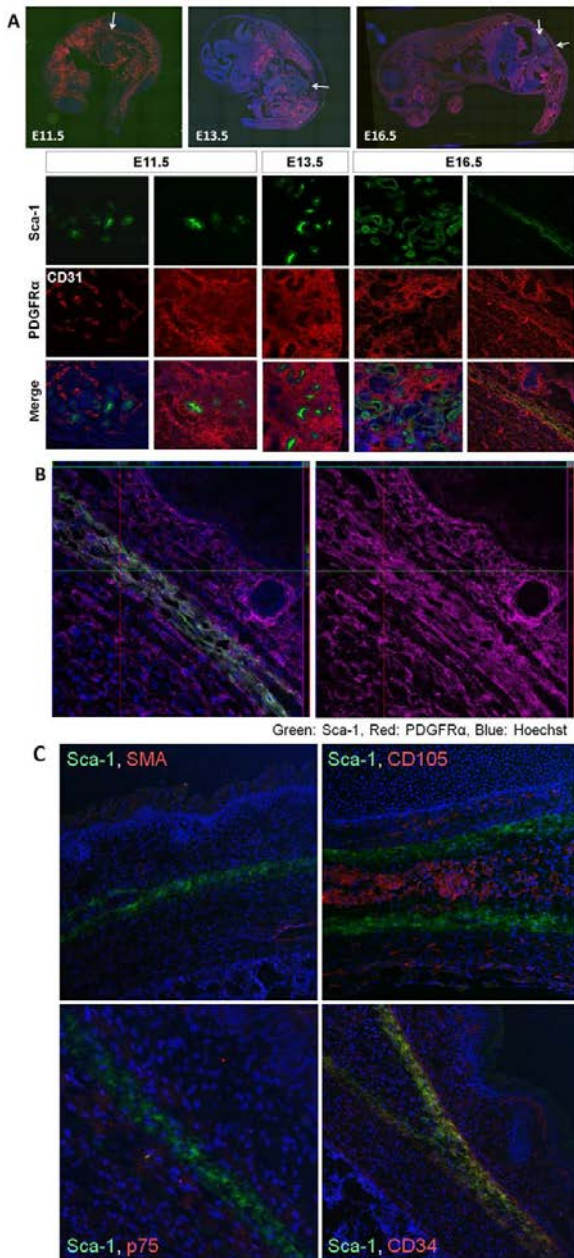


図5. 各ageにおける共陽性細胞の局在

次に共陽性細胞がマウス胎児の生体内でどこに局在しているかを調べるために、免疫染色を行った (図 5A、赤 : PDGFR α 、E11.5 では CD31 も赤で染色、緑 : Sca-1)。その結果、E11.5、E13.5 では AGM 領域付近で共局在していなかったが、E16.5 では体壁に共陽性細胞からなる層が存在した (図 5B)。これが MSC 活性を持っていると考えられる。E16.5 で見られた共陽性細胞の層は造血幹細胞で発現している CD34 と共局在した (図 5C)。以前の報告では CD34 陽性、Sca-1 陽性の細胞は脂肪分化能がある胎児筋肉細胞とされていた (Dupas et al., Stem Cell Res., 2011)。これが胎児期の MSCs の可能性がある。

(3)Sca-1 KI ES 細胞の作製

E16.5 で出現する PDGFR α /Sca-1 共陽性の層が成体骨髄の細胞供給源であるかを解析するために、Sca-1 CreERT2 2A KO or KI ES 細胞を樹立した。132 クローン中 1 つの相同組換え体を得た (図 6)。

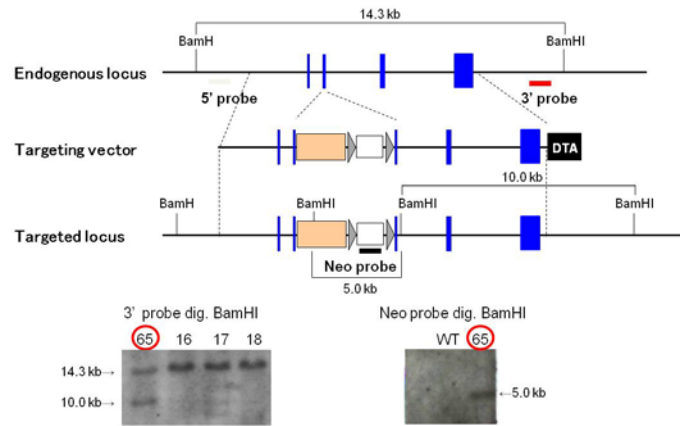


図6. Sca-1 KI ES の樹立

(4)Sca-1 KI マウスの作製

ICR 胚盤胞に ES 細胞をインジェクションし、2 匹の雄キメラマウスを得た。C57BL/6 雌と交配し F1 産仔を得た。毛色により、germline transmission が起こっている可能性が考えられた (図 7)。現在組換えマウスを判定中である。



図7. Sca-1 KIキメラF1産仔

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 2 件)

1) Araki D, Kawamura Y (equally contributed), Niibe K, Suzuki S, Morikawa S, Mabuchi Y, Nakagawa T, Okano H, and Matsuzaki Y

Primary evaluation of induced pluripotent stem cells using flow cytometry
Inflammation and Regeneration, Vol.33
No.1 003-012 (2013) 査読有

2) Imamura M, Okuno H, Tomioka I, Kawamura Y, Lin ZY, Nakajima R, Akamatsu W, Okano HJ, Matsuzaki Y, Sasaki E, Okano H.

Derivation of induced pluripotent stem cells by retroviral gene transduction in Mammalian species.
Methods Mol Biol., 925:21-48 (2012)
doi: 10.1007/978-1-62703-011-3_2.
査読有

[学会発表] (計 1 件)

河村佳見、河西智子、鈴木禎史、岡野栄之、松崎有未：マウス胎生期における間葉系幹細胞の挙動、第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 12 日*会期：2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日 (福岡)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 佳見 (KAWAMURA YOSHIMI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20505044