

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390451

研究課題名(和文)造血系から間葉系に流れるステムネス・シグナルの同定と再生医療への応用

研究課題名(英文) Identification of stem-ness signal in mesenchymal stem cells by mesenchymal-hematopoietic interaction and application to regenerative medicine

研究代表者

星 和人 (HOSHI, Kazuto)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30344451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、造血幹細胞によって誘導されるMSCのステムネス・シグナルを解明し、シグナル関連分子を活用して高ステムネスを維持するMSC増殖培養法を確立することにより再生医療の発展の一助とすることを目的として、これまで造血幹細胞(HSC)とMSCを共培養することによりin vitro環境下における造血-間葉相互作用を再現し、HSCからMSCに流れるシグナルの同定を網羅的遺伝子解析にて行い、選定した遺伝子の機能評価およびMSCのステムネスに寄与することの証明を行っている。また、これらの結果を基に、in vitro培養系を確立し、培養したMSCを動物モデルに移植した時の治癒評価をおこなっている。

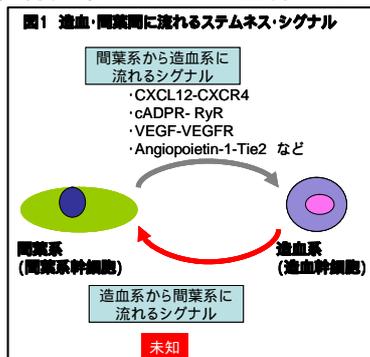
研究成果の概要(英文)：Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells (MSC) would be good cell sources for the regenerative medicine using autologous cells. However, it is difficult to the large and complex tissue regeneration using the cultured MSCs because it shows poor growth and differentiation and is heterogeneous in their population. To solve the problem, it is essential to establish a cell culture techniques for the MSC to maintain the stem cell property. Therefore, in this study, we examined whether the stem cell properties of MSCs could be enhanced by hematopoietic stem cell (HSC). As the result, The signal, closely-involved in stem cell niche was detected, and we observed MSCs significantly increased the cell proliferation and maintained their properties. These results suggest that hematopoietic-mesenchymal interaction plays pivotal roles in the stem-ness of MSCs. Finally, we performed a comprehensive screening of putative genes to maintain of stem cell signal from the HSCs to MSCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ステムネスシグナル 造血-間葉相互作用 間葉系幹細胞 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系幹細胞(MSC)は骨髄中に存在し、一旦組織損傷が起これば骨、軟骨、筋肉の間葉系組織へ分化することが知られている。骨髄液は骨髄穿刺という手法で患者から比較的容易に採取できるため、MSCは再生医療における細胞源として歯槽骨再生などで既に臨床応用されている[Ueda 2005 Cytotherapy]。しかしMSCの骨髄液における存在確率は約200万分の1とごく少数しか存在しておらず、またMSCには間葉系の分化細胞、特に線維芽細胞と識別する特異マーカーもないため単離が困難である。さらに、現行のMSC増殖培養では骨や軟骨あるいは血管、筋肉などへの分化能、すなわち幹細胞特性(ステムネス)の顕著な低下は不可避である。今後、口腔外科領域の再生医療をさらに発展させてゆくためには、患者がより多い骨再生医療の推進も必要であり、そのためには骨再生に有利なMSCに着眼し、培養技術を向上させてゆく必要がある。申請者らは、MSCの自己複製とステムネス維持の分子機序を解明し、**ステムネスを維持しながらMSCを増殖培養させる方法**を確立することが必須であり、同技術が確立できれば口腔外科における再生医療の適応範囲が飛躍的に拡大すると考える。近年、造血幹細胞については、骨髄における間葉系の細胞が微小環境nicheを提供し、必要なサイトカインや細胞外基質を供給することにより自己複製能およびステムネスが維持されることが明らかとなってきた[Tokoyoda 2004 Immunity](図1)。しかし、骨髄中における造血幹細胞は存在頻度が極めて低く、複雑な指標系が必要であるため、nicheとなる間葉系の細胞の同定と特性解明には至っていない。申請者らは、個体発生における3胚葉の相互作用、あるいは組織形成における上皮・間葉相互作用などの生物学的な原理を勘案し、**造血幹細胞のnicheとなる間葉系の細胞がMSCそのものであり、従来指摘されている間葉系から造血幹細胞へのステムシグナルに対し、造血系幹細胞によって誘導されるMSCのステムネス・シグナルも存在すると仮説する(図1)。**



2. 研究の目的

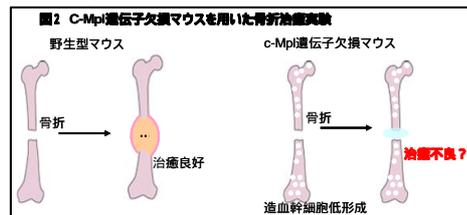
現在、口腔外科領域の臨床再生医療として骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を用いた歯槽骨再生が行われている。しかし、現時点の技術ではMSCは増殖培養によって幹細胞特性(ステムネス)が著減するため、顎・顔面骨の再建

といった大型で複雑な骨を再生させるには至っていない。再生医療の適応を拡大し、さらに実効的な医療にしてゆくためには、ステムネスを維持しながらMSCを培養する技術を確立することが不可欠である。近年、間葉系組織によって造血幹細胞のステムネス維持されることが明らかになってきたが、申請者らは造血系から間葉系へのカウンターパートも存在すると考える。本研究の目的は、造血幹細胞によって誘導されるMSCのステムネス・シグナルを解明し、シグナル関連分子を活用して高ステムネスを維持するMSC増殖培養法を確立することにより、口腔外科再生医療の発展の一助とすることである。

3. 研究の方法

- ・間葉・血球共培養の確立
- ・マウス骨折治癒モデルを用いた間葉ステムネス・シグナルの検証
- ・ステムネス・シグナル関連分子の検索
- ・ステムネス・シグナル関連分子の間葉系における機能解析
- ・ステムネス・シグナルを活用したMSC増殖培養法の確立
- ・ビーグル下顎骨欠損モデルにおける骨再生への応用

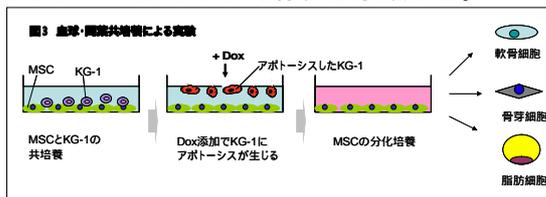
なお、マウス骨折治癒モデルは、in vivoでのMSC機能評価のために用いる。同モデルを作製するマウスとしては、造血幹細胞の形成抑制が見られるc-Mpl遺伝子欠損マウスを用いる(図2)。



間葉・血球共培養の確立

間葉系の細胞には、血球系細胞との識別のため、EGFP標識マウス由来の間葉系幹細胞(MSC)を用いる。MSCとHSC単離方法としては、8-10週齢マウス大腿、脛骨より採取した骨髄液をFACS(BD社製Aria、現有)を用いてMSCはCD45、Ter119陰性、Sca-1、CD140a陽性の細胞にて選別する。HSCはLin陰性、Sca-1、c-Kit陽性の細胞を選別し、また、ヒト白血病急性骨髄芽球細胞株(KG-1)を用いる。MSCとの共培養の後に血球系細胞を速やかに除去できるように、KG-1にはアポトーシス誘導遺伝子(Caspase8)を組み込んだドキシサイクリン誘導型レンチウイルスベクターを導入する。これにより、適宜ドキシサイクリンを添加し、KG-1を選択的に細胞死へ誘導する。一方、FACSにてGFP陽性細胞のみを回収し、細胞数のカウントを行う。さらにmRNAを回収し、遺伝子解析を行う。また、回収したMSCを間葉系分化誘導キットを用いて骨、軟骨、脂肪細胞に分化させ、幹細胞特性(ステムネス)を評価する。

対照には MSC を単独で培養したものを用い、比較検討する(図 3)。これらにより、血球・間葉共培養系を確立し、血球から間葉へのステムネス・シグナルの存在を示唆する。



### マウス骨折治癒モデルを用いた間葉ステムネス・シグナルの検証

マウスには、造血幹細胞の形成が著しく抑制されている c-Mpl 遺伝子欠損マウスを用いる(図 2)。このマウスを、造血系からのステムネス・シグナルに関する in vivo での loss of function モデルとして活用する。MSC の in vivo 機能解析系としては、骨折治癒モデルを用いる。骨折治癒においては MSC が大量に動員され、MSC の機能が骨癒合と表現型で評価できるため、マウス骨折治癒モデルは in vivo における MSC の評価モデルとして有用性が高い。具体的には、6 週齢マウスをもちいて、脛骨骨幹部中央で micro saw を用いて骨切りし、脛骨近位から 25 G 針を骨軸に平行に髓内刺し髓内釘として脛骨近位より骨折部を通り、遠位骨片髓内へ挿入し、骨折部を固定する [Bonnarens 1984 J Orthop Res]。モデル作製後 1、2、4 週で骨折部治癒経過を観察する。また、単純 X 線撮影、 $\mu$ CT 撮影、組織像などを用いて骨折治癒を評価し軟骨や骨の形成を解析する。その他、Stro-1 などの免疫染色により MSC 様細胞の同在を同定するとともに、同細胞の in vivo での増殖を形態計測学的に評価する。これらの所見につき、野生型マウスと c-Mpl 遺伝子欠損マウスの MSC 増殖、軟骨や骨への分化誘導を比較検討する。

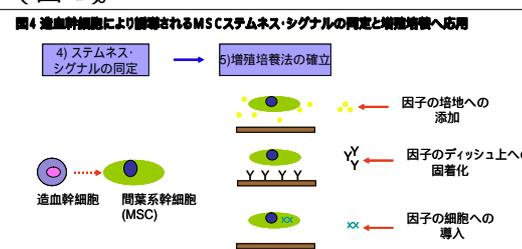
### ステムネス・シグナル関連分子の検索

GFP 陽性マウス MSC と HSC の共培養系を用いて、シグナル遺伝子を解析する。1) 項での結果を勘案して共培養期間を選定し、培養後、FACS にて MSC の mRNA を回収する。対照には同期単独培養した MSC の mRNA を用いる。これら mRNA を用いて発現上昇または抑制する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析する。また、変動遺伝子をクラスター解析し、遺伝子変動の一般的な傾向を把握するとともに、著明な発現上昇を示す上位遺伝子を 30 程度検討する。候補遺伝子の発現上昇に対する再現性は、同共培養系を用いて GFP 陽性マウス MSC における発現変化を real time RT-PCR を用いて検討し、血球系から間葉系へのステムネス・シグナル候補を選定する。

### ステムネス・シグナル関連分子の間葉系における機能解析

項で選定した分子について、抑制型あるいは恒常活性型遺伝子をクローニングし、lentivirus にそれぞれの遺伝子を組み込んだ

後、MSC に感染導入する。1) 項で確立した血球・間葉共培養系を用いて、抑制型遺伝子を導入した MSC と KG-1 の共培養を行った後 MSC を回収し、細胞増殖評価ならび多分化能評価を行い、MSC ステムネスの変化を検証する。候補分子の機能を抑制する中和抗体およびインヒビターが存在した場合は、適宜それらを用いて検討する。また、恒常活性型遺伝子を導入した MSC については、単独培養でもステムネスが維持・向上することを確認する。遺伝子導入後、細胞増殖評価ならび多分化能評価を行い、導入した遺伝子が MSC 分化に促進的に働くことを確認し、シグナル分子の機能を解析し、シグナルを同定する(図 4)。



マウス骨折モデルにおいても lentivirus による遺伝子導入を行い、上記シグナルの機能を検証する。抑制型あるいは恒常活性型遺伝子を担持した lentivirus を野生型、c-MPL 遺伝子欠損マウス骨折部に注入し、骨折治癒を X 線所見、 $\mu$ CT 所見、組織像で評価し empty vector と比較する。

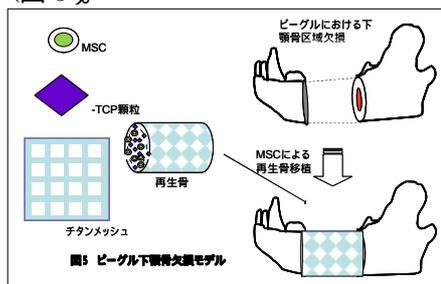
### ステムネス・シグナルを活用した MSC 増殖培養法の確立

同定されたステムネス・シグナル分子が液性因子である場合は、細胞培養液中へ添加し、増殖ならびに多分化能を評価する。骨髓液から遠心と培養ディッシュへの接着で分離したヒト MSC を 10% FBS 含有  $\alpha$ MEM で培養し、さらに各種濃度の該当分子を添加する。培養後の細胞曲線ならびに骨、軟骨、脂肪細胞への分化を評価し、培養条件を設定する。シグナル分子が細胞外基質である場合は、培養液に添加する代わりに培養ディッシュへ固着化し、培養したヒト MSC の増殖ならびに多分化能を評価する。さらに該当分子が転写因子などである場合は、細胞毒性や安全性を考慮してリポフェクション法により遺伝子導入を行いステムネスの維持、改善を検討する。これらを総合し、ステムネス・シグナルを活用した MSC 増殖培養法を確立する。

### ビーグル下顎骨欠損モデルにおける骨再生への応用

ビーグル(1 歳齢雄、n=12)の腸骨から骨髓液を採取し(n=6)、5) 項で確立した方法で培養し、高ステムネス MSC を回収する。対照として平面培養した MSC を用いる(n=6)。各 MSC ( $2 \times 10^8$  細胞)を足場素材  $\beta$ -TCP 顆粒(2 mL)と混和し再生骨を作製する。次いで、ビーグルの下顎に長さ 3 cm の骨区域欠損を作製し、自家再生骨をチタンメッシュで作ったトレーに充填して下顎欠損部に移植し、チタ

ンスクリューで固定する。移植後 2、6 ヶ月で移植組織を摘出し、骨再生を評価する。評価には単純 X 線、 $\mu$ CT による画像評価、非脱灰研磨切片や脱灰パラフィン切片による組織学的評価、などを行い骨再生を比較検討する (図 5)。



#### 4. 研究成果

造血・間葉共培養系の確立に関して、EGFP マウス由来 MSC と KG-1 および MSC と HSC を共培養し、培養後の MSC の細胞増殖能の変化を計測した。また、回収した MSC を間葉系分化キット (BD 社製) を用いて骨、脂肪、軟骨細胞に分化誘導させ、幹細胞特性 (ステムネス) の評価をおこなった。その結果、血球系との共培養によって、MSC の細胞増殖能および多能性が維持されることが明らかになった。

ステムネス・シグナル関連分子の検索に関して、EGFP マウス由来 MSC と血球系細胞株である KG-1 細胞、および MSC と HSC の共培養系を用いて、ステムネスに関与するシグナル遺伝子の解析を行った。共培養期間を MSC の細胞増殖がピークを迎える 6 日目とし、培養後、フローサイトメーターを用いて MSC のみを回収し、mRNA の抽出をおこなった。対象には同期に MSC のみを培養した群の mRNA を用いた。これらの mRNA を用いて、共培養によって 2 倍以上発現上昇または抑制するプロンプをマイクロアレイにより網羅的に解析をおこなった。また、変動プロンプを階層的クラスタリングによって解析し、発現変動遺伝子の一般的な傾向を把握するとともに、そのうち 2 倍以上発現上昇を示す遺伝子に関して、gene ontology (GO)、pathway、KEGG 解析を行うことで MSC のステムネスに関与すると思われるシグナルを抽出し、これらシグナルのうち上位 50 プロンプを候補遺伝子として選定した。候補遺伝子の発現量に対する再現性は、造血・間葉共培養系によって得られたサンプルを real time RT-PCR を用いて検討し、再現の最も高い 7 遺伝子を最終的な候補遺伝子とした。これら遺伝子における機能の詳細解析をおこなった。恒常活性型あるいは抑制型遺伝子をクローニングし、lentivirus にそれぞれ導入したのち、ウイルスの至適導入密度を検討したうえで、MSC に導入し、細胞増殖評価ならびに多能性の評価をおこない、MSC ステムネスの変化を検証した。その結果、候補遺伝子の一つに MSC の細胞増殖に対し有意な

変化を、また別の候補遺伝子では多能性に対し有意な変化を認めたことから、ステムネスの関与には多因子により制御されていることが示唆された。これらの遺伝子の組み合わせによって総合的な造血・間葉相互作用の解明につながると確信しており、最終的には幹細胞ニッチにおける幹細胞のステムネスを解明できるものと示唆された。

一方、造血・間葉相互作用の解明を目的として、造血分化が抑制された c-Mpl 遺伝子欠損マウス由来の MSC を用いて増殖能、分化能へなどステムネスの影響を検討するため、野生型 MSC との比較検討を、また、共培養による造血細胞の影響を検討した。また、組織損傷による幹細胞動員の検証として、マウス骨折治癒モデルを作製し、造血幹細胞の形成抑制が見られる c-Mpl 遺伝子欠損マウスを用いて脛骨骨折モデルを作製し、損傷後の治癒過程を経時的に検討を行った。in vitro において同欠損マウス由来の MSC を採取し、培養を行った。その結果、フローサイトメーターにて幹細胞マーカーの発現パターンが明らかに異なっており、総骨髓細胞のうち MSC の割合が野生型と比較して減少していることが確認された。また、分化誘導能に関して検討を行った結果、初代培養においては誘導能に差は認められなかったことから、HSC 以外の幹細胞ニッチが HSC の機能を代償している可能性を示唆した。また、組織損傷による幹細胞動員の検証において、損傷後 day 7, 14, 21 の治癒過程を経時的に検討を行った。欠損部領域の組織学的評価を幹細胞マーカーである CD34、Sca-1、CD140a にておこなったところ、野生型、ノックアウトマウスともに骨髓中でのマーカー発現は認められたものの、欠損部周囲および近接組織での発現はわずかであった。また、経時的にマーカー発現も徐々に減少している傾向が認められたことから、HSC の機能低下によって造血・間葉相互作用の減少あるいは消失し、その結果として MSC のステムネスに影響を及ぼしている可能性を示唆した。

#### 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 13 件)

- Abe, M., Mori, Y., Kanno, Y., Hoshi, K., Saijo, H., Abe, T., Ohkubo, K., Takato, T., A case of pleomorphic adenoma of the parotid gland with multiple local recurrences through facial to cervical region, Open Journal of Stomatology, 査読有, vol.4, 2014, 441-445. DOI: 10.4236/ojst.2014.49059

Takato, T., Mori, Y., Fujihara, Y.,  
Asawa, Y., Nishizawa, S., Kanazawa,  
S., Ogasawara, T., Saijo, H., Abe, T.,  
Abe, M., Suenaga, H., Kanno, Y.,  
Sugiyama, S., Hoshi, K., Preclinical  
and clinical research on bone and  
cartilage regenerative medicine in oral  
and maxillofacial region, *Oral Sci.*  
*Int.*, 査読有, vol.11(2), 2014, 45-51.  
DOI: 10.1016/S1348-8643(14) 00008-1  
Mori, Y., Kanazawa, S., Asawa, Y.,  
Sakamoto, T., Inaki, R., Okubo, K.,  
Nagata, S., Komura, M., Takato, T.,  
Hoshi, K., Regenerative cartilage  
made by fusion of cartilage elements  
derived from chondrocyte sheets  
prepared in temperature-responsive  
culture dishes, *J. Hard Tissue*  
*Biology*, 査読有, vol.23(1), 2014,  
101-110. DOI: なし  
Mori, Y., Fujihara, Y., Misawa, M.,  
Inoue, H., Inaki, R., Suenaga, H.,  
Okubo, K., Saijo, H., Takato, T., Hoshi,  
K., Fabrication of stereotyped  
beta-tricalcium- phosphate blocks into a  
conjugated structure using  
mesenchymal stem cell sheets  
prepared in temperature- responsive  
culture dishes. *J. Hard Tissue Biology*,  
査読有, vol.23, 2014, 217-224. DOI:  
10.2485/jhtb. 23.217  
Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K.,  
Macrophage-inducing fasl on  
chondrocytes forms immune privilege  
in cartilage tissue engineering,  
enhancing in vivo regeneration,  
*Stem Cells*, 査読有, vol.32(5), 2014,  
1208-1219. DOI: 10.1002/stem. 1636  
Kawase-Koga, Y., Saijo, H., Hoshi, K.,  
Takato, T., Mori, Y., Surgical

management of odontogenic myxoma:  
a case report and review of the  
literature, *BMC Res. Notes*, 査読有,  
vol.7, 2014, 214. DOI: 10.1186/  
1756-0500-7-214

高戸 毅, 藤原夕子, 星 和人, 歯科口  
腔外科と再生医療、耳鼻咽喉科・頭頸部  
外科, 査読有, 86 巻 6 号, 2014, 450-456.  
DOI: なし

高戸 毅, 藤原夕子, 菅野勇樹, 西條英  
人, 星 和人, 【組織プリント】カスタ  
ムメイド型人工骨の開発と顎顔面領域  
への臨床応用、人工臓器, 査読有, 44  
巻 1 号, 2014, 207-215 . DOI: なし  
星 和人, 稲木涼子, 高戸 毅, バイオ  
インテグレーションを支持する軟部組  
織、バイオインテグレーション学会雑誌、  
査読有, 3 巻 1 号, 2014, 3-5. DOI:  
なし

Matsuyama, M., Fujihara, Y., Inaki,  
R., Nishizawa, S., Nagata, S., Takato,  
T., Hoshi, K., Evaluation of in vivo  
migration of chondrocytes from  
tissue-engineered cartilage that was  
subcutaneously transplanted in mouse  
model, *OJRM*, 査読有, vol.2(4), 2013,  
93-98. DOI: 10.4236/ojrm.2013.24013  
Mori, Y., Hoshi, K., Takato, T.,

Takahashi, M., Hirano, Y., Kanno, Y.,  
Ohkubo, K., Saijo, H., Submucous  
cleft palate: variations in bony defects  
of the hard palate, *Br. J. Oral*  
*Maxillofac. Surg.*, 査読有, vol. 51(8),  
2013, e220-e223. DOI: 10.  
1016/j.bjoms.2013.01.015

Mori, Y., Kanazawa, S., Watanabe, M.,  
Suenaga, H., Okubo, K., Nagata, S.,  
Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K.,  
Usefulness of agarose mold as a  
storage container for three-

dimensional tissue-engineered cartilage, *Materials and Sci. Applications*, 査読有, vol.4, 2013, 72-78. DOI: 10.4236/msa.2013.48A010

Mori, Y., Watanabe, M., Nakagawa, S., Asawa, Y., Nishizawa, S., Okubo, K., Saijo, H., Nagata, S., Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K., Hollow fiber module applied for effective proliferation and harvest of cultured chondrocytes, *Materials Sci. and Applications*, 査読有, vol.4, 2013, 62-67. DOI: 10.4236/msa.2013.48A008

〔学会発表〕(計 9 件)

星 和人, 足場素材を用いた軟骨再生医療の新展開 (招待講演) 第 36 回バイオマテリアル学会、2014 年 11 月 18 日、タワーホール船堀、東京

Hoshi, K., Clinical application of implant-type tissue-engineered cartilage for cleft lip-nose deformity (招待講演), The 5<sup>th</sup> Hosa Debtal Conference, November 14, 2014, HoChiMin city, Viet-Nam.

Hoshi, K., Three-dimensional tissue-engineered cartilage using biodegradable polymers (招待講演), 2014 Cold Spring Harbor Meeting, November 7, 2014, Suzhou, China

Takato, T., Fujihara, Y., Hoshi, K., Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region (招待講演), 7<sup>th</sup> World Congress on Preventive and Regenerative Medicine (7<sup>th</sup> WCPRM), November 4 – 7, 2014, Taipei, Taiwan

星 和人, 唇裂鼻変形に対するインプラ

ント型再生軟骨臨床展開 (招待講演) 第 38 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014 年 5 月 30 日、札幌コンベンションセンター、札幌

星 和人, iPS 細胞を用いたティッシュエンジニアリング型軟骨再生医療の新展開 (招待講演) 第 68 回 NPO 法人日本口腔外科学会学術集会、2014 年 5 月 9 日、京王プラザホテル、東京

星 和人, 自己組織化ペプチドを活用した次世代再生軟骨組織の研究開発 (招待講演) 第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 4 日、国立京都国際会館、京都

Hoshi, K., et al., Cartilage regeneration and usefulness of medication (招待講演), International Cartilage Repair Society 2013, Sep. 17, 2013, Swissotel Gran Efes, Izmir, Turkey

Hoshi, K., Optimal combinations of scaffolds and growth factors for tissue engineering of cartilage (招待講演), Osteoarthritis Research Society International World Congress, Apr. 20, 2013, Marriott Philadelphia Downtown, Philadelphia, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星 和人 (HOSHI, Kazuto)  
東京大学医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 30344451

### (2) 研究分担者

藤原 夕子 (FUJIHARA, Yuko)  
東京大学医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50466744

### (3) 連携研究者

森 良之 (MORI, Yoshiyuki)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70251296

高戸 毅 (TAKATO, Tsuyoshi)  
東京大学医学部附属病院・教授  
研究者番号: 90171454