

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659789

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の体内遊走機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the in vivo migration of mesenchymal stem cells.

研究代表者

松崎 有未 (Matsuzaki, Yumi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50338183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：我々は新たな分離方法である、クローン単離法により高濃縮間葉系幹細胞の選択を可能にした。3つの細胞表面マーカー(LNGFR、THY-1、VCAM-1)を組み合わせ、すべて+の(LTV)細胞を分離しクローナル解析を行ったところ、従来法のhMSCは p16(INK4a)を介し急速に細胞老化する上、頻繁にゲノムのコピーエラーを示すのに対し、LTV細胞は培養環境で急速に分裂増殖し、全クローンで多系統分化と自己複製能および遊走能を示した。本研究で明らかにしたマーカーコンビネーションLNGFR+ THY1+ VCAM-1hi+ は現在最も強力、かつ細胞性能の高いhMSCを分離することができる。

研究成果の概要(英文)：We report an improved prospective clonal isolation technique and reveal that the combination of three cell-surface markers (LNGFR, THY-1, and VCAM-1) allows for the selection of highly enriched clonogenic cells (one out of three isolated cells). Clonal characterization of LNGFR+THY-1+ cells demonstrated cellular heterogeneity among the clones. Rapidly expanding clones (RECs) exhibited robust multilineage differentiation and self-renewal potency, whereas the other clones tended to acquire cellular senescence via P16INK4a and exhibited frequent genomic errors. Furthermore, RECs exhibited unique expression of VCAM-1 and higher cellular motility compared with the other clones. The combination marker LNGFR+THY-1+VCAM-1hi+ (LTV) can be used selectively to isolate the most potent and genetically stable MSCs.

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：間葉系幹細胞 創傷治癒学

### 1. 研究開始当初の背景

様々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が不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究では、組織幹細胞の中でも分化能と安全性の高い間葉系幹細胞を用いて、損傷を受けた際の間葉系幹細胞の遊走制御機構を解明することを目的とした。ヒトが持つ治癒能力を解明することにより、幹細胞移植治療の有効性を評価することができ、早期に医療への応用が実現可能な細胞移植方法を確立できるはずである。

### 3. 研究の方法

ヒト間葉系幹細胞を移植した NOG マウスの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(実験 1)。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(実験 2)、サイトカインで遊走の促進を行う(実験 1)。その後、*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、電場変化が創傷治癒に対して与える影響や、細胞外マトリックスによる輸送制御を行う(実験 3)。そして、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非侵襲的・経時的に観察する(実験 4)。

#### (1) 【損傷部位の細胞・成長因子の解析(*in vivo*)】

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*)より移植し、同 NOG マウスに損傷(後背部全層欠損層)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。

#### (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(*in vitro*)】

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* で調べる。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。

#### (3) 【電場変化と架橋細胞外マトリックスによる *in vivo* 幹細胞制御】

グリコサミノグリカン(GAG)は、二糖が単位になって枝分かれせず、繰り返し連結した多糖である。GAG は糖の多くにカルボキシル基(-COOH)を持つため、強く負に荷電している。動物細胞が産生する最も陰性の強い物質で、内在性電場を形成する重要なファクターであると考えられる。GAG の中でもヒアルロン酸は親水性が高く、水を含むと少量でも膨張して大きな体積を埋める性質を持ち、傷の修復過程に置いて大量に生産され、潤滑剤として働いている重要な成分である。また、アテロコラーゲンも同様に治癒に関わる材料として知られており、架橋強度により間葉系幹細胞は分化能を変化させる性質がある(Engler Cell 2006)。そこで、ヒアルロン酸(内在性電場誘導)とアテロコラーゲン(分化誘導)を組み合わせた細胞外マトリックスを作成し、電場変化に加え創傷部位に注入することで、間葉系幹細胞の遊走能・分化能に与える影響を調べる。実験 同様、組織染色・FACS にて遊走・分化細胞の定量化を行う。

#### (4) 【遊走間葉系幹細胞の *In vivo* イメージング】

移植細胞がマウスの組織内や体内でも識別できるように、ヒト間葉系幹細胞に対し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、細胞に恒常的に発現させる。*In vivo* リアルタイムイメージング装置(IVIS)を用いて生体内での間葉系幹細胞の局在を体外から観察し、間葉系幹細胞損傷部位への遊走を非侵襲的に確認する。電場変化・細胞外マトリックス等の投与によって遊走能に現れる影響を観察し、間葉系幹細胞を用いた細胞治療の有効性を証明する。

### 4. 研究成果

ヒト間葉系幹細胞を免疫不全動物へ移植し、高率よく体内動態を観察する系の確立に集中した。フローサイトメーターにて分離したヒト間葉系幹細胞に Luc 遺伝子を導入し、NOG マウスの眼下静脈叢より全身移植後、IVIS にて体外より細胞動態を経時的に観察したところ、継代培養を経て老化した細胞はほぼ全ての移植細胞が肺毛細血管に捕捉されてしまうため血中循環に入らず、その後の動態を追うことが不可能であることが判明した。そこで、別プロジェクトにて確立した手法を用い、移植前に遊走性を持つ細胞のみを分離し、ホストへ投与したところ肺毛細血管へ捕捉されずに体内循環させることが可能であった。分離の指標としたインテグリン受容体は、単なるマーカーであるのみならず、特異的抗体を用いて細胞間相互作用をブロックすることで遊走性が失われることから、間葉系幹細胞の遊走性に必須の分子であることが明らかになった。

確立したヒト間葉系幹細胞体内動態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非侵襲的・経時的に観察した。移植細胞が、マウスの組織内や体内

でも識別できるように、ヒト間葉系幹細胞に対し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、細胞に恒常的に発現させた。In vivo リアルタイムイメージング装置 (IVIS) を用いて生体内での間葉系幹細胞の局在を体外から観察し、間葉系幹細胞の損傷部位への遊走を非侵襲的に確認した。電場変化・細胞外マトリックス等の投与によって、遊走能に現れる影響を観察し、間葉系幹細胞を用いた細胞治療法の確立に役立てる。

#### 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 11 件)

Ariki R, Morikawa S, Mabuchi Y, Suzuki S, Nakatake M, Yoshioka K, Hidano S, Nakauchi H, Matsuzaki Y, Nakamura T, Goitsuka R. Homeodomain transcription factor meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLoS One*. 9(2): e87646, 2014 (査読有)  
DOI:10.1371/journal.pone.0087646

Ishikawa T, (他 10 名), Toyama Y, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Yamaguchi R, Miyano S, Saya H. Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells. *Cancer Sci*. 104(7): 880-8, 2013 (査読有)  
DOI: 10.1111/cas.12163.

Kabashima-Niibe A, Higuchi H, Takaishi H, Masugi Y, Matsuzaki Y, Mabuchi Y, Funakoshi S, Adachi M, Hamamoto Y, Kawachi S, Aiura K, Kitagawa Y, Sakamoto M, Hibi T. Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci*. 104(2): 157-64, 2013 (査読有)  
DOI:10.1111/cas.12059.

Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Takeda K, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Nishino K. Adipose stromal cells contain phenotypically distinct adipogenic progenitors derived from neural crest. *PLoS One*. 8(12): e84206, 2013 (査読有)  
DOI:10.1371/journal.pone.0084206.

Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y, LNGFR+ Thy-1+ Vcam-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports*. 1(2): 152-165, 2013 (査読有)

Yamamoto Y, Fukuda K, Fuchimoto Y, Matsuzaki Y, Saikawa Y, Kitagawa Y, Morikawa Y, Kuroda T. Cetuximab promotes anticancer drug toxicity in rhabdomyosarcomas with EGFR amplification in vitro. *Oncol Rep*. (3): 1081-6, 2013 (査読有)

DOI:10.3892/or.2013.2588.

Kamiura N, Hirahashi J, Matsuzaki Y, Idei M, Takase O, Fujita T, Takato T, Hishikawa K. Basic helix-loop-helix transcriptional factor MyoR regulates BMP-7 in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 304(9): F1159-66, 2013 (査読有)

DOI:10.1152/ajprenal.00510.2012.

Morizane R, Monkawa T, Fujii S, Yamaguchi S, Homma K, Matsuzaki Y, Okano H, Itoh H. Kidney specific protein-positive cells derived from embryonic stem cells reproduce tubular structures in vitro and differentiate into renal tubular cells. *PLoS One*. 8(6): e64843, 2013 (査読有)

DOI:10.1371/journal.pone.0064843

Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H, Matsuzaki Y. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- $\alpha$ . *Nature Protocols*. 7: 2103-2111, 2012 (査読有)

DOI:10.1038/nprot.2012.125.

Mishima K, (他 15 名), Matsuzaki Y, Tsubota K, Saito I. Transplantation of side population cells restores the function of damaged exocrine glands through clusterin. *Stem Cells*. 30(9): 1925-37, 2012 (査読有)

DOI:10.1002/stem.1173.

Mabuchi Y, Houlihan DD, Okano H and Matsuzaki Y. Discovering the true identity and function of mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration*. 32(4): 146-151. 2012 (査読有)

DOI:10.2492/inflammregen.32.146

[学会発表](計 6 件)

松崎有未、超高純度ヒト MSC の分離とその機能解析、第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 03 月 04 日 ~ 2014 年 03 月 06 日、国立京都国際会館

松崎有未、間葉系幹細胞の体内動態と慢性 GVHD 誘導、第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 03 月 04 日 ~ 2014 年 03 月 06 日、国立京都国際会館

松崎有未、超高純度ヒト間葉系幹細胞の解析『遊走能と未分化性維持』、第 34 回日本炎症再生医学会、2013 年 07 月 02 日

～2013年07月03日、国立京都国際会館  
松崎有未、間葉系幹細胞の体内動態と慢性炎症惹起メカニズム、第12回日本再生医療学会学術集会、2013年03月21日～2013年03月23日、横浜

松崎有未、フローサイトメトリーによる間葉系幹細胞の分離、日本免疫学会総会学術集会、2012年12月05日～2012年12月07日、神戸

Yumi Matsuzaki、Minor antigen-mismatched MSC react with residual host T cells to trigger the progression of chronic GVHD. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting、2012年06月12日～2012年06月15日、横浜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：ヒト間葉系幹細胞の分離培養法  
発明者：松崎有未、馬淵洋、岡野栄之  
権利者：松崎有未  
種類：2013-161752  
番号：特願  
出願年月日：2013年7月  
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 有未 (MATSUZAKI, Yumi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50338183

### (2) 研究分担者

なし