

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890077

研究課題名(和文) 胎児末梢血内間葉系幹細胞を利用した新規胎児皮膚治療の臨床応用に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Study of novel embryonic therapy using embryonic circulating mesenchymal stem cells

研究代表者

知野 剛直 (Chino, Takenao)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20521397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔・新生児から、生きた状態で末梢血を約10マイクロリットルを採血し、FACS解析する手技を確立した。この習得した手技を使いマウス新生児の末梢血をFACS解析を行った結果、Lin-PDGFR⁺ cellsは新生児では認められないことがわかった。さらに、成人マウス骨髄細胞中のLin-PDGFR⁺ ckit-Sca1⁺ cellsをFACS解析した結果、骨髄の中の約0.05-0.1%しか存在しておらず、骨髄採取してからのみSSEA3を発現し始める。さらに、Area sortingし、特殊な分化誘導を促すとkeratin5を発現し始めた。

研究成果の概要(英文)：We get a FACS analysis method taking a little blood sample from alive mouse embryo and neonate. By this method, we confirmed that Lin-PDGFR⁺ cells don't exist in the mouse neonatal peripheral blood. Adult mouse bone marrow cells are analyzed by FACS that Lin-PDGFR⁺ ckit-Sca1⁺ cells are only 0.05-0.1%. And SSEA3 is expressed after separated from bone marrow. Lin-PDGFR⁺ ckit-Sca1⁺ SSEA3⁺ cells are capable of inducing keratinocyte phenotype and expressing K5.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：骨髄間葉系幹細胞 マウス胎仔治療

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人マウス骨髄細胞を先天性表皮水疱症モデルマウスの胎仔期に循環内に投与し、生まれる前に細胞を皮膚に生着させることにより、皮膚症状改善と生存期間の延長が得られることが報告され、さらにアメリカ ミシガン大学及びチリで行われた臨床治験で、ヒト EB 患者に対して、全身性放射線照射後、骨髄間葉系幹細胞移植を行なったところ、皮膚症状の著明な改善を得たと報告された。骨髄間葉系幹細胞投与は、マウスおよびヒト EB 患者に治療効果があることが証明されたのである。

しかし、臨床で普及するには、投与前に行う全身性放射線照射により生じる致死性合併症(GVHD や感染症等)を減らすことや、さらに治療効果が得られる間葉系幹細胞を探索することが、次の重要な課題であることも判明した。

2. 研究の目的

最近、胎仔期の血液内のみが存在し、骨髄間葉系幹細胞よりも高い分化能力を持っている PDGFR 陽性の胎仔期血液内間葉系幹細胞(PDGFR +DAMSCs)の存在が示唆された。まずは、マウス胎仔・新生児の末梢血を採取する技術を獲得し、末梢血内に PDGFR +細胞の存在の有無を明らかにする。

さらに、マウス成人骨髄内細胞のどの fraction が keratin5 陽性細胞に分化誘導可能か、さらなる骨髄内探索を行った。

本研究の最終目的は、マウス胎仔期 E12.5-13.5 の血液内のみが存在する万能性が高い PDGFR 陽性の胎仔期血液内間葉系幹細胞 (Dorsal Aorta Mesenchymal Stem Cells(DAMSCs)(以下 PDGFR +DAMSCs と略す)を効率よく血液中から回収するシステムを構築し、さらに 難治性疾患のモデルマウスに、回収した DAMSCs 細胞を投与することで通常の MSC よりも高い治療効果が得られることを明らかにし、難治性疾患の新規治療法の研究基盤を確立することである。

3. 研究の方法

(1)マウス胎仔・新生児末梢血の採取および FACS 解析

マウス胎仔は E14-15day を使用し、vital line vein の一部を切開し、約 10 μ l の末梢血を採取した。同様に、マウス新生児 N1day を使用し Facial vein に切開を加え、同量の末梢血を採取した。いずれも実態顕微鏡下で手技を施行した。マウス胎仔末梢血採取の際は、母体をイソフルラン(フォーレン)で麻酔し、マウス新生児では、氷上に静止させ仮死状態で採取を行った。

今回は、採取量の安定していたマウス新生児末梢血を FACS 解析した。

(手技) 1. Heparinized 微小採血管でマウス新生児 facial vein から全末梢血 10 μ l を採取。

PBS90 μ l を加えて計 100 μ l にする。2. BD FACS Lysing Solution を使用し、溶血および固定する。3. PDGFR -APC、Lineage-PE を加える。4. Cant を使用し FACS 解析。

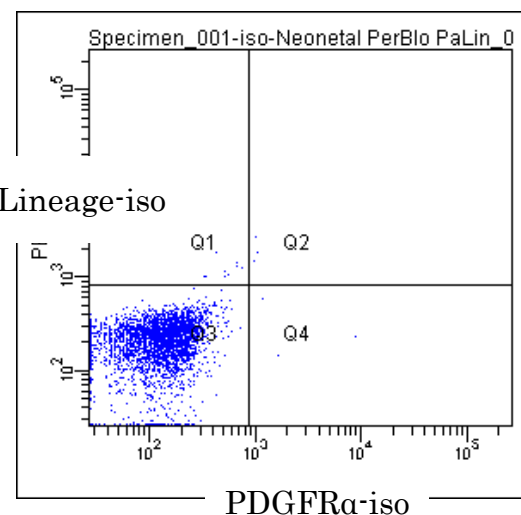
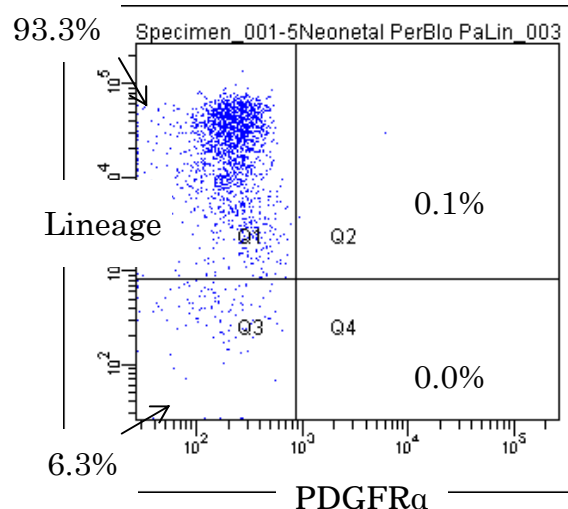
(2)成人マウス骨髄内幹細胞の FACS・Sorting および分化誘導

成人マウスから骨髄細胞を回収し、様々な標識抗体を使用して FACS 解析を行った。さらに目的とした fraction を Area を使用し sorting を行い、keratin5 陽性細胞に分化誘導を行った。

(手技)1.成人マウスから大腿骨・脛骨を取り出し、コラゲナーゼ A(Roche)処理。2. 様々な蛍光標識抗体を加える。3. Cant を使用し FACS 解析。Area と使用し Sorting。4. Sorting した骨髄細胞を Keratin5 陽性細胞の分化誘導。

4. 研究成果

(1)マウス新生児末梢血の解析



この習得した手技を使いマウス新生児の末梢血を FACS 解析施行した結果、Lin-PDGFR +cells はマウス新生児末梢血内では認められないことがわかった。



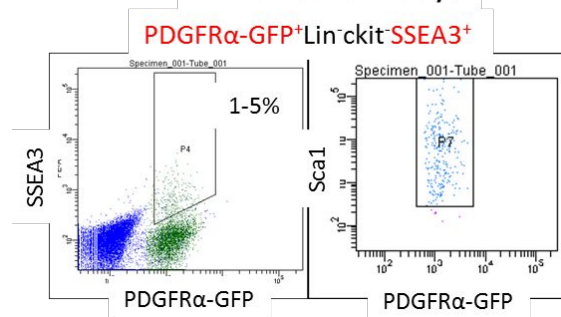
採血後数日経過した写真。浅い潰瘍がみられるのみである。

マウス胎仔・新生児から、生きた状態で末梢血を約 10 μ l 採血し、FACS 解析する手技を確立した。この手技を使えば、マウス胎仔・新生児を殺傷することなく採血を施行することが可能なので、今後、マウス末梢血の経時的解析研究に重要な役割を果たすことが予想される。

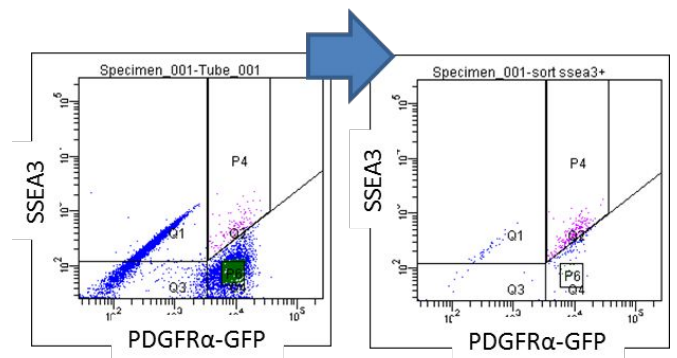
(2)

最近、骨髄細胞内の希少分画である PDGFR⁺ 骨髄細胞が、培養の系で keratin5 を発現するようになり、keratinocyte-like cell に分化することが報告された。さらに骨髄由来表皮細胞へ分化しやすい分画を詳細に突き詰めた結果、Lin⁻PDGFR⁺ckit⁺Sca1⁺SSEA3⁺cells が、骨髄由来表皮細胞に分化する可能性が高いことが分かった。PDGFR⁺cells は、近年の研究より分化誘導が懸りやすい骨髄間葉系幹細胞として周知され、iPS 細胞にも形質転換しやすいと報告されている。FACS 解析では、PDGFR⁺cells は骨髄細胞全体の 0.1-0.2%程度しか存在しておらず、全ての細胞が Lineage⁻ckit⁺あり、その中の約半分(骨髄細胞全体の 0.05-0.1%)が Sca1⁺であった。SSEA3 は、ヒト ES 細胞の未分化マーカーとしてよく知られているが、マウスではあまり研究がおこなわれていない。FACS の結果より、SSEA3 は骨髄から採取時点で、PDGFR⁺cells の中に存在しておらず、培養で dish に接着してからのみ発現することを免疫染色 (PDGFR⁺・SSEA3) と FACS で確認した。つまり、Lin⁻PDGFR⁺ckit⁺Sca1⁺cells は、骨髄の中の約 0.05-0.1%しか存在しておらず、骨髄採取してからのみ SSEA3 を発現し始めるのである。その割合は、骨髄細胞を Lineage⁻で sorting して約 1 週間培養した結果、約 3%に達することが明らかとなった。この Lin⁻PDGFR⁺ckit⁺Sca1⁺SSEA3⁺cells を、Area で sorting し、特殊な分化誘導を促すと、約 3 週間後に keratin5 を発現し始めることも分かった。

Lin⁻ culture 7 days



Lineage⁻のみ sorting し、さらに 1 週間培養して、FACS 解析を施行した。その結果、PDGFR⁺細胞のみに SSEA3 が発現し、さらにそのほぼすべての細胞が Sca1⁺であった。



PDGFR⁺ SSEA3⁺細胞を sorting した結果

Sorting した骨髄細胞に分化誘導を懸けた結果、



PDGFR⁺ Lin⁻ckit⁺Sca1⁺SSEA3⁺

PDGFR⁺ Lin⁻ckit⁺Sca1⁺SSEA3⁺が K5 誘導培地で、K5 を発現し始めたことを免疫染色で確認した。

このように申請者はこれまでに、骨髄間葉系幹細胞およびマウス胎仔・新生児に関する基礎的・応用的研究に従事しており、様々な研究成果をあげている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

知野 剛直(Chino, Takenao)

福井大学・医学部付属病院・医員

研究者番号:20521397

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし