

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460373

研究課題名(和文) 骨髄由来多能性幹細胞の特性解明と再生医療への応用

研究課題名(英文) Characterization and application for regenerative medicine of bone marrow pluripotent stem cells

研究代表者

松岡 佐保子 (Matsuoka, Sahoko)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：20317340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨髄の骨内膜間葉系細胞から多能性幹細胞マーカーであるSSEA-1弱陽性Sca-1陰性N-Cadherin陽性の未分化な細胞集団を、FACSセルソーターを用いて単離した。この細胞は、網羅的遺伝子発現解析にてES細胞に近似した遺伝子発現パターンを示していることが明らかになった。この細胞はES細胞の培養条件では増殖がみられず、定常状態では休眠していると考えられた。放射線照射や薬剤などのストレス下での増殖・分化を検討している。

研究成果の概要(英文)：We isolated SSEA-1dim Sca-1neg N-Cadherinpos undifferentiated cell population derived from endosteal mesenchymal cells in mouse bone marrow by a fluorescence activated cell sorter using pluripotent stem cell markers. Comprehensive gene expression analysis demonstrated that these cells show ES cell-like gene expression patterns. These cells were not increased under ES cell culture condition and seemed to be dormant in steady state. We examine the cell proliferation and differentiation under stress such as irradiation or drugs.

研究分野：血液学

キーワード：間葉性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

約10年前に樹立されたiPS細胞の開発によって、胚性を越えて生物の様々な組織に分化することが可能な多能性幹細胞の研究は、再生医療や医薬品開発といった臨床応用に発展した。iPS細胞ではES細胞の持つような倫理的問題や移植後の拒絶反応といった問題は解決されたが、腫瘍形成など主に安全性の観点から、iPS細胞を用いた再生医療分野の対象は完全に分化した細胞移植となり、現在は移植細胞数も少なくすむような疾患に限定されている。

成体の組織内で、ES細胞やiPS細胞のような多能性を持つ幹細胞を単離し移植のソースとして利用することが可能であれば、安全性も高くなり、治療対象も広がるのが期待されるが、現在のところ臨床への応用が期待出来るような体性多能性幹細胞は同定されていない。

2. 研究の目的

骨髄において造血幹細胞を支持する細胞微小環境(ニッチ)は極めて多種多様な細胞から構成されている。我々の研究グループはこれまでに骨髄造血幹細胞ニッチを構成する間葉系細胞をFACSソーティングにて細分離し、その分化能や造血幹細胞支持能などについて検討した結果、ALCAM⁺Sca-1⁻細胞集団が幹細胞の未分化性維持に重要な接着因子を多く発現し、造血幹細胞を支持する能力が極めて高いことを見出した。

我々はこの間葉系幹細胞集団に多能性を持つ幹細胞が含まれている可能性を考え、本研究にてその生物学的特性について解明することとした。

3. 研究の方法

(1)マウス骨髄間葉系細胞中の体性多能性幹細胞の同定

ALCAM⁺Sca-1⁻幹細胞に対して、ES細胞などの多能性幹細胞に特異的な分子を含めた網羅的な遺伝子発現解析を施行し、この細胞の分子生物学的特性について検討する。

(2)骨髄由来多能性幹細胞の遺伝子プロファイル解析

得られた多能性幹細胞について、ES細胞、iPS細胞といった他の多能性幹細胞と、あるいは造血幹細胞などの他の組織幹細胞と比較して発現が変動する遺伝子群をDNAマイクロアレイ解析によって同定し、多分化性幹細胞の維持・増殖・分化の制御に関わる分子を探索する。

(3)骨髄由来多能性幹細胞の自己複製能および多分化能解析

純化して得られた骨髄中の多能性幹細胞の自己複製能および多分化能について細胞培養と細胞移植実験系によって評価する。

4. 研究成果

(1)マウス骨髄間葉系細胞中の体性多能性幹細胞の同定

成体マウス骨髄中のALCAM⁺Sca-1⁻間葉系細胞に対して、ES細胞など他の多能性幹細胞に特異的な分子を含めたダイナミックアレイ法にて網羅的遺伝子発現解析を施行した。

ALCAM⁺Sca-1⁻細胞集団は、大変興味深いことに、骨組織に分化する特異的なマーカーを発現した骨芽細胞と、骨芽細胞やその他の分化した間葉系細胞に特徴的な遺伝子は発現していないが、多能性幹細胞においてその未分化性の制御に重要な働きがあるとされる転写因子群(Oct-3/4, Nanog, Sox2)を非常に高く発現している間葉系の幹細胞の2種類の細胞から構成されていた(図1)。

我々は後者の間葉系幹細胞集団に多能性を持つ幹細胞が含まれている可能性が高いと考え、この細胞を純化する目的で細胞表面に発現しているマーカーを検索した。その結果この細胞集団が幹細胞に特異的なマーカーであるSSEA-1弱陽性であることを見出し、SSEA-1の発現によってALCAM⁺Sca-1⁻細胞集団を二分することを見出した。

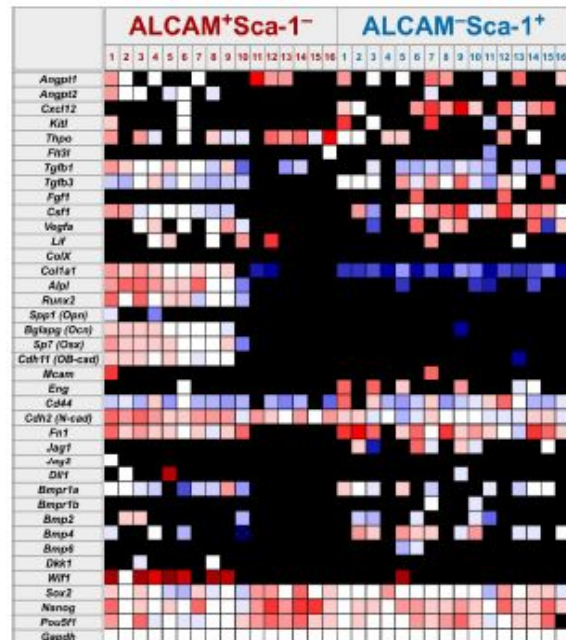


図1: 骨髄由来間葉系細胞の Single cell Q-PCR アレイ解析結果

CD31⁻ALCAM⁺Sca-1⁻細胞分画には、Col1a1, Alpl, Runx2 など骨芽細胞特異的遺伝子発現が陽性の細胞(ALCAM⁺Sca-1⁻#1-10)と、分化した間葉系細胞に特徴的な遺伝子発現は陰性で多分化性幹細胞に特徴的な転写因子 Oct-3/4, Nanog, Sox2 を極めて強く発現している細胞が認められる(ALCAM⁺Sca-1⁻#11-16)。

(2)骨髄由来多能性幹細胞の遺伝子プロファイル解析

SSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞について、ES細胞および他の間葉系細胞とDNAマイクロアレイ解析を実施した。SSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞はES細胞の遺伝子発現パターンに極めて類似した遺伝子発現パターンを示すことが明らかになった。

またSSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞の一部にN-Cadherinを発現している細胞集団を見出した。そこでFACS解析にてSSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞のN-Cadherinの発現について検討したところ、SSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞はN-Cadherin陽性分画とN-Cadherin陰性分画にわけられることがわかった。

(3)骨髄由来多能性幹細胞の自己複製能および多分化能解析

SSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞はES細胞に類似の遺伝子発現パターンを示していたが、ES細胞培養系による維持培養ではES細胞と同様の細胞増殖を示さなかった。FACS解析にて細胞周期を観察したところ、SSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞は静止期に多く存在し、ES細胞と異なり定常状態では休眠状態にあることが示唆された。SSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞は細胞分裂速度が低いことから、BrdUのようなDNA標識が長期に渡って残存する細胞(BrdU label retaining cell)であることが考えられる。そこで幹細胞特異的マーカーの発現とBrdU長期保持性を利用して、この幹細胞の骨髄間質性組織における局在を、組織免疫染色とマルチカラーフローサイトメトリー解析などのバイオイメージングの手法を用いて経時的に観察することによって、この幹細胞の発生源や生体内でのふるまいを探ることとした。

SSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞は定常状態では活性が低いことから、放射線照射やエンドキサン投与などのストレスを加えて培養した。SSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞は、コントロールのALCAM⁺Sca-1⁻細胞と比してエンドキサン投与後の細胞数は保たれていたことからストレスに対する耐性が高いことが示唆されたが、細胞増殖や分化の傾向は、放射線照射およびエンドキサン投与どちらでも認められなかった。この細胞集団の培養条件にはさらなる検討が必要であると考えられた。現在in vivo実験でマウスに放射線照射や抗がん剤等の投与によるストレス状況下でのSSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻細胞について細胞数や動態、分化能について検討している。

SSEA-1^{dim}ALCAM⁺Sca-1⁻N-Cadherin⁺細胞はマウス骨髄造血幹細胞Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺CD48⁻CD150⁺細胞との共培養にて、培養後の骨髄幹細胞が高い骨髄再構築能を持つことが明らかになった。

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3件)

A dynamic niche provides Kit ligand in a stage-specific manner to the earliest thymocyte progenitors.

Buono M, Facchini R, Matsuoka S, Thongjuea S, Waithe D, Luis TC, Giustacchini A, Besmer P, Mead AJ, Jacobsen SE, Nerlov C. Nat Cell Biol. 2016 Feb;18(2):157-67. doi: 10.1038/ncb3299.

Mortalin and DJ-1 coordinately regulate hematopoietic stem cell function through the control of oxidative stress.

Tai-Nagara I, Matsuoka S, Ariga H, Suda T. Blood. 2014 Jan 2;123(1):41-50. doi: 10.1182/blood-2013-06-508333.

Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy.

Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, Woll PS, Luis TC, Mead A, Moore S, Carella C, Matsuoka S, Bouriez Jones T, Chowdhury O, Stenson L, Lutteropp M, Green JC, Facchini R, Boukarabila H, Grover A, Gambardella A, Thongjuea S, Carrelha J, Tarrant P, Atkinson D, Clark SA, Nerlov C, Jacobsen SE.

Nature. 2013 Oct 10;502(7470):232-6. doi: 10.1038/nature12495.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡 佐保子 (Sahoko Matsuoka)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室
長

研究者番号：20317340

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()