

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462362

研究課題名(和文) 組織再生医療に用いられる間葉系幹細胞の品質保証評価に有効な遺伝子発現の解析

研究課題名(英文) Differential gene expression of mesenchymal stem cells derived from bone-marrow and synovial-tissues

研究代表者

江面 陽一 (EZURA, Yoichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50333456

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)：ヒト間葉系幹細胞を用いた再生医療の有効性と安全性を保障する、実用的な「品質保証の指標」の確立を目指して、骨髄および滑膜由来の間葉系幹細胞の様々な遺伝子の発現相違について比較解析した。このような発現相違はマウス由来の同等の細胞においても共通した傾向の見られることが証明され、それらの遺伝子における既知の機能は、滑膜由来細胞の軟骨細胞分化能が高いことに寄与する可能性を推定させた。そこでこれらの複数の遺伝子の発現レベルから培養系における軟骨細胞分化能を推定し、有効な「品質保証」の使用として利用できるか否かについて検討した。また軟骨再生医療に際して望まれない、異所性骨化の可能性についても検討した。

研究成果の概要(英文)：Appropriate "quality check (QC)" of mesenchymal stem cells (MSC) for regenerative therapy requires practical and quantitative marker set. Here, to establish such marker set, we investigated the profiles of gene expression in human MSCs derived from bone-marrow and synovial-tissues. By clarifying that mouse stromal progenitor cells derived from bone-marrow and synovial-tissues also showed similar differential pattern of the gene expression to that observed in human MSCs, we explored the marker set that would predict the in vitro chondrogenic potentials of the MSCs and stromal progenitor cells. Also, the potential for the unwanted ectopic calcification was evaluated by in vitro culture assays and gene expression.

研究分野：骨代謝学

キーワード：間葉系幹細胞 組織間質細胞 間葉系前駆細胞 軟骨細胞分化能

1. 研究開始当初の背景

ヒト間葉系幹細胞を用いた再生医療が十分に現実的となった今世紀において、その有効性と安全性について十分な検証を経ずに行われうる未承認の再生医療実施を制限するため、実用的な品質保証の指標の必要性が指摘されてきた。

臨床応用される自己組織由来の間葉系細胞の安全性については、各種病原菌やウイルス等の混在可能性についての検査評価が検討され、培養および移植後の腫瘍原性についても分子遺伝学レベルの検討が行われて成果を上げている。一方で、調整された細胞の再生医療への有効性を保証する「品質評価」の判断基準としては、細胞膜表面抗原の検出性の有無からの判断が従来的には利用されてきたが、このような質的な評価に基づく決定が十分に有効な治療成績を保証するものとは考えられていない。

ところで申請者らは本研究の提案時までに、由来組織の異なる様々な間葉系幹細胞の遺伝子発現プロファイルをすでに検討していたが、その遺伝子発現プロファイルが、その細胞の由来した元来の組織性質と関係深いパターンを示すことを見だし、組織再生能力との関連性を推定していた。このような間葉系幹細胞が元来潜在した組織における再生能力を保有しているのならば、その能力を反映する細胞性質は、由来組織に特徴的な遺伝子発現様式に反映されると考えられ、そのような性質こそが、目標とする組織再生能力を表わす有効な「品質評価基準」となる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上記の仮説に基づき、間葉系幹細胞の由来組織の性質を反映する特徴的遺伝子をヒトおよびマウス細胞から同定して、多数検体における再現性と機能性の検証を元に、細胞機能の評価に適した遺伝子群を利用した「品質評価基準」の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究計画は、ヒトおよびマウスの骨髄および滑膜組織などから採取した間葉系前駆細胞を用いて、網羅的な遺伝子発現の解析と細胞分化誘導アッセイを行なった。ヒトおよびマウスにおいて細胞分化能と相関して発現する特徴的遺伝子群を由来組織別に選出して、その再現性と統計学的な寄与度を評価することにより、再生医療に用いられる間葉系幹細胞の品質保証を可能とする数理的指標の確立を目指した。

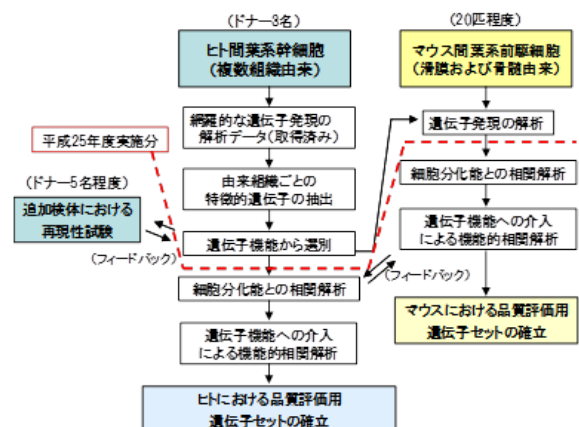
まず初年度(平成25年度)には、ヒト間葉系細胞における網羅的な遺伝子発現解析のデータを入念に再評価した。またマウスの間質由来前駆細胞として骨髄間質細胞と滑膜由来細胞に加えて、半月板由来細胞や靭帯由来細胞の評価を行ない、由来組織に特徴的な遺伝子群を選別した。骨髄由来細胞と滑膜

由来細胞については、ヒト間葉系幹細胞において実施した網羅的発現解析と同様に、アフィメトリックス社のプラットフォームを用いた網羅的発現解析を行い、その結果をヒト間葉系幹細胞における結果と照合して比較検討した。

平成26年度には、これらの遺伝子の発現レベルの相違の再現性について、マウスの各種組織由来の間葉系前駆細胞における遺伝子発現について、定量的RT-PCR法によって検証を行った。またヒト間葉系幹細胞についても、骨髄および滑膜由来の各細胞について複数検体で検討した。特に注目すべき遺伝子群として「軟骨分化の転写因子」「軟骨発生制御に重要とされる液性因子の分子伝達機構関連因子」「軟骨細胞特異的因子(細胞外基質蛋白質)」に注目した。

平成27年度にはこれらの因子の発現相違を多数検体における再現性と相違性に注目し、このような相違に基づく軟骨細胞分化能との関連性を探索した。この検討にあたって、由来組織におけるこれらの遺伝子群の発現レベルとの相関についても検討した。なお、本研究は軟骨系組織の再生医療へ応用する滑膜由来間葉系幹細胞の品質評価を主目標としたが、骨分化能の相違についても検討した。滑膜由来細胞の骨分化能は骨髄由来間葉系幹細胞に比べて低く、このことは組織石灰化における貢献が低いことと関連性が想定された。様々な組織由来の間葉系幹細胞は、組織潜在性の修復治療の役割を担う細胞と認識されるため、培養系における骨分化能の比較は、再生医療時には望まれない異所性骨化の可能性についての評価系となると考え、検討を行った。インビトロにおける細胞分化能との関連性を検討し、遺伝子発現の介入による機能的貢献度の評価と、品質評価基準としての再現性の評価を統計学的に検討して、現実的な評価基準の作成を試みた。

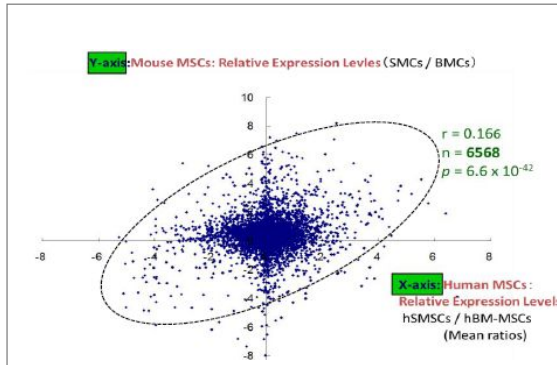
(図1) 研究計画のフローチャート(当初の計画図)



(細胞分化能の評価として軟骨細胞分化能と骨分化能を評価した)

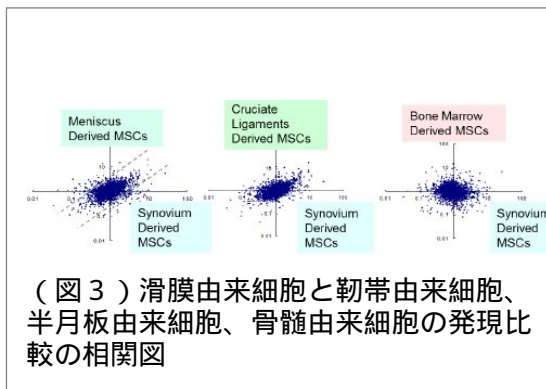
4. 研究成果

ヒト間葉系幹細胞による再生医療の実現化に必要とされる「品質評価基準」を決定するため、まず初年度には、マウス骨髄および滑膜由来の間質前駆細胞の網羅的な遺伝子発現の比較解析を行い、ヒト骨髄および滑膜に由来する間葉系幹細胞における比較解析との共通性を検証することによって、骨髄および滑膜に由来する前駆細胞の遺伝子発現様式に、種を超えた共通性が潜在することを明らかにした(学会発表)。



(図2) ヒトおよびマウス細胞における骨髄由来細胞と滑膜由来細胞の発現相違の類似相関性

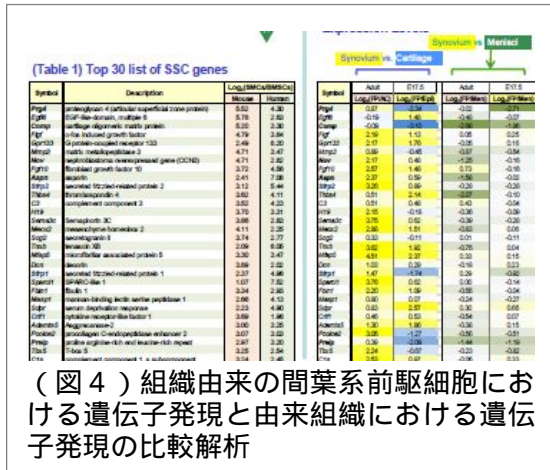
このような共通性を示す遺伝子発現を示した遺伝子群の特徴として、(1)「軟骨細胞への分化潜在性」を反映する、軟骨基質構成分子の遺伝子と転写因子群、(2)発生過程における軟骨細胞の分化および増殖制御に重要とされる「ヘッジホックシグナルの伝達制御」に関わる分子群、(3)同様に骨軟骨および関節発生に重要とされる「Wntシグナル制御」に関わる分子群の多数について、ヒトおよびマウスの複数の検体において再現性が証明され、滑膜以外の関節周囲組織として靭帯由来細胞や半月板由来細胞における発現レベルとの関連も明らかにされた(学会発表)。



(図3) 滑膜由来細胞と靭帯由来細胞、半月板由来細胞、骨髄由来細胞の発現比較の相関図

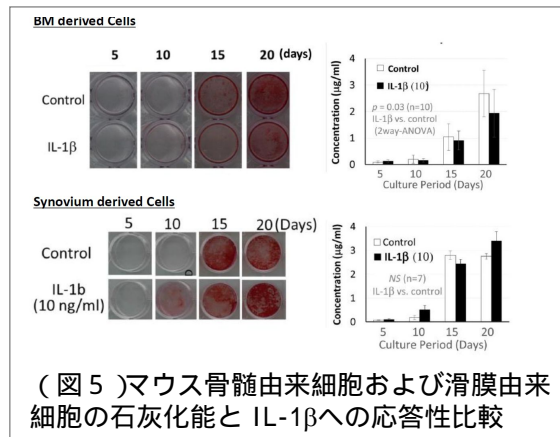
最終年度においては、これらの分子群の発現レベルが、個々の間質前駆細胞の軟骨細胞分化能に、実際に反映されるか否かについて検討し、これらの結果を統合して、軟骨細胞への分化能を反映する、軟骨再生医療に望ましい間葉系幹細胞の「品質評価」

に利用可能な分子指標の確立を目指した。培養系における軟骨細胞への分化能と発現遺伝子マーカーとの相関関係は必ずしも明瞭ではなく、由来組織における遺伝子発現との関係も必ずしも明瞭ではなかった(学会発表)。したがって、この分子指標による評価の有効性の判定については、今後の検討がさらに必要であることが明らかとされた。



(図4) 組織由来の間葉系前駆細胞における遺伝子発現と由来組織における遺伝子発現の比較解析

一方、骨髄由来細胞に比して骨分化能の低い滑膜由来細胞において発現の低い遺伝子についても検討し、骨分化能の相違との関連について培養系で検討した。さらに軟骨再生医療の実施に際して望ましくない現象として、異所性骨化の発生する可能性について、推定される分子機序としての炎症性サイトカイン IL-1βの影響を検討した。IL-1βは骨分化誘導時の骨芽細胞分化を中程度抑制したが、それと同時に軟組織の石灰化抑制機構としての細胞外ピロリン酸合成等を抑制することで、石灰化はむしろ促進される傾向のあることが明らかにされた。このような傾向は滑膜由来間質細胞においても骨髄由来間質細胞とほぼ同等に見られることが示されたため(発表論文、学会発表)、今後の再生医療において留意すべき性質と考えられた。異所性石灰化を生じやすい細胞性質の評価基準の検証については今後の課題とされた。



(図5) マウス骨髄由来細胞および滑膜由来細胞の石灰化能と IL-1βへの応答性比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ezura Y*, Lin X, Hatta A, Izu Y, Noda M. Interleukin-1 β suppresses the transporter genes *Ank* and *Ent1* expression in stromal progenitor cells retaining mineralization. *Calcif Tissue Int* (受理) 2016

〔学会発表〕(計 4 件)

Ezura Y, Hatta A, Lin Xin, Yayoi Izu, Hayata T, Noda M. Interleukin-1 β suppresses expression of osteoblastic genes as well as the regulators of ecto-nucleotides and pyrophosphate that negatively regulate bio-mineralization in mouse bone marrow stromal cells (Poster). 2015 ASBMR annual meeting, Seattle, USA, Oct 8-12, 2015

Ezura Y, Hayata T, Takuya N, Sekiya I, Noda M. Preferentially expressed genes in synovium derived stromal cells include atypical genes not expressed highly in mouse synovium but in embryonic cartilages (Poster). 2014 ASBMR annual meeting, Houston, USA, Sep 12-15, 2014

Ezura Y, Hayata T, Takuya N, Sekiya I, Noda M. Identification of Differentially Expressed Genes in Mesenchymal Stem Cells Derived from Synovium, Meniscus and Ligament (Poster Sessions). 2013 IBMS Kobe, Japan, May 28-Jun 1, 2013

Ezura Y, Hayata T, Takuya N, Sekiya I, Noda M. Genes significantly highly expressed in synovium derived stromal cells than in bone marrow derived cells are conserved both in mouse and human, and may contribute to higher potential for chondrogenic differentiation (Poster Sessions). 2013 ASBMR annual meeting, Baltimore, USA, Oct 4-7, 2013

〔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〕

ホームページ等：特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江面 陽一 (EZURA, Yoichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50333456

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

関矢 一郎 (SEKIYA, Ichiro)

東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10345291