

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640109

研究課題名(和文)人為的リプログラミング法を用いた間葉系幹細胞制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanisms of mesenchymal stem cells by screening cDNA library

研究代表者

栗崎 晃 (Akira, Kurisaki)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：60346616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト間葉系幹細胞は科学的には良く理解されていない細胞集団であるため、本研究では間葉系幹細胞を制御する遺伝子の探索を試みた。また、昨今新たに報告された細胞表面マーカーを活用した評価方法についても検証を試みた。その結果、間葉系幹細胞を制御する遺伝子についてはスクリーニング系の選択圧が十分最適化することができず、制御因子の同定に未だ至っていないが、新たな細胞表面マーカーとして最近報告されたSSEA-3陽性に関しては、ヒト間葉系幹細胞はモデルマウスを用いて評価したところ、難治性潰瘍組織の再生に良好な治療効果が期待できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cell is one of the expected cell source for the regenerative medicine. However, the regulatory mechanism and useful markers for the ability is not well characterized. In this project, we explored the regulatory genes that could control cell proliferation and differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. In addition to this, we also examined the recently reported cell surface marker, SSEA-3 using skin ulcer model mice. Unfortunately, we had a difficulty to optimize the screening conditions to identify the regulatory genes for cell proliferation and differentiation ability of mesenchymal stem cells. As for the cell surface marker SSEA-3, we have observed that promising therapeutic potential of SSEA-3-positive Muse cells in this mouse model.

研究分野：幹細胞

キーワード：間葉系幹細胞 遺伝子 表面マーカー 再生

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は骨髄や脂肪等の成体間葉組織に微量に存在し、*in vitro* で骨、脂肪、軟骨等へ分化する。また *in vivo* では、液性因子を介した一過性の免疫調節作用や血管新生を伴う組織再生促進作用により、自己免疫疾患等の慢性炎症疾患に対して改善効果を示す。しかし、間葉系幹細胞は、僅か数継代の培養で上記能力を失うことから、未分化状態での長期培養は難しいことが知られている。また、間葉系幹細胞は様々な接着性の間葉組織に由来する細胞の混合物から構成される初代培養細胞であり、ロット差が大きく、その分化能力を評価するのに適切な評価マーカーもあまり知られていない。そのため臨床応用が期待されているにもかかわらず、その適切な品質管理が容易ではなく問題となっている<sup>1)</sup>。また、現行の間葉系幹細胞の表面マーカーは、血球や血管内皮細胞などと区別するためのものであり、繊維芽細胞でも発現しているものである。このように、臨床試験が繰り返され、実用化が期待されているヒト間葉系幹細胞は、科学的にはあまり良く理解されていない細胞集団であることが問題とされている。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、このように性質が変化する初代培養の細胞集団という難しい細胞を評価するため、間葉系幹細胞を制御する遺伝子をスクリーニングすることで、間葉系幹細胞の実体に分子生物学的に迫ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

間葉系幹細胞は、長期間培養するとその分化能を喪失し、やがて増殖能も喪失することが知られている。そこで、十数継代して増殖能さえも喪失した間葉系幹細胞を材料に、そ

の増殖能、分化能などを復活させる因子を同定することで、間葉系幹細胞を制御する因子を同定することを試みた。遺伝子として産総研の保有するヒト完全長 cDNA 混合物をレンチウイルスに導入したものをを用いて、市販のヒト脂肪由来間葉系幹細胞を十数継代して増殖が停止した細胞に感染させ、増殖が回復した細胞集団のゲノム DNA から挿入配列を PCR で回収する。この cDNA 断片をレンチウイルスベクターに再度挿入してウイルスを作製し、これを増殖停止した間葉系幹細胞に再び感染させ、増殖能、分化能などが回復した間葉系幹細胞となりうるか検討する。その後、上記のウイルス感染 cDNA 回収のステップを繰り返して間葉系幹細胞の表現型を回復する遺伝子を濃縮し、シーケンス解析することにより、間葉系幹細胞を制御する因子を同定するアプローチを試みた。同定した各因子を、単独、または、組合せて増殖停止した間葉系幹細胞に再び導入し、増殖能、分化能などを保持した間葉系幹細胞を作り出せるか検証した。具体的には、細胞増殖速度、骨・軟骨・脂肪への分化能を市販の分化培地で測定した。また、効果のある因子が同定された場合には、さらに炎症抑制性サイトカインの発現やシグナルメディエーター、血管新生や組織再生に係る因子の発現を、遺伝子発現や免疫染色、ELISA 等で解析することとした。さらに、これらの遺伝子導入手法による実験系の他に、昨今新たに報告された細胞表面マーカーを活用した評価方法についても検証を試みた。

## 4. 研究成果

市販ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞について 10% ウシ胎児血清存在下で長期に培養し、細胞増殖能が低下した細胞集団を調製した。細胞は Life Technologies 社の STEMPRO® - Human Adipose-Derived Stem Cell

Kit を用いたが、予想に反して血清含有培地を用いても長期にわたって細胞増殖能は低下せず、結局、増殖速度が低下した細胞を得るのに20継代培養した。その状態の細胞で市販分化培地を用いて骨分化能や脂肪分化能を評価してみたところ、大幅な分化能の低下が見られたものの、完全な分化能の喪失には至っていないことが確認された。これらの細胞に前述の1600種類のヒト完全長cDNAレンチウイルスの混合物を感染させ、更に培養後、増殖能が復活するか評価した。その結果、コントロールGFPUイルスを感染させたグループと比較して、cDNAレンチウイルスの混合物を感染させた群で優位に増殖が回復したロットが観察された。一方、骨分化能や脂肪分化能に関しては、有意な分化能の回復は見られなかった。

次にこれらのロットの細胞集団からゲノムDNAを回収しPCRでcDNA部分を増幅後、再度レンチウイルスベクターに挿入し増殖能の復活を評価した。しかしながら回収したcDNA混合物では間葉系幹細胞の増殖能の復活は観察されなかった。

次に上述のcDNA混合物には増殖性の細胞とそれ以外の細胞集団の混合物からcDNAを回収していることが原因である可能性を考えて、レンチウイルスを感染させ増殖能が回復したロットの細胞集団を低密度で播種し、新たに形成された細胞のコロニーのみをピックアップし、そこから回収したcDNA混合物について細胞増殖能復活性を評価した。しかしながら、コントロールGFPUイルスのみでも若干細胞増殖が見られ、回収cDNA混合物を感染させたグループと大きな差が見られなかったことから、回収したcDNA混合物に目的とする間葉系幹細胞制御因子が含まれている可能性が低いと考えられた。また、回収されたcDNAの配列情報も確認してみたが、特定の遺伝子が濃縮されている現象が観察され

なかった。コントロールGFPUの発現割合から感染効率は少なくとも70%以上と考えられたことから、本研究での問題点として、間葉系幹細胞の増殖低下や分化能の喪失が不完全で、本スクリーニング系が十分な選択圧のある評価系に至っていない可能性が考えられた。今後、間葉系幹細胞の制御因子を同定するためにはさらなる厳格な評価系の最適化が必要と考えられる。

一方、最近ヒト間葉系幹細胞集団に含まれるサブpopulationでSSEA-3陽性細胞の細胞集団であるMuse細胞が高い分化能を有していることが報告されている。Muse細胞の増殖能は高くないが、その高い分化能と損傷部位にリクルートされ自発的に損傷組織に分化すると報告されている<sup>2)</sup>。そこで、難治性潰瘍のひとつである糖尿病性潰瘍モデルマウスを作製し、ヒト脂肪組織由来SSEA-3陽性細胞の治療促進効果を検証した。その結果、SSEA-3陽性細胞を濃縮した細胞集団では非陽性細胞集団と比較して明らかに高い創傷治癒促進効果が観察された。マイクロアレイ解析の結果、SSEA-3陽性細胞では特に、VEGF、PDGFなどの血管増殖因子やSDFなどの幹細胞のリクルートや増殖、活性化に関わる因子、TGFなどの炎症抑制に関わる因子が高発現していることから、これら液性因子による組織再生促進効果も関与していることが示唆された。

## 引用文献

- 1) Bieback et al, "Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction" *J Mol Med* 90, 773-782 (2012).
- 2) Kuroda Y, Kitada M, Wakao S et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 8639-8643 (2010).

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 2 件)

1. Therapeutic Potential of Adipose-Derived SSEA-3-Positive Muse Cells for Treating Diabetic Skin Ulcers.

Kinoshita K, Kuno S, Ishimine H, Aoi N, Mineda K, Kato H, Doi K, Kanayama K, Feng J, Mashiko T, Kurisaki A, Yoshimura K. Stem Cells Transl Med. 2015, 4(2):146-155.

2. N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation.

Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, Umezawa A, Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A. Biochem Biophys Res Commun. 2013, 438(4):753-759.

〔学会発表〕(計 1 件)

ヒト羊膜間葉細胞およびヒト羊膜上皮細胞の特異的遺伝子の発現解析

石嶺 久子、渡邊 加奈子、小久保 謙一、柿沼 祐子、加茂 功、田島 綾子、望月 純子、海野 信也、小林 弘祐、桜川 宣男、浅島 誠、栗崎 晃 第13回産総研・産技連 LS BT 合同研究発表会 2014年2月18日-19日(つくば)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗崎 晃 (Akira Kurisaki)

独立行政法人 産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長  
研究者番号：60346616

(2)研究分担者

高田仁実 (Hitomi Takada)

独立行政法人 産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究員

研究者番号：80641068

石嶺久子 (Hisako Ishimine)

独立行政法人 産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・産総研特別研究員

研究者番号：90736737