

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670181

研究課題名(和文) ヒト間葉系幹細胞の心筋誘導因子の同定と誘導効率の改善 新しい免疫細胞の関与 -

研究課題名(英文) Identification of Cardiomyogenic Factor and Improved Efficiency of Cardiomyogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells(MSCs)- Participation of new immune cells -

研究代表者

肥田 直子 (HIDA, NAOKO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70360112

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)：我々はこれまで、羊膜由来間葉系細胞が高い免疫寛容能及び心筋分化能を持つことを示してきた。本研究では、ヒト脂肪組織及び骨髄由来間葉系細胞と羊膜由来細胞の遺伝子発現解析を行い、それを比較して羊膜由来細胞の特性を示す遺伝子の抽出を試みた。羊膜由来細胞は、主として上皮系細胞と間葉系細胞のヘテロな集団であり、それらを分離した上で検討を行った。その結果、羊膜由来細胞特異的に発現の高い複数の遺伝子を見出した。何れの遺伝子も心筋分化に直接的な関与しているものではなく、免疫系及び炎症の調節に関係する遺伝子が含まれていた。この結果は、羊膜由来細胞は免疫寛容能が高いとの我々のこれまでの報告を支持するものであった。

研究成果の概要(英文)：Human MSCs have been isolated from bone marrow, adipose tissues, cord blood, amniotic fluid, amniotic membrane, placentae, and umbilical cord tissues. Especially, amniotic membrane derived cells have the potential to differentiate into various tissues, and they are immunologically privileged and produced only minimal immune reactivity. In this study, we performed gene-expressing analysis of two types cells derived from human amniotic membrane, amniotic epithelial cells and mesenchymal stromal cells, and compare the expression data with that of human adipose tissue- and bone marrow derived mesenchymal stem cells. In the result, we found the some genes of amniotic epithelial cell- or mesenchymal stromal cell-specific expression, including the immune system and inflammation-related genes.

研究分野：幹細胞工学

キーワード：ヒト間葉系細胞 羊膜 心筋分化 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

難治性心不全の根本治療は心臓移植であるが、日本において、そのドナー不足は深刻な問題となっている。近年iPS細胞の登場で国民の再生医療への注目が高まり、加えて山中教授のノーベル賞受賞により今後の再生医療の主軸はiPSになることは間違いないであろう。しかしながら、拒絶反応を持たない胚性幹細胞・iPS細胞は臨床現場で利用されるには、難題が山積している。それに対して私どもの研究室では、以前より心臓再生医療の臨床応用に向けた間葉系幹細胞の研究を遂行してきた(Makino, *JCI* 1999, Takeda *J Gene Med*, 2004)。だが、残念ながら心筋再生効率が著しく低かったことを受け、多くの研究者はこのテーマから離れて行った。そのような中で我々は、妊娠関連組織から得られる間葉系幹細胞の心筋分化能力が骨髄に比して30倍から300倍高い事を証明し(Nishiyama, *Stem Cells*, 2007/ Okamoto, *Exp Cell Res*, 2007/ Hida, *Stem Cells*, 2008/ Tsuji *J Am College Cardiol*, 2008)、間葉系幹細胞の可能性を再認識させた。そして、一連の研究結果より「骨髄間葉系幹細胞の心筋誘導効率が低いのは、細胞本来の能力を引き出すための培養条件を、誰も探索していなかっただけなのではないか」との結論に至った。間葉系幹細胞から心筋を誘導する方法は、心臓に直接打ち込むか(in vivo)、我々の提唱する、胎児マウス培養心筋細胞との共培養(特許国内2005-015539/国際2006-078034)しかない。この独自のアッセイ系を用いて、心筋誘導効率をあげる培養方法の研究を行い、養条件の工夫や薬剤の添加で骨髄間葉系幹細胞の心筋誘導効率を劇的に改善させる事ができた(Ikegami, *Artificial Organ*, 2009/ Shinmura, *J Am College Cardiol*, 2009/ tsuji, *Circ Res*, 2010/Shinmura, *Stem Cells*, 2011/ Numasawa, *Stem Cells*, 2011)。

だが、その際もマウス心筋培養細胞との共

培養は必須であった。そこで「共培養に含まれる決定的な心筋誘導因子を同定し適切に補充する事で十分な誘導刺激を行えば、ヒト間葉系幹細胞本来の能力を引き出せるはず」と確信し、一連の膨大な予備実験から、「共培養で生じている強いアロ刺激に対する免疫反応が、心筋誘導に重要な役割を果たしている」という着想を得た。予備実験により、免疫抑制剤の投与で、共培養の心筋誘導効果が完全に抑制されるというデータを得た。これらをもとに、本研究で、「ヒト間葉系幹細胞を心筋誘導させる環境・胎児マウスとの共培養実験系で、ヒト間葉系幹細胞の心筋誘導の機序を同定し、再生心筋細胞数を増加させる」という試みを開始する。

2. 研究の目的

- ①間葉系幹細胞の有用性を示す。
- ②科学的な興味を満たすだけでなく、普遍的な治療法としての再生医療を完成させる。
- ③多くの心不全患者の治療に即座にフィードバックすることで、確実に社会に貢献する。以上のことを目的としている。

3. 研究の方法

(1)細胞の採取

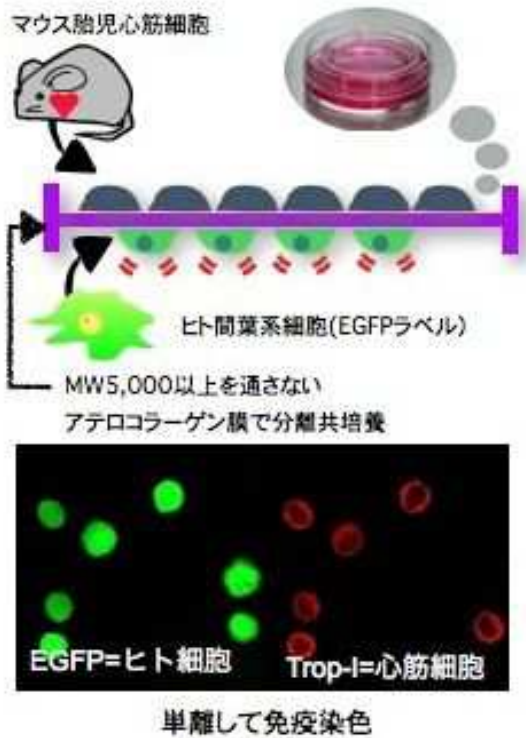
今回の間葉系幹細胞を調製する羊膜組織は、倫理委員会の指針に従い、慶応義塾大学産婦人科で帝王切開手術を受け、且つ同意を得られた者より提供された。

得られた羊膜組織を先ず 0.05% Trypsin-EDTA (5ml/g)で浸し、37°C60分振盪することで、上皮細胞のみを単離したのち、残った組織を再び 0.2% collagenase+0.05% DNase I (10ml/g)で 37°C 60min 処理し、間葉系の細胞を単離した。

単離直後に、両分画の細胞の一部を上皮特異的発現タンパクである CD326(Epithelial cell adhesion Molecule)抗体にてラベルし、FACSで陽性率を算出した。

(2) 胎児マウス培養心筋細胞との共培養

図1: in vitro心筋誘導アッセイ



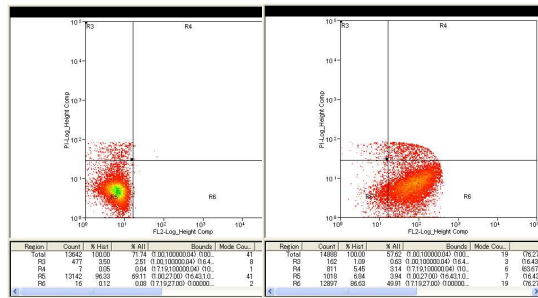
(3) 心筋誘導効率を上げる薬剤添加

免疫抑制サイトカインのインターロイキン-10(IL-10), 既に心筋分化を誘導するとの報告がある下垂体後葉ホルモンのオキシトシンそして発生時に重要で、成体においては免疫、炎症あるいは細胞の増殖や分化に関係しているとされている低分子量タンパク質のミッドカインを 10ng/ml でそれぞれ 48 時間添加した群と何も添加しない群 (FACS 後に直ちに RNA を抽出した非培養群と添加した群と同様に培養した群の 2 群) に分け、それぞれの遺伝子発現レベルをアレイ解析にて比較した。

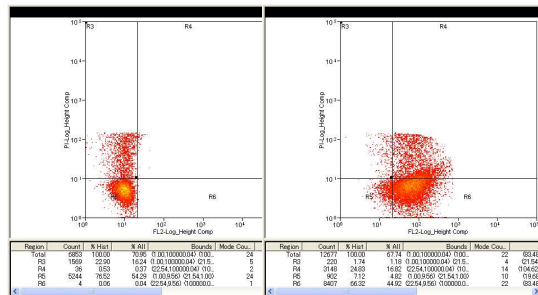
4. 研究成果

0.05% Trypsin-EDTA のみで処理し、単離した細胞分画の CD326 陽性率は FACS 解析の結果 90%以上であった。

図2 酵素処理にて単離した羊膜細胞のフローサイトメトリーによる解析結果



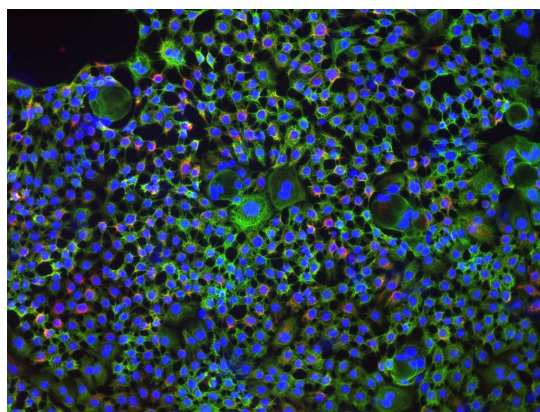
0.05%トリプシン処理のみ



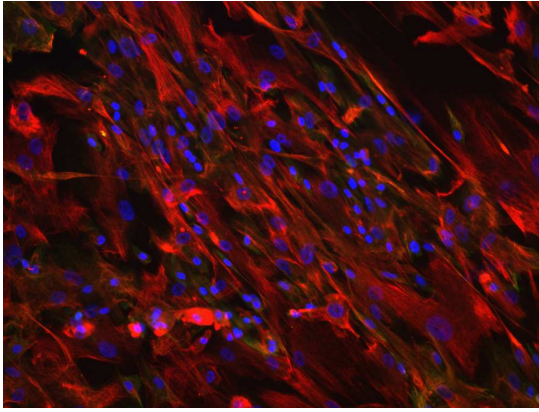
0.05%トリプシン処理後に
0.1%コラーゲナーゼ処理

免疫組織学的評価においても、両細胞群の形状や、たんぱく質の発現パターンは、異なつた。

図3 培養羊膜細胞の免疫組織学的染色結果



0.05%トリプシン処理のみ

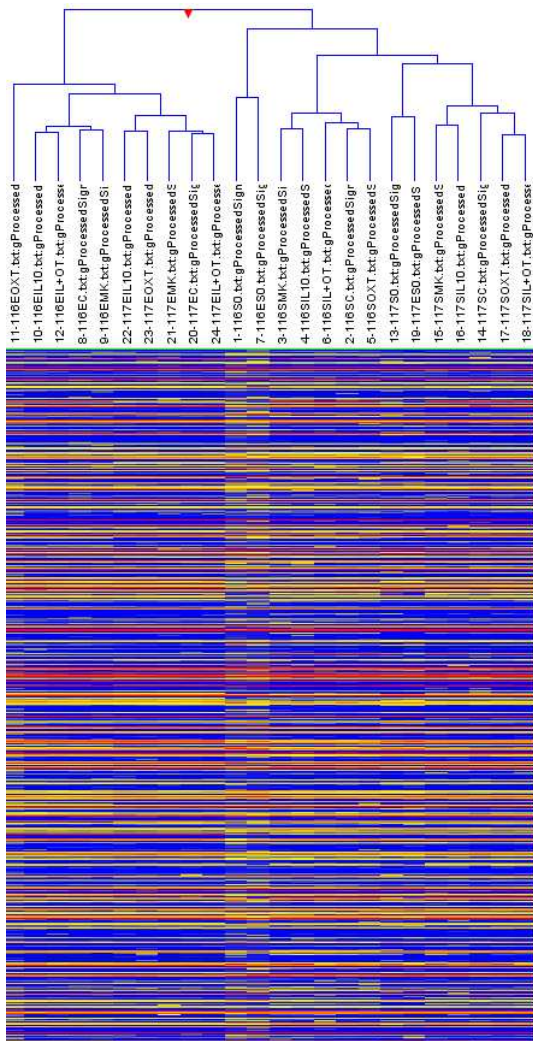


0.05%トリプシン処理後に
0.1%コラゲナーゼ処理

※緑=Pancytokeratin, 赤=Vimentin, 青
=DAPI

クラスター解析から遺伝子の発現パターンは、検体の個体間よりも、上皮と間葉間の差が大きくまた、添加した試薬によっても発現パターンは異なった。

図4 羊膜細胞のクラスター解析



また、これまでに心筋分化が確認されている、ヒト脂肪及び骨髄由来の間葉系細胞

(Mesenchymal Stem Cells: MSCs) と、羊膜由来細胞の遺伝子発現レベルをアレイ解析にて比較した結果において、羊膜由来細胞で特異的に発現が高かった遺伝子は、上皮系細胞で2種類、間葉系細胞で4種類存在したが、何れの遺伝子も心筋分化に直接的な関与が報告されていない遺伝子であった。間葉系の細胞で発現が高かった遺伝子は、免疫系及び炎症の調節に関係する遺伝子であり、この結果は、羊膜由来のMSCsが同じMSCsの中でも、HLA-ABC, HLA-D, HLA-DR 陰性であり、MHCを介したT細胞系の免疫反応に最も抵抗性があるとした我々のこれまでの報告を支持していた。

今回の一連の結果から、羊膜細胞は、移植ツールとして有望であることを確認した。再生医療の提供が法制化され、リスクに応じて手続きが求められるようになった今、リスクの低い間葉系幹細胞を用いた細胞移植治療を臨床応用化するための最重要課題は心筋分化のメカニズムを解明することであるため、更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Watada Y, Yamashita D, Toyoda M, Tsuchiya K, **Hida N**, Tanimoto A, Ogawa K, Kanzaki S, **Umezawa A**: Magnetic response monitoring of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled stem cells transplanted into the inner ear. Neurosci. Res.95;21-26, 2015. 査読有り.

DOI: 10.1016/j.neures.2015.01.010.

2. Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Uchida S, Ota K, Nagashima T, Masuda H, Miyazaki K, Asada H, **Hida N**, Mabuchi Y, Morikawa S, Ito M, Bulun SE, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y, **Maruyama T**: CD34 and CD49f double-positive and lineage marker-negative cells isolated from human

myometrium exhibit stem cell-like properties involved in pregnancy-induced uterine remodeling. **Biol Reprod.** 2015; 93(2): 1-9. 査読有り.

DOI: 10.1095/biolreprod.114.127126.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Itakura Y, **Hida N**, Toyoda M: Characteristic change in the cellular senescence of the multipotent stem cells. ISSCR 2015. Stockholm, Sweden. 2015.6.24-27.
2. 板倉陽子、**肥田直子**、豊田雅士：心臓由来幹細胞の老化に伴う特性変化. 第38回日本基礎老化学会, パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）, 2015. 6. 12-14.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

肥田 直子 (HIDA, Naoko)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70360112

(2) 研究分担者

丸山 哲夫 (MARUYAMA, Tetsuo)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：10209702

(3) 連携研究者

梅澤 明弘 (UMEZAWA, Akihiro)

独立行政法人国立成育医療センター・再生

医療センター・センター長

研究者番号：70213486