

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670106

研究課題名(和文) 組織特異的生着能を有する間葉系幹細胞の探索

研究課題名(英文) The search for mesenchymal stem cells with tissue-specific engraftment potential

研究代表者

弓場 俊輔 (Yuba, Shunsuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：40263248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床研究で骨髄間葉系幹細胞(MSC)の経静脈的全身移植を行った経験から、性質が不均一である移植用MSCの中に、組織へ効率的に生着するような細胞が存在するか否か、明らかにしようと考えた。全身の細胞にGFPを発現するラットの骨髄より蛍光標識されたMSCを採取、それを培養した後、全身に移植したラットの各種臓器から単一細胞懸濁液を、組織破碎装置の利用で、細胞に障害を与えることなく調整するところまでに至った。今後、各種臓器由来のMSCを増殖後、再びラットに経静脈的に移植して標的臓器に生着しうるか検討を続けることとなった。こうした細胞集団が存在すれば、その純化法開発や臨床応用が視野に入るであろう。

研究成果の概要(英文)：From experience that went intravenous systemic transplantation of bone marrow mesenchymal stem cell (MSC) in clinical studies, we thought that trying to clear whether the cells that efficiently engraft to the specific tissue are present in the nonhomogeneous MSC. Firstly, we collected the fluorescence-labeled MSC from bone marrow of rats with systemic expressing GFP and transplanted cultured MSC into another rats systemically. The single cell suspensions from various organs of the transplanted rat were obtained without damaging the cells in use of the tissue dissociator. We are going to decide to whether the MSC derived from various organs can be engrafted in target organs from now on. If these cell populations exist, the purification method development and clinical application would come into the field of view.

研究分野：再生医療

キーワード：幹細胞 組織

1. 研究開始当初の背景

我々は、島根大学医学部附属病院と連携することにより、先天性に骨形成が障害される低フォスファターゼ症に対する骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell ; MSC)移植の臨床研究に取り組んだ。しかしながら、より確実な有効性を得るためには、患者へ MSC を頻回にわたって移植する必要があった。また、移植用 MSC は、骨髄細胞のうち接着細胞を拡大培養する定法によって製造したもので、もちろん、我々も既知の細胞マーカーについては、FACS による解析で、拡大培養した MSC のマーカーがほぼ均一であることを確認しているが、臨床研究において、MSC 移植が頻回に及んだことから、既知のマーカー上では均一と考えられている移植細胞の集団も厳密には不均一であって、临床上、有効性に寄与する細胞の濃度を上げる余地が残されているのではと考えるに至った。

さらに頻回移植が必要だったことは組織への効率的な生着に有効な MSC の濃度をさらに高める工夫が必要であることを示す。そこで、代謝性疾患に対する我々の臨床研究のように全身移植を目的とした場合、それに適した組織特異的生着能を有した MSC が拡大培養した細胞集団に存在するか否か明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

骨髄細胞のうち接着細胞を単に拡大培養した移植用 MSC は、細胞の性質が均一なものであるか否か不明であり、頻回移植が必要だったことは組織への効率的な生着に有効な MSC の濃度をさらに高める工夫が必要である。その基礎的研究として、

- (1) 全身移植を行ったときに特定組織に生着しやすい MSC の細胞集団が存在するか否かを動物への移植実験で明らかにする。
- (2) 動物実験で全身移植後、各組織に分布した MSC の性質が均一か否か、移植実験と細

胞表面マーカーの解析で明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ラット MSC を用いた動物実験を行う。

MSC の全身移植

全ての細胞に緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein ; GFP)が発現するグリーンラット、SD-Tg(CAG-EGFP)の大腿骨骨髄より骨髄を採取、接着細胞として GFP で標識された MSC を拡大培養する。これを所定の細胞数、尾静脈より同系の SD ラットに全身移植する。

各種臓器の摘出

MSC を全身移植後、一定時間後に各種臓器(脳・肺・心臓・肝臓・腎臓・消化管・骨髄等)を摘出する。

この際、移植 1 日後・2 日後等と、比較的短期間で臓器を摘出するよう留意する。ここで摘出に至る時間を置いた場合、生着組織での MSC の分化が誘導される可能性があり、それを避けて各種臓器に到達した直後、未分化状態を保持したままの MSC を回収するためである。

組織細胞の解離

各種臓器の組織を、細胞表面抗原を維持するように穏やかな条件下で酵素処理を行い、ホモジナイザーによる機械的分散で組織細胞を解離し、単一細胞懸濁液を調整する。

GFP 陽性細胞の単離

各種臓器組織に由来する単一細胞懸濁液をさらにセルソータ専用セルストレーナーにかけ、さらに単一化を図る。その後、それぞれの懸濁液を当所が保有するセルソータにかけて、GFP 陽性細胞をソーティングする。

GFP 陽性細胞の培養

各種臓器由来の GFP 陽性細胞を個別に拡大培養し、移植に必要な所定の細胞数を得る。

ここで培養した GFP 陽性細胞に対して、我々がこれまでラット MSC の同定に用いてきた細胞マーカー (CD29・CD44・CD90 陽性、CD45・HLA-DR 陰性) について、我々が保有するセルソータで確認する。

GFP 陽性細胞の全身移植

各種臓器組織由来の GFP 陽性細胞をそれぞれ、と同様、尾静脈より SD ラットに全身移植する。

各種臓器の観察

全身移植した後、と同様の時間を置いて、各種臓器を摘出し、まずは蛍光実体顕微鏡下で GFP の緑色蛍光を発する細胞の有無を観察する。観察時に組織の自家蛍光が障害となる場合は、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学的手法を用いる。各種臓器について組織切片を作製、組織レベルで詳細に解析して、GFP 陽性細胞がそれぞれ由来する元の組織に多数生着しているか否か確認する。

(2) ヒト MSC を用いた動物実験を行う。

前述したように、我々はいち早く骨髄 MSC を用いた再生医療の臨床研究に着手し、現在に至るまで、患者への移植用に培養した MSC の一部を基礎研究にも利用することについて、ドナー (自家移植の場合、患者本人) の同意を得た上で当所にて保存したヒト骨髄 MSC は、40 種類にも及んでいる。このうち、特に病歴に問題がない提供者からのものを選び、本研究に利用する。

(1) で用いるラット MSC 同様、このヒト MSC についても、GFP による蛍光標識を行う。すなわち、GFP 遺伝子を挿入したレトロウイルスベクターをヒト MSC に導入し、ベクター上に存在する薬剤耐性遺伝子 Neo^r も同時に導入されたネオマイシン耐性細胞を選別する。

こうして GFP で蛍光標識したヒト MSC を、平成 26 年度にラット MSC を用いた動物実験と同様、ヌードラット、F344/N Jcl-rnu/rnu に移植する。

以下、(1) のラット MSC を用いた から に至る全ての手順を、ヒト MSC を用いて実施する。

ただし、 の手順においては、我々がこれまで移植用ヒト MSC の確認に多用してきた細胞マーカー (CD13・CD44・CD90 陽性、CD34,・CD45,・HLA-DR 陰性) について、我々が保有するセルソータで確認する。

4. 研究成果

セルソータで MSC を単離するためには、まず、GFP で標識された MSC を用いる必要がある。そのために、全身の組織細胞において CAG プロモーターにより GFP を発現し、緑色蛍光を呈するトランスジェニックラット [SD-Tg(CAG-EGFP)40sb 等] 系統を、研究機関あるいはブリーダー市販動物として入手することを検討し、動物施設において、この導入準備の検討に入った。本研究では、この系統の骨髄から採取、培養した MSC について、セルソータで単離した蛍光標識細胞を移植して、その後の組織分布の解析を考えた。

一方、組織を単一細胞にするために新規設備備品として購入した組織破碎装置 (ミルテニーバイオテック社 gentleMACS Dissociator) について、条件検討を行った。同装置と共に用いる組織分散キットとして、各種組織に適合した酵素試薬があるが、これについて実際のラット組織を試料に酵素処理して細胞にダメージを与えることなく、単一細胞懸濁液を調整できるか種々条件の検討を重ねた結果、組織破碎装置と組織分散キット (同社製) の酵素試薬については、細胞障害を最小限にする条件を確立することができた。

また、処理済みの単一細胞懸濁液について細胞を分離するための新規セルソータ (ベイバイオサイエンス社 JSAN JR Swift) も施設

に導入された。新動物施設が稼働し始め、飼育スペースも確保できたことから、トランスジェニックラット[SD-Tg(CAG-EGFP)40sb]系統(GFPラット)を、まず、ブリーダーの市販動物として導入することとした。標識MSCの蛍光強度を十分確保するため、まず、GFPラット同士を交配することにより、ホモ接合体個体からMSCを単離することとした。

他方、新施設での交配計画を立案している間、これまでにラット大腿骨髄より採取した凍結骨髄細胞と実験手技について検証した。解凍後培養した細胞を、新規に導入したセルソータ(ベイバイオサイエンス社JSAN JR Swift)により分析したところ、ラットMSCを一般的に同定する細胞マーカー(CD29陽性・CD44陽性・CD90陽性、CD45陰性・HLA-DR陰性)に全て合致したことから、今後、移植実験に向けて細胞を単離できる目途が立った。

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 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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弓場 俊輔 (YUBA, Shunsuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号: 40263248

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし