

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850192

研究課題名(和文) 犬の骨髄中脂肪細胞に付着する新規間葉系幹細胞の性状解析と再生医療への有用性の検討

研究課題名(英文) Characterization of canine novel mesenchymal stem cells adhering to adipocytes in bone marrow for clinical application in regenerative therapy.

研究代表者

藤田 直己 (Fujita, Naoki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：10554488

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)：天井培養法により、犬骨髄中の脂肪細胞周囲に付着する細胞から、間葉系幹細胞を得た。この細胞は従来の犬骨髄間葉系幹細胞と比較し、幹細胞特性に優れており、骨髄脂肪細胞周囲細胞(BM-PACs)と命名した。BM-PACsは強力な組織修復因子である肝細胞成長因子(HGF)の分泌能に優れることを明らかにした。皮膚欠損モデルに対して、BM-PACsを局所投与したところ、投与後のBM-PACsにおけるHGF発現を認めた。また、BM-PACsを全身(静脈内)投与したところ、損傷部への遊走能を示した。以上から、炎症を伴う組織損傷に対するBM-PACsを用いた幹細胞療法は、HGFを介した組織治癒効果が期待できた。

研究成果の概要(英文)：We developed novel mesenchymal stem cells from canine bone marrow and named the cells as bone marrow per-adipocyte cells (BM-PACs). BM-PACs attached to adipocytes in bone marrow and have superior potentials as multipotent cells compared with conventional canine bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs). Additionally, BM-PACs showed higher expression of hepatocyte growth factor (HGF), which is known to have great healing effects on injured tissues, than BMMSCs. After locally injected into a mouse skin injury model, BM-PACs migrated toward the injured area and showed HGF expression. In addition, intravenously injected BM-PACs also migrated toward injured area and showed HGF expression. Thus, our results suggest that stem cell therapy using BM-PACs offer a healing effect through the supply of HGF to the injured site.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 犬 骨髄 再生医療

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSCs) は骨髄や脂肪などの生体組織内に存在する体性幹細胞で、体外で容易に増殖し、骨・軟骨・脂肪などの間葉系細胞の他、近年では肝細胞や神経細胞への分化能も報告され、幅広い疾患に対する再生医療のセルソースとして注目されている。申請者らもこれまで、犬の重度脊髄損傷に対する再生医療への利用を目的とし、骨髄間葉系幹細胞 (BMSCs) や脂肪由来間葉系幹細胞 (ADMSCs) を用い、増殖能や多分化能などの幹細胞特性の解析を行ってきた。しかし、形態学的には神経細胞様の細胞へ分化したものの、機能的神経細胞の誘導には至らず、BMSCs は増殖能力が低いなどの課題も明らかになり、幹細胞特性の高い細胞の分離・培養法を確立する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

脂肪組織中の成熟脂肪細胞を天井培養すると、成熟脂肪細胞と同等以上の増殖能・分化能を示す脱分化脂肪細胞 (DFAT) を得られることが報告されており、これを受け、犬骨髄液中の成熟脂肪細胞を同様に天井培養に供したところ、DFAT と異なり、骨髄中脂肪細胞周囲の細胞が接着・増殖し、線維芽細胞様細胞が得られた。この細胞は、BMSC と比較して有意に高い増殖能を示し、骨・軟骨・脂肪への分化能を持つことも確認された。このことは、BMSCs より優れた MSCs が骨髄に存在することを示唆する。本研究では、この細胞の幹細胞特性を BMSCs との比較から明確にし、再生医療のセルソースとして有用であるかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

骨髄中脂肪細胞を天井培養して得られる細胞を骨髄脂肪細胞周囲細胞 (Bone Marrow Peri-adipocyte Cells ; BM-PACs) と名付け、以下の実験を行った。

【研究 1】犬の BMSCs と BM-PACs の幹細胞特性の直接比較

健康ビーグル犬 4 頭の上腕骨から得た骨髄液から、同時に BMSCs と BM-PACs を培養し、それらのコロニー形成効率および表面抗原発現プロファイルと比較した。また、それぞれの骨・軟骨・脂肪分化能について、近年報告されている新たな誘導法を採用し、再検証を行った。

【研究 2】BMSCs と BM-PACs の肝細胞成長因子 (HGF) 発現比較

組織損傷に対する強力な保護・修復作用が報告されている HGF に注目し、BMSCs と BM-PACs の HGF 発現を比較した。また、脊髄損傷部位への投与時における BM-PACs の HGF の分泌能を明らかにするため、BM-PACs を炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β) で刺激し、培養上清中に放出される HGF を

ELISA にて定量した。さらに、放出された HGF の生物学的活性を評価するため、HGF 刺激による Scattering Effect が報告されている犬腎臓上皮細胞株 (MDCK 細胞) を炎症性サイトカイン刺激後の BM-PACs の馴化培地で培養し、Scattering Effect について検討した。

【研究 3】BM-PACs を用いた幹細胞療法の有用性と安全性

BM-PACs が HGF 分泌を介した組織修復能を示すかを、ヌードマウス皮膚欠損モデルを用いて検討した。背部皮膚に全層欠損を作製したのち、BM-PACs の局所および全身 (静脈内) 投与を行った。投与から 4 日後、全身および損傷部における BM-PACs の分布を In Vivo イメージング装置を用いて観察し、損傷部における BM-PACs の HGF を免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

【研究 1】BM-PACs は BMSCs と比較し、脂肪分化能、骨分化能、軟骨分化能いずれにおいても、高い能力を示した (図 1)。また、コロニー形成効率は、BM-PACs と BMSCs でそれぞれ、 $0.032 \pm 0.017\%$ 、 $0.005 \pm 0.005\%$ で BM-PACs で有意に高いコロニー形成能がみられた (図 2)。また、細胞表面抗原発現のプロファイリングでは、おおむね同様の発現パターンであったが、CD73 の発現率において、有意な差が認められた (表 1)。

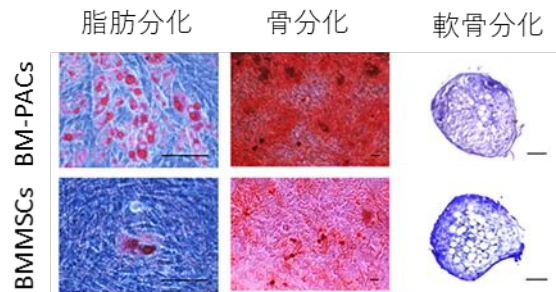


図 1 BM-PACs と BMSCs の脂肪・骨・軟骨分化能比較 それぞれ、各分化誘導条件で培養し、Oil Red O, Alizarin Red S, Toluidine Blue 染色で評価を行っている。

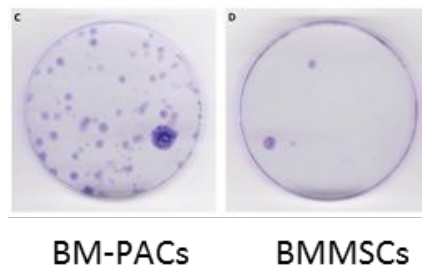


図 2 : BM-PACs と BMSCs のコロニー形成効率比較

	BM-PACs	BMMSCs
CD29	18.5 ± 4.82%	13.21 ± 6.55%
CD44	95.10 ± 4.01%	93.23 ± 4.98%
CD73	14.68 ± 2.38%**	4.88 ± 2.23%
CD90	-	-
CD105	7.39 ± 2.63%	-
CD34	-	-
CD45	-	-

表 1: BM-PACs と BMMSCs の細胞表面抗原発現比較 CD73 の発現率に有意差が認められた。
(** : $p < 0.01$)

【研究 2】BM-PACs は BMMSCs と比較し、HGF タンパク発現が有意に高く (図 3) 炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 の刺激により、HGF 発現が上昇した (図 4)。これらのサイトカイン刺激により、BM-PACs の HGF 分泌能は 50 倍以上上昇した (図 5)。BM-PACs の馴化培地により MDCK 細胞では HGF 受容体である c-Met のリン酸化が亢進し (図 4) Scattering Effect が観察された (図 5)。

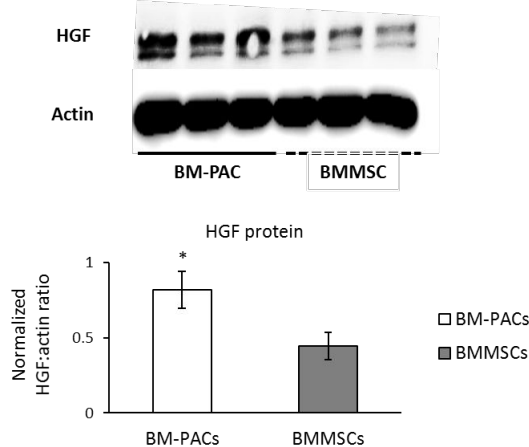


図 3: BM-PACs と BMMSCs の HGF タンパク発現比較 (ウエスタンブロットによる)

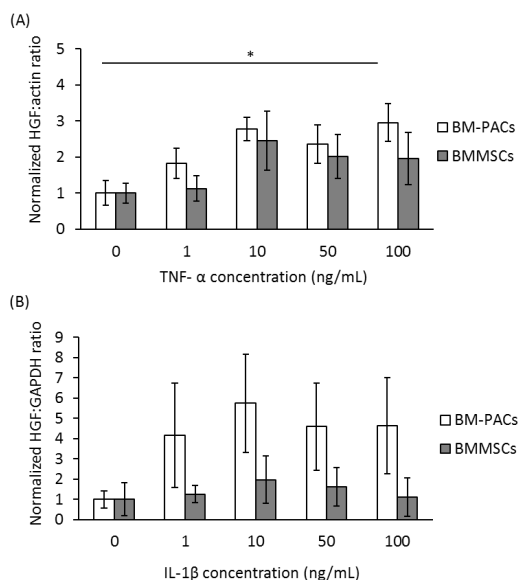


図 4: NF- α (A) および IL-1 (B) 刺激による BM-PACs および BMMSCs の発現変化

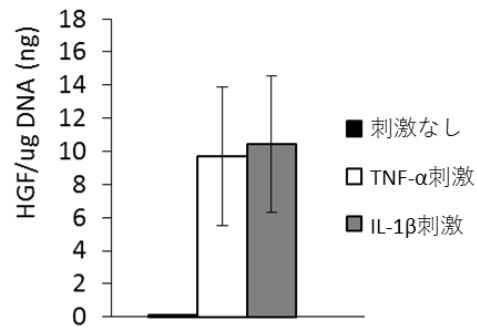


図 5: TNF- α および IL-1 刺激による BM-PACs の HGF 分泌量の変化

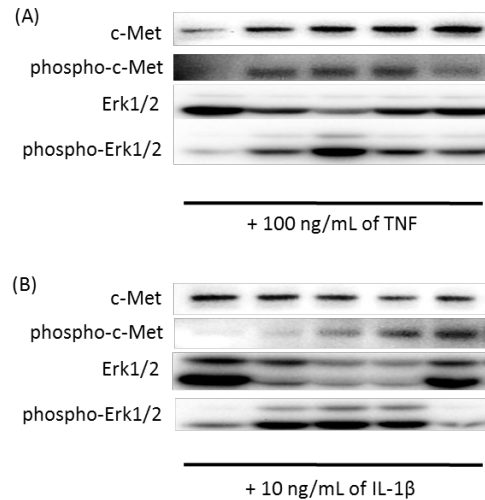


図 6: TNF- α および IL-1 刺激を行った BM-PACs の培養上清を MDCK 細胞に添加した。いずれも、c-Met のリン酸化が亢進した。

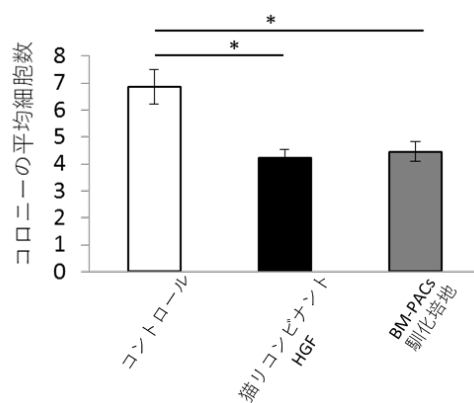


図 7: BM-PACs 馴化培地による MDCK 細胞の Scattering Effect 通常培地に TNF- α 刺激を行った BM-PACs の培養上清を添加したところ、猫リコンビナント HGF (50 ng/ml) と同等の Scattering Effect を得た。

【研究 3】細胞投与後 4 日目に、局所投与だけではなく、全身投与された BM-PACs も損傷部に到達した (図 8)。免疫組織学的評価により、損傷部周囲に HGF が集簇しており、HGF 発現を認めたことから、損傷治癒効果が期待された (図 9)。また、静脈内投与後の細胞の多くは、肺にトラップされることから、投与細胞数の増加は、肺静脈の塞栓に至る可能

性が示唆された。

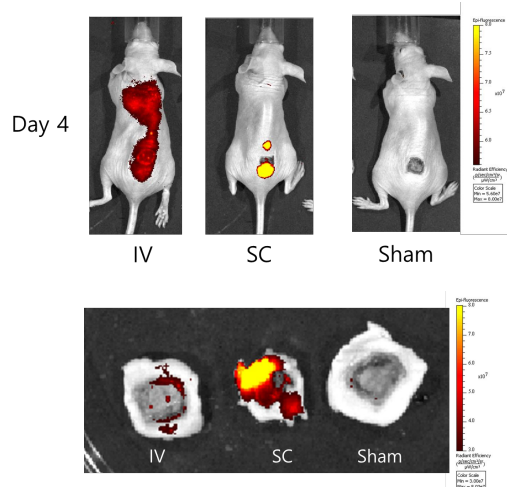


図 8：IVIS による全身（静脈内）投与後の BM-PACs の局在 投与後 4 日目では、全身投与（IV）されたマウスの損傷部位および肺野領域に蛍光シグナルが認められる。IV 群では局所投与（SC）群と比較し、低レベルではあるが、損傷組織内においてもシグナルが認められた。

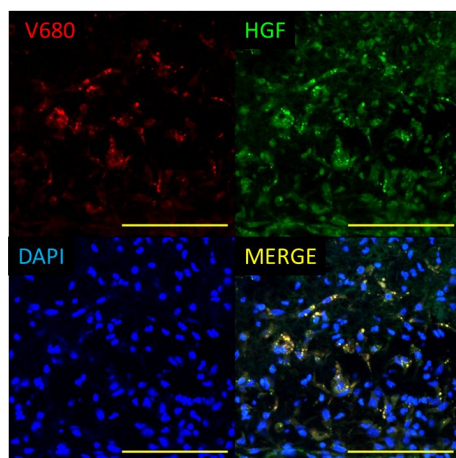


図 9：損傷部周辺領域の組織における免疫組織染色 V680 で標識した BM-PACs が観察され、HGF 発現を認めた。bar = 100 μm

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 1 件）

1. Isolation and Characterization of Multipotent Mesenchymal Stem Cells Adhering to Adipocytes in Canine Bone Marrow. Lin HY, Fujita N, Endo K, Takeda T, Nakagawa T, Nishimura R. Stem Cells and Development. 26(6):431-440. 2017. 査読あり

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 「犬間葉系幹細胞の効率的な軟骨分化条件の検討」、遠藤健太郎、藤田直己、林杏

怡、中川貴之、西村亮平（第 16 回日本再生医療学会、2017 年 3 月、仙台）

2. “Transplantation of canine bone marrow peri-adipocyte cells for acute spinal cord injury in mice” 林杏怡、藤田直己、遠藤健太郎、武田妙、中川貴之、西村亮平.（第 16 回日本再生医療学会、2017 年 3 月、仙台）
3. “TNF- and IL-1 induce hepatocyte growth factor secretion by canine bone marrow peri-adipocyte cells.” 林杏怡、藤田直己、遠藤健太郎、中川貴之、西村亮平（第 15 回日本再生医療学会、2016 年 3 月、大阪）
4. “Ceiling culture of adipose layer isolated from canine bone marrow can generate promising mesenchymal stem cells for regenerative medicine.” Lin HY, Fujita N, Endo K, Nakagawa T, Nishimura R. (Asian Meeting of Veterinary Surgery, 2015 年 11 月、Kuala Lumpur, Malaysia)
5. “Ceiling culture of adipose layer isolated from canine bone marrow can generate promising mesenchymal stem cells for regenerative therapy.” Lin HY, Endo K, Fujita N, Nakagawa R, Nishimura R. (Asian Meeting of Veterinary Surgery, 2014 年 12 月、大阪)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/geka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 直己 (FUJITA, Naoki)

東京大学、農学生命科学研究科、特任助教

研究者番号：10554488