

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09783

研究課題名（和文）再生医療に資する質と量を担保できる真のヒト脂肪由来幹細胞の探求

研究課題名（英文）Research for a genuine human adipose-derived stem cells source that can ensure quality and quantity capable for regenerative medicine

研究代表者

森山 博由（Moriyama, Hiroyuki）

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号：90581124

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：scRNA-seq解析の検索手法を再設定し数理的にクラスター解析を高解像度化した。特定の終末細胞への分化指向性および液性因子等の分泌物質の特徴などの違いなど、特徴的な性状を示す亜集団細胞群を同定した。また、本解析系高詳細化した細亜集団を含めた多項間比較に特化したAI解析プログラムの開発に至った。また、真の幹細胞の性質に近づく知見として、CD34分子の増加や減弱そのタイミングにある種の法則があることを見出した。Pseudo-time解析から、少なくとも縮小集団は2系統の流れ（分化もしくは変容の方向性）に強く影響することも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで未同定かつ未知の真のヒト脂肪組織間葉系間質細胞を詳らかにするものである。よって、学術的にもその意義は高い。また、この幹細胞として美容医療等の臨床に応用されている細胞群は不完全なものであり、安全性に懸念も残る。加えて、形成外科治療などの効果を高めるためには、その科学的な裏付けは不可避である。以上を背景に、本研究のもつ幹細胞の探求とその過程での細胞性状の提示は、臨床への安全性および橋渡しとしての意義に富み、社会貢献の波及効果も大きいものと思われる。

研究成果の概要（英文）：ScRNA-seq analysis methodology was revised, and resolution of 6 clusters was mathematically resolved to higher resolution. As a result, we identified subpopulations of cells that exhibit distinctive characteristics, including differences in differentiation directionality toward specific terminal cells and secretory characteristics, such as vacuolar factors. These results are expected to provide basic knowledge that will be useful for clinical applications. In addition, we have developed an AI analysis program specialized for multinomial comparisons including highly detailed subpopulations of this analysis system. Pseudo-time analysis also revealed that at least the shrinking population strongly influences the flow (direction of differentiation or transformation) of the two lineages.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：脂肪由来間葉系幹細胞 シングルセル解析 インフォマティクス解析 トランスクリプトーム解析 特異的マーカー 分化誘導 3Dプリンティング 組織構築

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

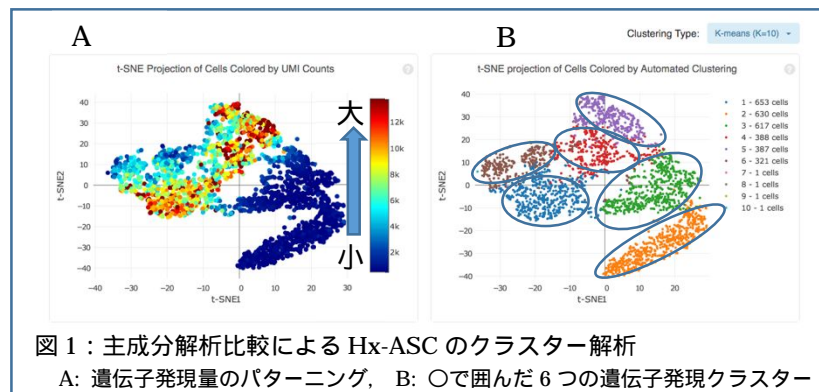
これまで間葉系幹細胞を用いた形成外科学的臨床応用など、間葉系幹細胞を直接的(分化誘導による組織形成など)にも、間接的(患部周辺組織や細胞を補助:マトリクス形成や間質様細胞としての補助など)にも利用した再生医療への試みが続いている。しかしながら、ヒト脂肪組織に由来する幹細胞(hASC)を用いた臨床効果は未だ期待値に届いていない。その障壁にして科学的な未解決課題こそが「hASC そのものが未同定のままにあること」である。現状、当該領域の形成外科治療では、脂肪組織から一般的な間葉系様幹細胞の共通マーカーを頼りに採取した細胞亜集団をヒト脂肪組織幹細胞として分離・利用している。この集団は性質も異なる幹細胞(様)細胞の混合集団であり、つまり、真の脂肪由来の間葉系幹細胞の性状や特性が同定できないがため、当然に臨床効果が際立たないと考えられている。事実、臨床応用を目指す最高機関・国際脂肪研究治療学会(IFATS)においてもhASCの同定は最大の科学的課題として積み残されたままである。近年、我々は斬新な低酸素培養法(特許第6209377号)を開発し、ヒト生体脂肪組織内に存在する間葉系間質/幹細胞に近似した幹細胞亜集団(Hx-hASC)の分離に成功し、その幹細胞性維持のメカニズムの一端も紐解いた。そこで本研究では、高解像度のシングルセルレベル解析を行うことで「より真のhASCの実像に迫り、形成外科学的臨床応用研究の橋渡しとなる基礎研究の成果を導く」ことを目的に研究を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究では、「生体内環境に適応する幹細胞をシングルセルレベルで分離し、その性状を詳細にプロファイリングすること」で、「真の脂肪組織由来間葉系間質幹細胞の同定」を目指す。

我々はこれまでにヒト脂肪組織内の酸素濃度環境に着目した新規低酸素培養法(特許第6209377号)を開発し、この系を用いることで幹細胞性の高いヒト生体脂肪組織内に存在する間葉系間質/幹細胞に近似した幹細胞亜集団(Hx-hASC)の分離に成功している。さらに、このHx-hASCは、Notchシグナルおよび低酸素応答シグナルとの協調による解糖系の代謝制御が中心的な役割を担うことで、幹細胞性(Stemness)に富む性状を獲得していることを明らかとしている(Moriyama H et al. Stem Cell Dev. 2014)。また、このときの低酸素応答メカニズムが脂肪細胞などの間質様細胞への分化指向性の鍵となることも同定している(Moriyama H et al. Stem Cell Dev. 2018)。また、このHx-hASCは、皮膚の表皮組織のメンテナンスや恒常性に寄与すること、真皮に存在する線維芽細胞集団の作用にも匹敵する機能をもつことも明示してきた(Moriyama H et al. Sci Rep. 2019)。さらに、このHx-hASCには、少なくとも多分化能の指向性をもつ特異な亜集団も含まれることも突き止めている(投稿準備中)。そこで、Hx-hASC、一般的な分離法、および生体からすぐに分離した広義のヒト脂肪由来幹細胞(hASC)のそれぞれについて、詳細な

シングルセルRNAシーケンシングを実施し、高精度なトランスクリプトーム解析を行った結果、Hx-hASCには、遺伝子発現レベルで少なくとも特徴的な6つの集団(6クラスター)が含まれることが明らかとなった(図1、未公開データ)。ユニークなのは、本結果の全



てのクラスターは、これまでの間葉系幹細胞(MSC)の定義とされる、(a)プラスチック培養容器に接着すること、(b)CD105, CD73, CD90を陽性マーカー、CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-ClassII(DR)を陰性マーカーとすること、(c)骨、脂肪、軟骨への分化能を有すること、以上の3定義を満たすものの、さらに特徴的な遺伝子プロファイルを示していたことである(未公開データ)。つまり、これらクラスターの詳細な解析が「未だ同定されていない真の脂肪組織由来間葉系/間質細胞の実像」に迫る可能性を有することを示している。そこで本研究では、これらのユニークな間葉系間質幹細胞の6クラスター群についての高解像度の性状解析を行い、真のhASCの実像を詳らかにすることを目的として、研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) シングルセルクラスター解析によって分画化された集団の特性解析

シングルセルRNAシーケンシングにより得られたデータを、より精緻に多項目発現プロファイル解析し、各クラスターに特有の細胞表面マーカーもしくは転写制御因子レベルでの候補遺伝子を選出する。そのために(1-1)トランスクリプトームレベルでの発現解析と候補遺伝子の峻別を行う。単一細胞レベルのトランスクリプトーム発現プロファイルから得られている6つの各クラスターに発現する全てのトランスクリプトーム発現プロファイルを多項解析し、6クラスター間全比較解析を実施する。得られた候補遺伝子を主成分分析解析・カテゴリライズ解析し、定

量的リアルタイム PCR 法を用いて有用遺伝子のバリデーションを行う。続いて、(1-2)タンパク質レベルでの候補遺伝子のバリデーション(検証)を行う。上記(1-1)で得られた候補遺伝子が散大することも想定し、文献レベルでの統計解析も付加したうえ、KEGG 解析やシグナルパスウェイ解析の手法も用い候補遺伝子について統合的に再検証する。そのうえで、細胞表面および膜(オルガネラを含む)に発現する分子、転写レベルで変動が確認出来た転写関連遺伝子を優先し、フローサイトメトリーやウェスタンブロットティング法等を用いてタンパク質レベルでの検証を行う。これにより確認を得られた遺伝子について、ノックダウン法や、CRISPR/Cas9 法(両方法とも研究室で立ち上げ済み)によるゲノムエディティングにて変異細胞を作製する。

(2) シングルセルクラスター解析によって分画化された集団の性状解析

間葉系・外胚葉系・内胚葉系の細胞への分化度を指標に各クラスター分画の幹細胞性状解析をパネル化する。そのために、(2-1)遺伝子導入系の精査とコントロール細胞系列の選定を行う。細胞の分化性に最も影響の与えない遺伝子導入導入と発現系を選定し、同時に、分化誘導性比較のために肝要なコントロール細胞の同定を限定する。続いて、(2-2)間葉系を中心とした 3 胚葉系細胞への分化誘導による細胞性状評価を行う。上記(2-1)で確定した実験系を用い、中胚葉系列(脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞)および関連する細胞外マトリクス産生能や、外胚葉系(神経細胞や表皮細胞系譜など)および内胚葉系(肝細胞や腎細胞系譜など)への分化誘導性や分化後の細胞の基本性質の確認を行う。これにより、各クラスター分画のもつ細胞集団の性状をパネル化する。

(3) クラスター間相互作用と各クラスターのヒト組織生体内分布の解析

(1)で探索し(2)の実証で得た分子およびそのクラスター細胞の絞り込み亜集団を用いて、ヒト皮膚組織(含む皮下組織)における局在解析ならびに 3D バイオプリンティングと複合した 3 次元ヒト皮膚培養系によるクラスター由来細胞群の機能性解析と評価を行う。そのために、(3-1)ヒト皮膚組織(含む皮下組織)における局在の解析を行う。研究方法①~②で得られた責任分子や表面マーカーを指標に、老若男女のヒト皮膚組織(含む皮下組織)の切片を用いた組織学的な局在解析を行う。続いて、(3-2)先鋭的な 3D ヒト皮膚皮下組織構築系におけるクラスター細胞集団の組織学的機能解析を行う。改編 3 次元ヒト皮膚培養評価系および 3D バイオプリンター(研究室で所有)を用いて、各クラスターの細胞亜集団を皮膚組織構築(再構成)系の適所に組み込むことにより、分化誘導性や組織維持(=疑似組織再建)の様態を観察し、ヒト生体内での挙動や機能を模した 3 次元組織構築レベルで評価する。際だった評価の結果が得られた場合、さらに、生成した組織を段階的に NOG マウス等に移植し、in vivo 評価試験にて生体内における生着性等の評価を行う。

4. 研究成果

シングルセルクラスター解析の検索手法を再設定したことにより、数理的に 6 クラスターの分解能をあげ、高解像度化した。それにより、6 クラスターの構成要素たる亜集団の分化能特性の集団化が可能であることが分かった。例えば、CD31-CD34⁺CD45-CD55⁻の亜集団と CD31-CD34⁺CD45-CD55⁺の亜集団および CD31-CD34⁻CD45-CD55⁻の亜集団と CD31-CD34⁻CD45-CD55⁺の亜集団は特定のクラスターを構成する亜集団として、その領域の 85%を占める特徴を有することがわかったが、これらの表現型には、骨細胞への分化能と白色脂肪細胞への分化能への指向性の違い、ならびに軟骨細胞および骨芽細胞(様)細胞への分指向性の違いなど、特徴的な性状を示す亜集団細胞群であることもわかった。また、このようなマーカーで分別される集団が発現する液性因子についても特徴があることが分かった。とりわけ、CD31-CD34⁻CD45-CD55⁻の亜集団には炎症作用を示すサイトカインや血管形成を促進する因子の発現が多く観られるなどの特徴を有することもわかった。このようなマーカーによる分別は、臨床応用への活用に利用できるツールにもなり、またそれらの細胞性状の解析結果は臨床アプリケーションを考えるうえでも有効に機能する基礎知見になるものと考えられる。この他にも、6 クラスターの高解像度分離から見えるパネルの特徴は、たいへん広範かつ詳細な多量のデータを含んでおり、本報告をまとめる段階に於いても、Dry 解析と連携した wet 解析までが終了できていない新知見も山積している。少なくとも、本研究期間内で、高詳細化した細亜集団を含めた多項間比較には想定よりも時間がかかることがわかり、この律速を解消するため、オープンデータベースを活用した AI 解析(deep Learning)手法のプログラミングに着手し、本解析系に特化したフレームの開発に至ったことは、ひとつの副次的な成果と言える。このような細胞の亜集団解析から、真の幹細胞の性質に近づく知見も得た。そのひとつに、少なくとも CD34 マーカーの挙動については注視する必要があることである。クラスター間相互作用と各クラスターのヒト組織生体内分布の解析を進めたところ、3 次元 Bio プリンティングの疑似ヒト皮膚-皮下組織およびヒト皮膚-皮下組織の経時的な組織培養実験において、CD34 分子の増加や減弱そのタイミングにある種の法則があることを見出した。CD34 分子をノックダウンしたうえで同様の実験を行うと、ある特定のクラスターが連動して縮小(数的に激減)すること、ならびに、高詳細の亜集団分別後の疑似時間軸解析(Pseudo-time 解析)の結果と照合すると、少なくとも縮小集団は 2 系統の流れ(分化もしくは変容の方向性)に強く影響することが分かった。結果的に、本研究期間内に真の幹細胞の同定に至らなかったが確実にその歩を進める新知見を提示できたものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Toshiyuki Ozawa, Daisuke Tsuruta, Takao Hayakawa. | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells into Insulin-Producing Cells with A Single Tet-Off Lentiviral Vector System. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell journal | 6. 最初と最後の頁 705-714 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22074/cellj.2022.557533.1063 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 森山博由 (責任著者), 森山麻里子. | 4. 巻 266 |
| 2. 論文標題 ヒト三次元モデル作製の留意点と展望 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Chemical Times | 6. 最初と最後の頁 2-8 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 森山麻里子, 森山博由 | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 健康長寿のカギ握るオートファジー | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 FOOD Style 21 | 6. 最初と最後の頁 89-92 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 坪川涼, 前田祐伽, 伊藤隆志, 出川朋美, 藤倉千鶴, 浅間孝志, 大熊章郎, 沼野香世子, 森山麻里子, 森山博由, 奥村暢章, 八巻礼訓. | 4. 巻 46 |
| 2. 論文標題 ロイヤルゼリーの肌ストレス保護機能の解明と化粧品原料への応用 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 日本化粧品学会誌 | 6. 最初と最後の頁 262-282 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nobuaki Okumura, Takashi Ito, Tomomi Degawa, Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Royal Jelly Protects against Epidermal Stress through Upregulation of the NQO1 Expression | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 12973-12973 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312973 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuto Iwaya, Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama. |
| 2. 発表標題 Epidermal expression of Hes1 plays crucial role of immune response. |
| 3. 学会等名 細胞生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岩谷優音, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. |
| 2. 発表標題 表皮ケラチノサイトに発現するHes1は皮膚における免疫応答に重要な役割を担う. Epidermal expression of Hes1 plays crucial role of immune response. |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 三宅佑有子, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. |
| 2. 発表標題 成体マウス表皮での Hes1 のはたらきについて |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mariko Moriyama, Yuko Miyake, Hiroyuki Moriyama. |
| 2. 発表標題 Epidermal expression of Hes1 regulates immune response. |
| 3. 学会等名 The 47th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 後藤彩文, 森山麻里子, 三宅佑有子, 吉田郁代, 恒松希, 久保嘉一, 森山博由. |
| 2. 発表標題 セージエキスはケラチノサイトからの GM-CSF を抑制することでメラニン産生を減少させる. Salvia officinalis extracts suppress melanogenesis through inhibition of keratinocyte-derived growth factor GM-CSF. |
| 3. 学会等名 143th 日本薬学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森山麻里子, 森山博由. |
| 2. 発表標題 表皮分化制御とオートファジー |
| 3. 学会等名 第一回日本オートファジーコンソーシアムシンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 岩谷優音, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. |
| 2. 発表標題 皮膚創傷の治癒にFoxO3aは重要な役割を担う. |
| 3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 西隼矢, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. |
| 2. 発表標題 脂肪由来間葉系幹細胞はヒト皮膚の恒常性に寄与する. |
| 3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森岡歩夢, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. |
| 2. 発表標題 表皮ケラチノサイトに発現するHes1は皮膚における免疫応答に重要な役割を担う. |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 樋口大樹, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. |
| 2. 発表標題 FoxO3aによるミトコンドリアダイナミクス制御は皮膚の恒常性に重要である. |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 森山博由 |
| 2. 発表標題 再生医療推進に資する幹細胞バンクの留意点. |
| 3. 学会等名 第一回健康長寿再生医療委員会教育研修会.(招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 森山麻里子, 森山博由 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 森山麻里子, 森山博由 | 5. 総ページ数 426 |
| 3. 書名 進化する皮膚科学 機能研究・臨床・評価・製品開発の最前線 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|